

Die Rolle des Spine Apparates als Kalzium-Speicher während der synaptischen Transmission

**Kombination von Zwei-Photonen Kalzium-Imaging mit
Glutamat-Uncaging an individuellen Synapsen in
organotypischen Schnittkulturen**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften

des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften,

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Anja Tippmann

aus Marienberg

Hamburg, März 2014

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 30.03.2014

Tag der Disputation: Hamburg, den 04.07.2014

Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:

Prof. Dr. Dr. h.c. Michael Frotscher

Prof. Dr. Christian Lohr

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. ZUSAMMENFASSUNGEN	13
1.1. Zusammenfassung	13
1.2. Abstract	14
2. EINLEITUNG	16
2.1. Der Hippocampus.....	16
2.1.1. Die Hippocampale Formation	16
2.1.2. Der Gyrus dentatus.....	18
2.1.3. Die Mooszellen im Hilus des Gyrus dentatus.....	19
2.1.4. Die Moosfaser-Synapse.....	23
2.2. Der Spine Apparat und Synaptopodin	25
2.2.1. Der Spine Apparat	25
2.2.2. Das mit dem Spine Apparat assoziierte Protein Synaptopodin	28
2.3. Zwei-Photonen-Mikroskopie und Glutamat-Uncaging	30
2.3.1. Prinzipien der Zwei-Photonen-Mikroskopie.....	30
2.3.2. Die optische Freisetzung von Neurotransmittern (Uncaging).....	32
2.4. Zielsetzung dieser Arbeit	35
3. MATERIAL UND METHODEN	36
3.1. Material.....	36
3.2. Methoden	36
3.2.1. Gewebekultur.....	36
3.2.1.1. Versuchstiere.....	36
3.2.1.2. Präparation	36
3.2.1.3. Kultivierung.....	37
3.2.2. Immunhistochemische Färbung.....	38
3.2.3. Immunogold-Markierung (EM) von Synaptopodin.....	39

3.2.4. Elektrophysiologie.....	41
3.2.5. Abbildungsverfahren (Imaging).....	43
3.2.6. Glutamat-Uncaging.....	46
3.2.7. Pharmakologie.....	48
3.2.8. Schematischer allgemeiner Versuchsablauf:.....	49
3.2.9. Datenanalyse.....	50
4. ERGEBNISSE	53
4.1. Immunhistochemische Färbungen.....	53
4.2. Immunogold-Markierung von Synaptopodin.....	56
4.3. Optische Freisetzung von Glutamat (Uncaging).....	58
4.3.1. Experimente unter Normalbedingungen.....	58
4.3.1.1. Induzierte Einzel-Signale im Voltage-Clamp-Modus (uEPSCs).....	59
4.3.1.2. Induzierte Einzel-Signale im Current-Clamp-Modus (uEPSPs).....	64
4.3.1.3. 15 bAPs mit 50 Hz.....	70
4.3.1.4. 24 bAPs mit 25 Hz.....	72
4.3.1.5. 24 uEPSPs (25 Hz) kombiniert mit 24 bAPs (25 Hz).....	74
4.3.2. Experimente unter dem NMDA-Rezeptor Blocker APV.....	77
4.3.2.1. Induzierte Einzel-Signale im Voltage-Clamp-Modus (uEPSCs) unter APV.....	77
4.3.2.2. Induzierte Einzel-Signale im Current-Clamp-Modus (uEPSPs) unter APV.....	81
4.3.2.3. 24 uEPSPs (25 Hz) kombiniert mit 24 bAPs (25 Hz) unter APV.....	85
4.3.3. Experimente unter dem AMPA-Rezeptor Blocker CNQX.....	88
4.3.3.1. Induzierte Einzel-Signale im Voltage-Clamp-Modus (uEPSCs) unter CNQX.....	88
4.3.3.2. Induzierte Einzel-Signale im Current-Clamp-Modus (uEPSPs) unter CNQX.....	92
4.3.3.3. 24 uEPSPs (25 Hz) kombiniert mit 24 bAPs (25 Hz) unter CNQX.....	97
5. DISKUSSION	100
5.1. Kontrollierte lokale Stimulation eines Spines bzw. einer Synapse.....	100

5.2. Mittels Uncaging induzierte exzitatorische postsynaptische Einzel-Signale der Moosfaser-Synapse von Mooszellen.....	103
5.3. Die Nachahmung der Präsynapse durch Uncaging.....	105
5.4. Block der inhibitorischen Transmission durch MNI-Glutamat	107
5.5. Induzierte elektrophysiologische Signale unterscheiden sich nicht zwischen Wildtyp und Synaptopodin Knock-out Mäusen.....	111
5.6. Heterogenität der induzierten elektrophysiologischen Einzel-Signale	112
5.7. Basale synaptische Transmission wird hauptsächlich durch AMPA- Rezeptoren vermittelt.....	114
5.8. Induzierte postsynaptische Signale sind nicht immer mit einem Kalzium-Einstrom verbunden	115
5.9. Kalzium-Einstrom während der normalen synaptischen Transmission erfolgt hauptsächlich durch NMDA-Rezeptor Kanäle	116
5.10. Der Spine Apparat ist während der basalen synaptischen Transmission nicht als Kalzium-Quelle beteiligt.....	119
5.11. Beteiligung des Spine Apparats als zusätzliche Kalzium-Quelle während starker synaptischer Stimulation.....	120
5.11.1. Grundlagen für die Induktion von Langzeitpotenzierung.....	120
5.11.2. Die Rolle des Spine Apparates	124
5.12. Synaptische Plastizität?	125
5.13. Involvierte Mechanismen für die Funktion des Spine Apparates als Kalzium-Speicher	127
5.14. Weitere Funktionen des Spine Apparates	128
6. LITERATURVERZEICHNIS	130
7. ANHANG	142
7.1. Bezugsquellen Material	142
7.1.1. Gewebekultur.....	142
7.1.1.1. Chemikalien.....	142
7.1.1.2. Verbrauchsmaterial	142
7.1.1.3. Geräte.....	143

7.1.2. Patch-Clamp Experimente	144
7.1.2.1. Chemikalien	144
7.1.2.2. Verbrauchsmaterial	145
7.1.2.3. Geräte.....	145
7.1.3. Färbungen	147
7.1.3.1. Chemikalien.....	147
7.1.3.2. Verbrauchsmaterial	148
7.1.3.3. Geräte.....	149
7.2. Medien und diverse Lösungen	150
7.3. Messwert-Tabellen	154
7.3.1. Messwerte für die induzierten Einzel-Signale im Voltage-Clamp (VC).....	154
7.3.2. Messwerte für die induzierten Einzel-Signale im Current-Clamp (CC).....	156
7.3.3. Messwerte für die reinen bAP-Serien im CC	158
7.3.4. Messwerte für das Stimulations-Protokoll zur Induktion von STDP im CC.....	159

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Signifikanzlevel alpha
Abb.	Abbildung
ACSF	<i>Artificial cerebrospinal fluid</i> , Künstliche Zerebrospinalflüssigkeit
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AP	Aktionspotential
APV	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
bAP	<i>backpropagating AP</i> , in die Zelle zurückpropagierendes AP
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
CA	Cornu Ammonis (Ammonshorn)
ca.	circa
CC	<i>Current clamp</i> , Stromklemme
CICR	<i>Calcium-induced calcium release</i> , Kalzium-abhängige Kalzium-Freisetzung
CNQX	6-Cyano-7-nitrochinoxalin-2,3-dion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
DAPI	Diamidino-phenylindol-dihydrochlorid
DG	<i>dentate gyrus</i> , Gyrus dentatus
DIV	<i>Days In Vitro</i> , Tage in Kultur
EC	<i>entorhinal cortex</i> , entorhinaler Kortex
EM	Elektronen-Mikroskopie
EOM	Elektrooptischer Modulator
EPSC	<i>excitatory postsynaptic current</i> , Exzitatorischer (erregender) postsynaptischer Strom

EPSE	<i>excitatory postsynaptic event</i> , Exzitatorisches (erregendes) postsynaptisches Ereignis
EPSP	<i>excitatory postsynaptic potential</i> , Exzitatorisches (erregendes) postsynaptisches Potential
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii (Lateinisch für „und Andere“)
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G/R	Grün durch Rot
GABA	<i>gamma-Aminobutyric acid</i> , γ -Aminobuttersäure
GCL	<i>granule cell layer</i> , Körnerzellband
GHz	Gigahertz
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
Hz	Hertz
IML	<i>inner molecular layer</i> , Innere Molekularschicht
IP3	Inositoltrisphosphat
IR	Infrarot
kHz	Kilohertz
KO	Knock-out
LTP	<i>long term potentiation</i> , Langzeitpotenzierung
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
M	Molar
max.	maximal
MF	Moosfaser
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
ml	Milliliter

ML	<i>molecular layer,</i> Molekularschicht
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MNI-Glutamat	4-Methoxy-7-nitroindoliny-Glutamat
mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid,</i> Boten-Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde(n)
mV	Millivolt
mV/s	Millivolt pro Sekunde
mW	Milliwatt
MW	Molekulare Masse
MΩ	Megaohm
n	Anzahl
nA	Nanoampere
nA/s	Nanoampere pro Sekunde
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natronlauge
NGS	<i>Normal Goat Serum,</i> Normales Ziegenserum
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
ns	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
P	Postnataler Tag
pA	Pikoampere
PB	Natriumphosphatpuffer
PFA	Paraformaldehyd
PMT	Photomultiplier (Licht-Verstärker-Röhre)
PP	<i>perforant pathway,</i> Tractus Perforans
PSF	<i>Point spread function,</i> Punktspreizfunktion
RMP	Ruhemembranpotential
RT	Raumtemperatur

Rya	Ryanodin
s	Sekunde(n)
SA	Spine Apparat
SC	<i>Schaffer collateral</i> , Schaffer-Kollaterale
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
Sign.	Signifikanz
STDP	<i>Spike-timing-dependent plasticity</i> , Impuls- und Zeitabhängige Plastizität
Synpo	Synaptopodin
Tab.	Tabelle
Ti:Sa-Laser	Titan:Saphir-Laser
uEPSC	durch Uncaging (optische Freisetzung) induziertes EPSC
uEPSP	durch Uncaging (optische Freisetzung) induziertes EPSP
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
VC	<i>Voltage clamp</i> , Spannungsklemme
VGCC	<i>Voltage-gated calcium channel</i> , Spannungsgesteuerter Kalzium-Kanal
vs.	versus
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. ZUSAMMENFASSUNGEN

1.1. Zusammenfassung

Im Allgemeinen wird angenommen, dass Veränderungen der freien Kalzium-Konzentration im Zytoplasma eine Verbindung zwischen synaptischer Erregung und den intrazellulären Prozessen zur Ausbildung von synaptischer Plastizität darstellen. Postsynaptische Kalzium-Speicher können dabei die Kinetik solcher Kalzium-Veränderungen regulieren. Dendritische Spines bzw. Excrescencen der CA3-Pyramidenzellen und Mooszellen im Hilus des Gyrus dentatus enthalten den sogenannten Spine Apparat, der die Rolle eines solchen Kalzium-Speichers übernehmen kann. Diese spezielle Organelle setzt sich aus Zisternen des glatten endoplasmatischen Retikulums und dazwischen liegenden elektronendichten Platten zusammen. Mit dem Spine Apparat ist das Aktin-bindende Protein Synaptopodin assoziiert. In Synaptopodin-Knock-out Mäusen werden, bei ansonsten unveränderter Morphologie der Neurone, keine Spine Apparate ausgebildet. Dies geht mit einer reduzierten Langzeitpotenzierung an der Synapse zwischen CA3- und CA1-Pyramidenzellen und einer beeinträchtigten räumlichen Lern-Leistungen einher.

In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob der Spine Apparat an der Kalzium-Dynamik während der synaptischen Transmission beteiligt ist. Dazu wurden Kalzium-Transienten in Excrescencen der Mooszellen in organotypischen Schnittkulturen von Wildtyp und Synaptopodin-Knock-out Mäusen miteinander verglichen. Für die Experimente wurden die Patch-Clamp-Technik mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie und der optischen Freisetzung von Glutamat (Zwei-Photonen-Uncaging) kombiniert. Durch die lokale Freisetzung des Neurotransmitters konnte eine direkte Korrelation zwischen den induzierten exzitatorischen postsynaptischen Ereignissen und den gleichzeitig resultierenden Kalzium-Veränderungen an individuellen Synapsen der Mooszellen hergestellt werden.

In den hier durchgeführten Experimenten wurde eine erhebliche Heterogenität der induzierten Signale in beiden Genotypen gefunden. Die Amplituden der exzitatorischen postsynaptischen Ströme und Potentiale und auch der Kalzium-Transienten zeigten von Synapse zu Synapse eine hohe Varianz. Bei dem Vergleich der ermittelten Signale zwischen Synaptopodin-Knock-out und Wildtyp konnte kein Unterschied gefunden werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Spine Apparat während der basalen synaptischen Transmission keine Rolle als zusätzliche Kalzium-Quelle spielt. Durch die pharmakologische Blockade der

N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren konnte außerdem gezeigt werden, dass der Einstrom durch diese Kanäle die Hauptquelle für synaptisch induzierte Kalzium-Transienten darstellt.

Des Weiteren wurden die Kalzium-Transienten während einer starken Stimulation der Moosfaser-Synapse verglichen, die zur Induktion von synaptischer Plastizität führen kann. Dazu wurden durch Uncaging induzierte exzitatorische postsynaptische Potentiale und in die Zelle zurückpropagierende Aktionspotentiale miteinander kombiniert. Unter diesen Bedingungen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden. So waren die mittleren Kalzium-Transienten im Synaptopodin-Knock-out um etwa 25 % in ihrer Amplitude im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass während erhöhter synaptischer Transmission der Spine Apparat als zusätzliche Kalzium-Quelle in dendritischen Spines dient.

Durch diese Arbeit konnte ein erster direkter Hinweis gegeben werden, dass der Spine Apparat die Rolle eines intrazellulären Kalzium-Speichers und Regulators der Kalzium-Konzentration im Spine innehat.

1.2. Abstract

Generally, it is assumed that transient changes in the concentration of free cytoplasmic Ca^{2+} in dendritic spines link synaptic excitation to intracellular mechanisms underlying synaptic plasticity. Postsynaptic Ca^{2+} stores potentially can regulate the kinetics of these Ca^{2+} transients. It has been suggested that the so called spine apparatus, a structurally refined derivative of the endoplasmic reticulum, presents such a Ca^{2+} store in dendritic spines. This special organelle consists of flat cisterns of smooth endoplasmic reticulum with intervening electron dense plates. The large complex spines or thorny excrescences of hilar mossy cells and CA3 pyramidal neurons contacted by the hippocampal mossy fibers typically contain a spine apparatus. Together with the spine apparatus the actin-binding protein Synaptopodin is closely associated. Previously it was found that mutant mice lacking Synaptopodin fail to develop spine apparatuses in otherwise unchanged dendritic spines. The absence of Synaptopodin is also accompanied by a reduced long term potentiation at the hippocampal CA3-CA1 synapse and an impaired spatial learning performance.

In this study, the hypothesis that the spine apparatus contributes to Ca^{2+} kinetics during synaptic transmission should be tested. For this purpose Ca^{2+} transients in large complex spines of mossy cells in entorhino-hippocampal organotypic slice cultures of wild type mice

and Synaptopodin knockout mice were compared with each other. In these experiments, the patch-clamp technique with two-photon Ca^{2+} imaging and two-photon glutamate uncaging were combined. Local photolysis of the caged compound MNI (4-methoxy-7-nitroindolyl)-glutamate allowed the correlation between the induced excitatory postsynaptic events and the corresponding Ca^{2+} changes at individual synapses of hilar mossy cells.

In the experiments performed here, a remarkable heterogeneity among the elicited signals in complex spines in both wild type tissue and Synaptopodin knockout tissue were found. The amplitudes of the elicited excitatory postsynaptic events as well as Ca^{2+} transients varied largely from synapse to synapse. The comparison of the detected signals between wild type and knockout revealed no difference. It can therefore be concluded that during the basal synaptic transmission the spine apparatus is not involved in calcium kinetics in spines or serves as an additional calcium store. However, induced Ca^{2+} transients were blocked by the N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor antagonist D-AP5, indicating that Ca^{2+} influx through the NMDA receptor is essential for synaptically evoked Ca^{2+} transients in large complex spines.

In further experiments, calcium transients during strong stimulation of the mossy fiber synapse were examined, which will lead to the induction of synaptic plasticity. For this reason the combination of excitatory postsynaptic potentials evoked by glutamate uncaging with backpropagating action potentials were used. Under these conditions, a significant difference between Synaptopodin-knockout and wild type organotypic slice cultures has been proven. The averaged calcium transients in the knockout showed a reduction in their mean amplitude of 25 % in comparison with the wild type. Therefore it can be concluded that during increased synaptic transmission the spine apparatus indeed plays a role as additional calcium source in dendritic spines.

The present study will be the first direct indication that the spine apparatus serves as an intracellular calcium store and is involved in the regulation of calcium kinetics in the dendritic spines.

2. EINLEITUNG

2.1. Der Hippocampus

2.1.1. Die Hippocampale Formation

Der Hippocampus gehört zu einer der evolutionär ältesten anatomischen Strukturen des Gehirns und ist Bestandteil des limbischen Systems. In der Ratte und Maus besitzt er eine langgestreckte und kommaförmige Struktur mit einer septo-temporalen Ausrichtung und verläuft rostradorsal von den Septumkernen hin zum temporalen Kortex (*Amaral und Witter, 1989*). Eine schematische Darstellung der Lage des Hippocampus im Gehirn eines Nagers ist in Abbildung 2.2 zu sehen. Der Hippocampus als Teil des limbischen Systems wird im Allgemeinen mit dem Ort des Lernens und Gedächtnis und der Emotion in Verbindung gebracht.

Wird dabei in der Wissenschaft allgemein vom Hippocampus gesprochen, so beinhaltet diese Bezeichnung aber eher das funktionelle System der hippocampalen Formation. Diese setzt sich zusammen aus den Regionen des eigentlichen Hippocampus (Hippocampus proprius) mit den Unterregionen CA1 bis CA3 (CA steht dabei für Cornu Ammonis), dem Gyrus dentatus („dentate gyrus“, DG), dem Subiculum, dem Prä- und Parasubiculum und dem entorhinalen Kortex (EC). Diese beschriebene Untergliederung ist in Abb. 2.1 aus dem Review *van Strien et al. (2009)* dargestellt.

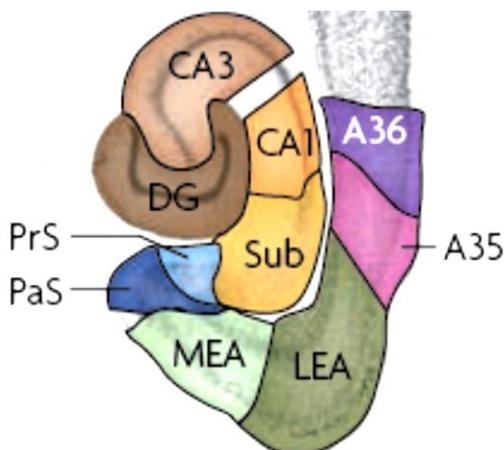


Abb. 2.1: Die einzelnen Komponenten der Hippocampalen Formation:

DG – Gyrus dentatus, CA1 und 3 – Pyramidenzellband (Cornu Ammonis), Sub – Subiculum, PrS – Präsubiculum, PaS – Parasubiculum, MEA – medialer entorhinaler Kortex (EC), LEA – lateraler EC, A – perirhinaler Kortex

(aus *van Strien et al., 2009*)

Die exzitatorischen Prinzipalzellen des Hippocampus sind vor allem die großen pyramidenförmigen Neurone in den CA-Regionen und die Körnerzellen im Gyrus dentatus. Außerdem gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichen Interneuronen in allen Bereichen, die γ -Aminobuttersäure (GABA) als Transmitter verwenden (siehe *Freund und Buszaki, 1996*).

Der Hippocampus in sich zeichnet sich auch durch eine einzigartige und meist in eine Richtung laufende neuronale Verschaltung der Prinzipalzellen der unterschiedlichen Bereiche aus, oft als „trisynaptischer Kreislauf“ bezeichnet (*Andersen et al., 1971*). Die erste Station in diesem intrinsischen hippocampalen Kreislauf ist der entorhinale Kortex (EC), der seine neuronalen Eingänge aus dem Neokortex bezieht (siehe dazu Abb. 2.2 – B). Die Axone der Neurone aus dem EC, der sogenannte Tractus perforans („perforant pathway“, PP), projizieren auf die Dendriten der Körnerzellen in den zwei äußeren Dritteln der Molekularschicht und sind somit Haupteingangsquelle für den Hippocampus. Die Körnerzellen wiederum innervieren mit ihren unmyelinisierten Axonen, besser bekannt als Moosfasern, und den einzigartigen präsynaptischen Endigungen (Boutons) vor allem die großen und komplexen Riesenspines der CA3-Pyramidenzellen in einer Unterschicht des Stratum radiatum, dem Stratum lucidum. Die Axone dieser Neurone, die Schaffer-Kollaterale, projizieren dann auf die Apikaldendriten der CA1-Pyramidenzellen im Stratum radiatum und lacunosum-moleculare. Der Kreislauf wird letztendlich durch die Rückprojektion der Zellen der CA1-Region zum EC geschlossen. Ein vereinfachtes Schema dieser neuronalen Verschaltung im Hippocampus ist ebenfalls in Abb. 2.2. – B zu sehen. Dabei liegt der trisynaptische Kreislauf innerhalb einer Aneinanderreihung von parallelen transversalen Schnitten bzw. Lamellen des Hippocampus (*Andersen et al., 1971*). Allerdings werden die longitudinalen axonalen Ausdehnungen der Schicht II Neurone im entorhinalen Kortex, der Mooszellen im DG und der CA3-Pyramidenzellen nicht mit einbezogen und die Hypothese sollte in einigen Teilen überdacht werden (siehe dazu *Sloviter und Lomo, 2012*).

Des Weiteren empfängt der Hippocampus extrinsische neuronale Eingänge aus dem medialen Septum und verschiedenen Gebieten des Hirnstamms, wie z.B. dem medialen Raphe-Kern über den Fornix-Pfad. Außerdem gibt es extensive Verbindungen, die dorsalen und ventralen kommissuralen Afferenzen, zwischen den Hippocampi der beiden Hirn-Hemisphären. Der Hippocampus sendet seine Projektionen wiederum in die lateralen präoptischen und hypothalamischen Hirnregionen, in septale Regionen, in den Thalamus, in das rostrale Mittelhirn und zum Subiculum und EC. Außerdem ist der Hippocampus über die Verbindung mit dem Mamillarkörper in den von Papez 1937 postulierten Kreis der neuronalen Grundlage der Emotionen (siehe *Papez, 1995*) eingebunden.

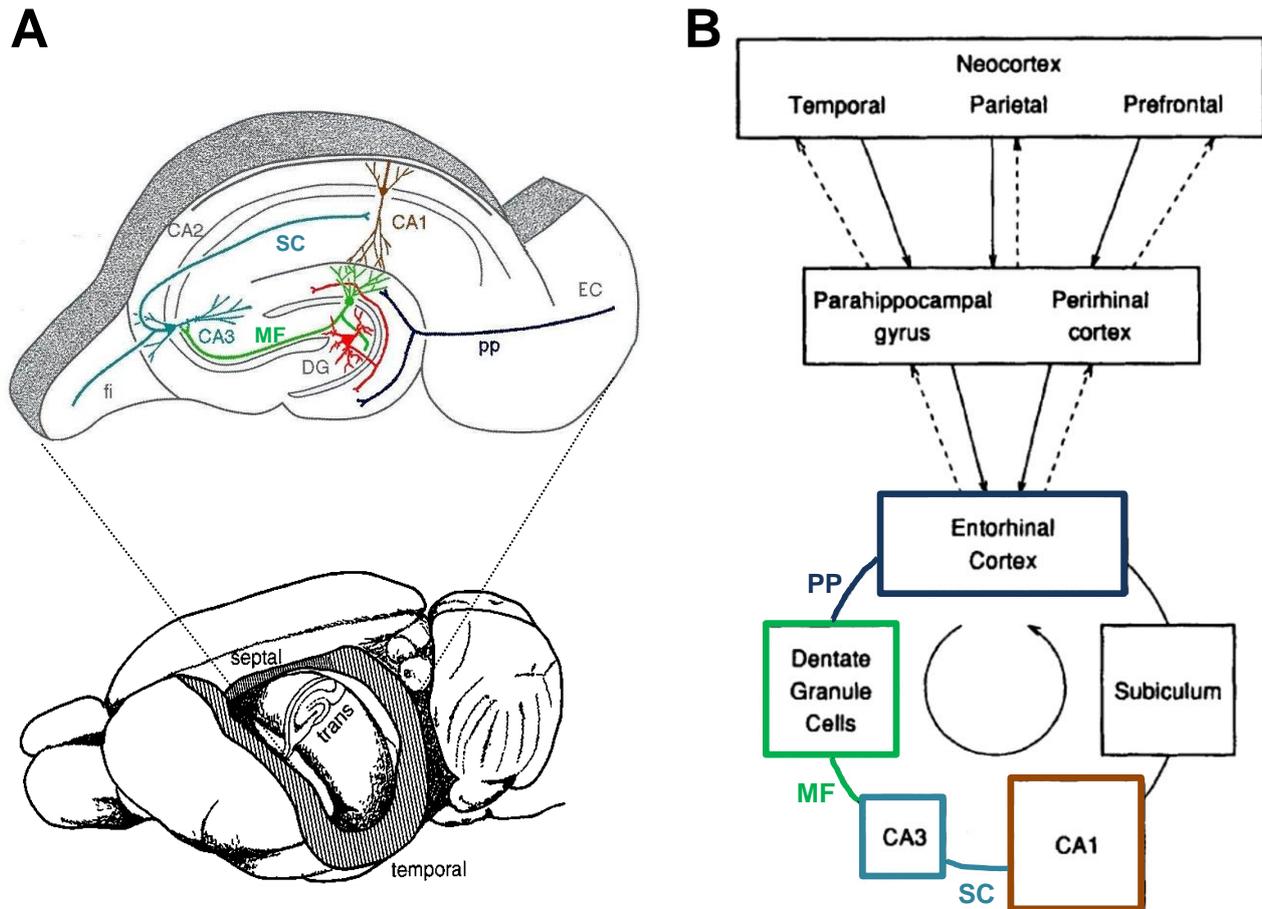


Abb. 2.2: Lage und Verschaltung der Hippocampalen Formation; **(A)** schematische Darstellung der Lage des Hippocampus im Gehirn eines Nagers, Vergrößerung eines transversalen Schnittes durch den Hippocampus mit integrierten Prinzipal-Zellen und jeweiligen Projektionen (modifiziert nach Andersen et al. "The Hippocampus Book"; 2007); **(B)** vereinfachte Darstellung der Verschaltung des Hippocampus und anderer beteiligter Hirnregionen; ausgehend vom Neocortex gelangen Projektionen über verschiedene Stationen, wie z.B. dem EC, zum Hippocampus (durchgezogene Linie) und wieder zurück (gestrichelte Linie); (modifiziert aus Treves und Rolls, 1994) fi = Fimbria, CA1-3 = Pyramidenzellbänder, DG = Gyrus Dentatus, PP = Tractus Perforans (perforant pathway), EC = Entorhinaler Kortex, MF – Moosfaser, SC – Schaffer-Kollaterale

2.1.2. Der Gyrus dentatus

Eine der Unterregionen der hippocampalen Formation ist der Gyrus dentatus. Dieser umfasst drei Schichten (Körnerzellband, Molekularschicht und Hilus), die in Abb. 2.3 unter B dargestellt sind. Die Prinzipal-Zellen des DG, die Körnerzellen, sind in einem „U“- oder „V“-förmigen

Zellband in einer großen Anzahl sehr eng gepackt. Dabei wird der Anteil des Zellbandes, der zwischen der CA1- und CA3-Region liegt, als suprapyramidales Blatt und der gegenüberliegende Anteil als infrapyramidales Blatt bezeichnet. Der Abschnitt zwischen diesen beiden Regionen ist der Scheitel („crest“). Die Dendriten der Neurone reichen in die relativ zellfreie Molekulare Schicht („molecular layer“, ML) und der Bereich den das Band einschließt wird als polymorphe Schicht oder auch Hilus bezeichnet.

Neben den Körnerzellen sind im Gyrus dentatus noch diverse Interneurone vorhanden und die am häufigsten auftretende und auch auffälligste Zelle im Hilus, die Mooszelle, die später separat beschrieben wird.

Die unmyelinisierten Axone der Körnerzellen benannte bereits Ramon y Cajal als die sogenannten Moosfasern (MF). Diese Fasern projizieren nicht nur in die CA3-Region des Hippocampus, sondern verzweigen sich und durchspannen den Hilus und bilden unter anderem Kontakte mit den Mooszellen aus. Diese Endterminalen sind zumeist sehr große Strukturen und werden als Boutons bezeichnet und sind das Gegenstück der komplexen dendritischen Riesenspines, den sogenannten Excrescencen, der Mooszellen und CA3-Pyramidenzellen. So bildet in der Ratte z.B. eine einzelne Körnerzelle Kontakt zu rund sieben bis zwölf Mooszellen aus (*Ascady et al., 1998*). Des Weiteren bilden die Moosfasern noch kleinere Fortsätze aus, über welche hauptsächlich Interneurone kontaktiert werden (*Acsady et al., 1998*). Genauere und weiterführende Informationen über den Gyrus dentatus liefern *Amaral et al. (2007)*.

Da die Körnerzellen einen direkten neuronalen Eingang aus dem entorhinalen Kortex über den Tractus perforans erhalten, ist der DG somit die erste Station für die Signalverarbeitung im Hippocampus.

2.1.3. Die Mooszellen im Hilus des Gyrus dentatus

Im Gyrus dentatus (DG) gibt es neben den Körnerzellen einen weiteren Typ von Prinzipalzellen, die von *Amaral (1978)* erstmals ausführlich beschriebenen und benannten Mooszellen (Originalzelle ist in Abbildung 2.3 – A zu sehen). Diese Zellen liegen im sogenannten Hilus. Diese auch als polymorphe Schicht bezeichnete Region liegt zwischen dem dichten Körnerzellband und dem proximalen Ende des CA3-Pyramidenzellbandes.

Die Mooszellen besitzen in der Regel ein sehr großes und meist dreieckiges oder multipolares Soma (20-25 μm , *Ribak et al., 1985*). Aus diesem entspringen drei oder mehr relativ starke primäre Dendriten, die im weiteren Verlauf dünner werden und sich drei bis vier Mal verzweigen. Dabei durchziehen sie den gesamten Hilus, verlassen diesen allerdings nicht (siehe Übersicht der Dendriten und des Axons einer Mooszelle in Abb. 2.3 – B). Insbesondere durchdringen die Dendriten typischerweise auch nicht die Körnerzellschicht. Als Namen gebendes Merkmal der Mooszellen gelten die dornenartigen Auswüchse („thorny excrescences“), welche die proximalen Dendriten mit einer Entfernung von 40-80 μm vom Soma bedecken (*Amaral, 1978*). Sie haben große Ähnlichkeiten mit denen, die an den proximalen Apikaldendriten der CA3-Pyramidenzellen zu finden sind (*Frotscher et al., 1991*). Ein Beispiel für eine solche Excrescence der Mooszellen ist in Abb. 2.3 unter C zu sehen.

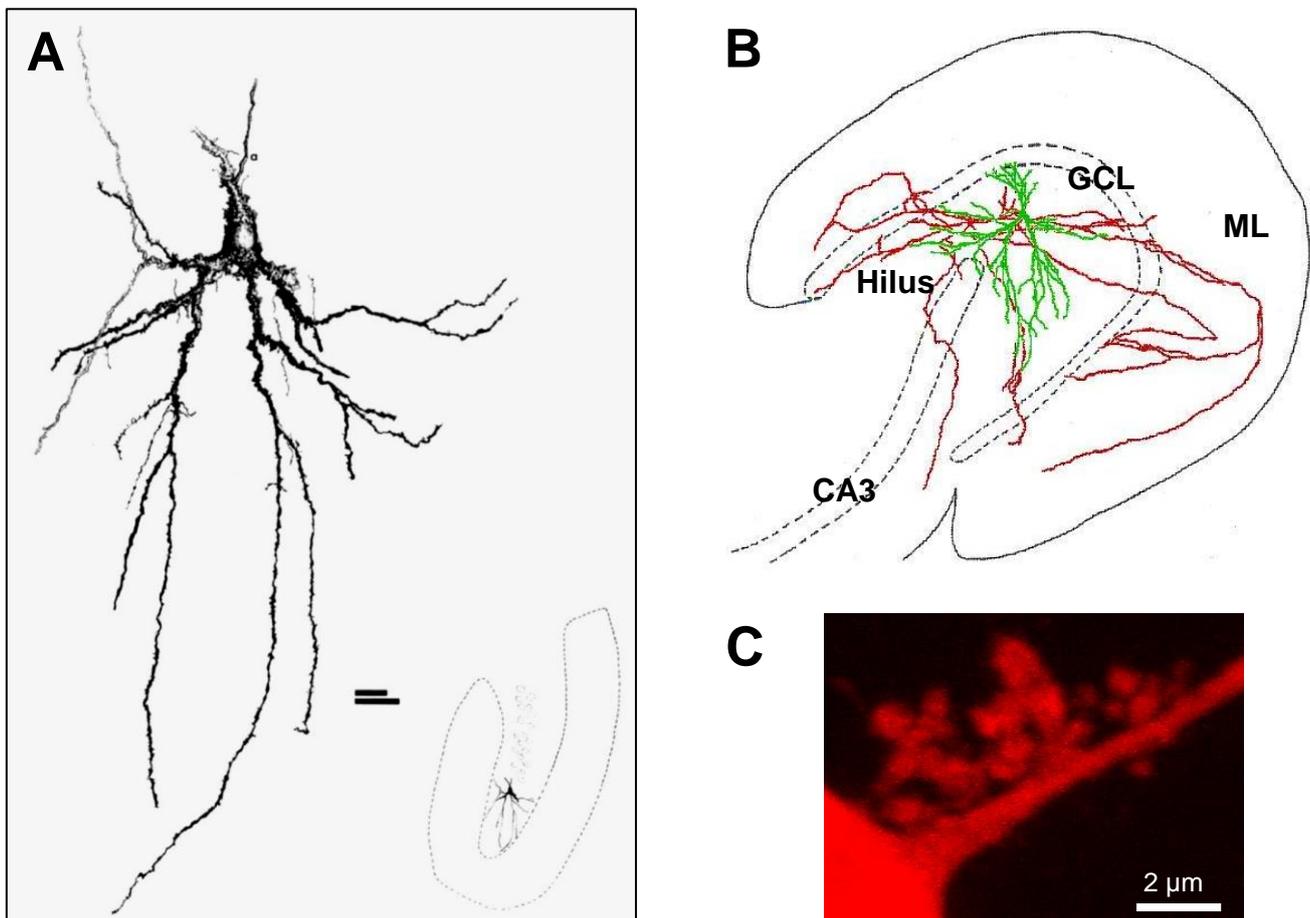


Abb. 2.3: Charakteristische morphologische Merkmale der Mooszellen im Hilus des Gyrus Dentatus (DG); **(A)** Original-Abbildung einer Mooszelle von Amaral 1978; **(B)** schematische Darstellung des DG (adaptiert aus Andersen et al. „The Hippocampus Book“, 2007), **Dendriten** der Mooszellen erstrecken sich über den gesamten Hilus ohne diesen zu verlassen, das weit verzweigte **Axon** terminiert im inneren Drittel der Molekularschicht; **(C)** Aufnahme der charakteristischen Excrescencen an den proximalen Dendriten der Mooszellen mittels der Zwei-Photonen-Mikroskopie.
GCL – Körnerzellband, ML – Molekularschicht, CA3 - Pyramidenzellband

Dabei gehen die Excrescencen aus dem angrenzenden Dendriten durch einen einzelnen Ansatz bzw. Hals hervor, der sich weiter verzweigt und dessen Endigungen sich zu einer Art Knolle oder zu ungleichmäßig aussehenden Köpfen aufweiten (*Chicurel und Harris, 1992*). Außerdem enthalten sie meistens ein durchgehendes glattes endoplasmatisches Retikulum (ER) und einige Spines zusätzlich Ribosomen, Multivesikuläre Körper, Mitochondrien und Mikrotubuli (EM-Analysen in der Ratte durch *Chicurel und Harris, 1992*). Im Allgemeinen formen die einzelnen dendritischen Spines mit einem Volumen im Femtoliter-Bereich das strukturelle Gerüst für den Großteil der exzitatorischen Synapsen im Gehirn und stellen dabei biochemische, z.B. für Kalzium-Signale, und elektrische Kompartimente dar (*Lee et al., 2012*). Dabei weisen Spines eine hohe Heterogenität in Struktur und Funktion auf.

Das großflächig verzweigte Axon der Mooszellen projiziert in die innere Molekularschicht („inner molecular layer“, IML) des ipsilateralen und kontralateralen DG (*Ribak et al., 1985, Buckmaster et al., 1996*) und erstreckt sich hierbei über mehr als die Hälfte des Hippocampus in der septalen-temporalen Ausdehnung (*West et al., 1979*). Die Axon-Endigungen bilden dabei asymmetrische Synapsen in der IML vor allem mit den Dendriten der Körnerzellen aus und im Hilus mit GABAergen Interneuronen und mit Spines anderer Mooszellen und nutzen dabei Glutamat als Neurotransmitter (*Wenzel et al., 1997*). Die Axone der Mooszellen erweisen sich dadurch als die Hauptquelle der sogenannten erregenden kommissuralen/assoziativen Projektion zum Gyrus dentatus.

Innerviert werden die Mooszellen über die gesamte Länge ihres Dendritenbaumes hauptsächlich von den Moosfasern der Körnerzellen (*Frotscher et al., 1991*), vor allem die Excrescencen erhalten direkten erregenden Eingang von den glutamatergen Boutons. Im Gegensatz zu CA3-Pyramidenzellen bestehen zusätzliche exzitatorische synaptische Kontakte zwischen großen als auch kleineren MF-Boutons und den kleinen peripheren Spines und distalen Dendriten der Mooszellen (*Frotscher et al., 1991*). Dabei besteht in etwa eine Rate von Körnerzelle zu Mooszelle von 100 zu 1 in der Ratte (*Henze und Buzsaki, 2007*). Die Autoren prognostizieren aus dieser Rate, dass eine typische Mooszelle die synaptische Aktivität von mehr als hundert Körnerzellen empfängt. Aufgrund der recht geringen Dichte der MF-Endigungen im Hilus wurde hergeleitet, dass jede Körnerzelle nur eine oder zwei Mooszellen mit den großen Boutons innerviert (*Henze und Buzsaki, 2007*). Nach *Henze et al. (2000)* bildet eine Körnerzelle ungefähr zehn Synapsen mit einer Mooszelle aus.

Durch elektrophysiologische Untersuchungen konnte auch ein inhibitorischer synaptischer Anteil an der Transmission, nach Blockade der glutamatergen Transmission, nachgewiesen werden (*Scharfman, 1992* und *Soltész und Mody, 1994*). Inhibitorische

Eingänge erhalten dabei die Mooszellen aus diversen intrinsischen GABAergen Kreisläufen im Hilus, von den Korbzellen („basket cells“) im Körnerzellband, vom kontralateralen Hilus und vom medialen Septum (*Soltesz und Mody, 1994*). *Acsady und Kollegen (2000)* zeigten in ihrer Studie außerdem, dass Cholecystinin- und Parvalbumin-positive Interneurone im Hilus bevorzugt Mooszellen innervieren. Zusätzlich erhalten die Mooszellen direkte cholinerge Eingänge aus dem Septum (*Deller et al., 1999*), Eingänge von einigen CA3-Pyramidenzellen (*Scharfman, 2007*) und die distalen Dendriten der Zellen bilden asymmetrische und symmetrische Kontakte mit Terminalen unbekanntem anatomischen Ursprungs (*Frotscher et al., 1991*) aus.

Mooszellen haben typischer Weise ein Ruhemembranpotential (RMP) von -63 mV bis -65 mV und zeigen eine hohe spontane Aktivität. Ihre Aktionspotentiale (APs) zeigen keine oder nur eine geringe Nach-Hyperpolarisation (*Scharfman und Schwartzkroin, 1988*). Die spontanen depolarisierenden Potentiale zeichnen sich durch eine außerordentliche Signal-Größe und -Frequenz aus. Außerdem zeigten Analysen der exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSPs) und Ströme (EPSCs) große Schwankungen innerhalb der Amplituden. Dieses Muster entspricht einer direkten Moosfaser-Aktivierung (*Scharfman, 1993 oder Livsey und Vicini, 1992*).

Mooszellen wurden bis zum heutigen Zeitpunkt umfangreich untersucht, weil sie eine besondere Anfälligkeit in Form von Degeneration zeigen, die vor allem bei der Temporallappen Epilepsie auftritt (Review siehe *Ratzliff et al., 2002*). Allerdings ist aus diesen Befunden schwer auf die genaue Funktion zu schließen und es werden immer wieder mehrere vorherrschende Theorien diskutiert.

Klare Aussagen lassen sich über die Verschaltung der Zellen treffen. So erhalten die Mooszellen durch die Moosfasern der Körnerzellen erregende synaptische Signale und geben durch ihre Axon-Endigungen in der inneren Molekularschicht ebenfalls ein starkes exzitatorisches synaptisches Signal an die dendritischen Spines der Körnerzellen ab. Auf diese Weise bilden die Mooszellen mit den Körnerzellen einen positiven Rückkopplungs-Kreislauf. Außerdem können durch die weiten longitudinalen Axon-Projektionen Signale über einen großen Bereich des Hippocampus bzw. Gyrus dentatus verteilt werden. Die Körnerzellen liegen in derselben Lamelle des Hippocampus wie das Soma der Mooszelle, die sie über die MF innervieren (Lamellen-Hypothese nach *Andersen et al., 1971*). Die Mooszelle wiederum projiziert aus ihrer eigenen Lamelle heraus und endigt auf Körnerzellen und Interneuronen in der inneren Molekularschicht des ipsi- und kontralateralen DG distaler Lamellen (*Deller et al., 1999*).

Eine weitere wichtige Rolle der Mooszellen liegt in der indirekten Inhibition der Körnerzellen. Mooszellen aktivieren vor allem im Hilus Interneurone, die wiederum eine hemmende Wirkung auf die Körnerzellen ausüben. Im Allgemeinen können die Mooszellen die Funktion eines effektiven Modulators im Gyrus dentatus übernehmen. Aber letztendlich ist die exakte Funktion der Mooszellen bis heute nicht ausreichend geklärt bzw. nachgewiesen und wird weiter diskutiert werden, wie die umfassende Betrachtung durch *Scharfman (2013)* zeigt.

2.1.4. Die Moosfaser-Synapse

Die dünnen unmyelinisierten Axone der Körnerzellen des Gyrus dentatus bilden mehrere Typen von Synapsen mit exzitatorischen und inhibitorischen Zellen des Hilus und der CA3-Region aus. Die auffälligste Form ist die Synapse zwischen den typischen großen Endigungen („Boutons“) und den Excrescencen der Mooszellen und CA3-Pyramidenzellen (*Henze et al., 2000*). Ein Bouton hat einen Durchmesser von vier bis zehn Mikrometer und ist angefüllt mit tausenden kleinen synaptischen Vesikeln, vielen dichten Vesikeln („dense-core vesicle“), glattem ER und Mitochondrien (*Henze et al., 2000* und *Rollenhagen et al., 2007*). Dabei umhüllt der präsynaptische Bouton die postsynaptische Excrescence, wie in Abb. 2.4 dargestellt ist (aus *Hamlyn, 1962*) und bildet mit dieser mehrere Aktive Zonen und mit dieser assoziierte postsynaptische Dichten aus (*Henze et al., 2000*). So zeigten *Chicurel und Harris (1992)* in einer elektromikroskopischen Untersuchung in der Ratte zwischen einem Bouton und einer Excrescence der CA3-Pyramidenzelle mehr als 37 solcher synaptischer Kontakte.

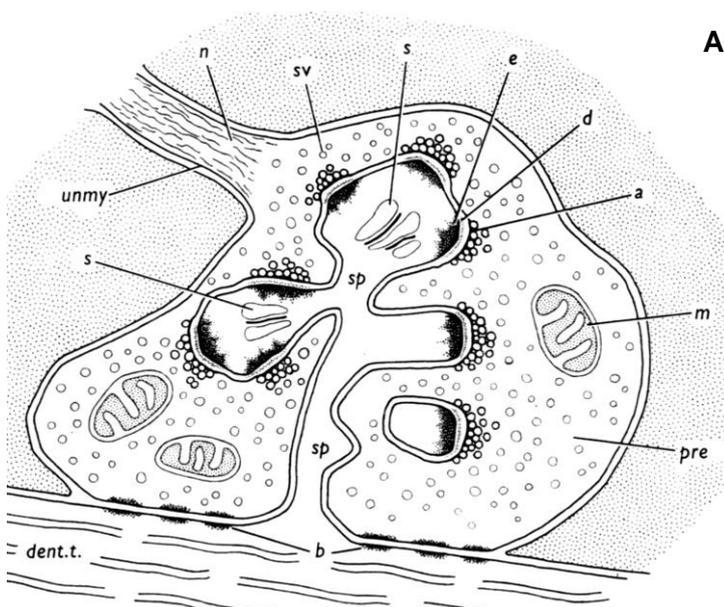


Abb. 2.4: Die Endterminale der Moosfasern (pre) umschließt die komplexen Spines bzw. Excrescencen (sp) an den proximalen Dendriten der CA3-Pyramidenzellen und Mooszellen und bildet mehrere Moosfaser-Synapsen aus, die Moosfasern sind nicht myelinisiert (unmy), der Spine Apparat (s) befindet sich in den einzelnen Köpfen einer Excrescence (Abbildung aus *Hamlyn, 1962*)

Im Gegensatz zu den klassischen exzitatorischen Synapsen im zentralen Nervensystem (ZNS) werden neben Glutamat zusätzlich einige Neuropeptide wie z.B. Dynorphin, Enkephalin und das Neuropeptid Y aus den MF-Boutons freigesetzt. Außerdem enthalten sie weitere Neuromodulatoren wie ATP/Adenosin, ein hohes Level an Zink, GABA (siehe dazu *Henze et al., 2000* und *Kobayashi, 2010*) und den Wachstumsfaktor BDNF („Brain-derived neurotrophic factor“) aus der Gruppe der Neurotrophine (*Dieni et al., 2012*).

Die elektrophysiologische Charakterisierung der MF-Synapse an CA3-Pyramidenzellen der Ratte durch *Jonas et al. (1993)* zeigte, dass der Hauptanteil der synaptischen glutamatergen Transmission über α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-(AMPA)- und Kainat-(KA)-Rezeptoren vermittelt wird. Außerdem ist an der Übertragung auch eine N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptor abhängige Komponente, allerdings mit einem geringeren Anteil, beteiligt. Dabei wurden im Schnitt relativ große EPSCs von rund 70 pA (bis zu max. 500 pA bis 1 nA) an dieser Synapse mit einer hohen Variabilität der synaptischen Ereignisse detektiert. Im Vergleich dazu wurden an der Schaffer-Kollateral-Synapse an CA1-Pyramidenzellen nur 7 pA im Durchschnitt gemessen (*Urban et al., 2001*).

An der MF-Synapse wurden mehrere für diese Synapse typische Formen der synaptischen Plastizität gefunden. So konnte eine große Potenzierung von zwei gepaarten Pulsen („paired-pulse potentiation“) und eine Frequenz-Bahnung („frequency facilitation“), bei der durch eine ansteigende Stimulations-Frequenz eine Verstärkung der synaptischen Stärke erzeugt wird, experimentell gezeigt werden (siehe dazu die Übersichtsarbeit von *Nicoll und Schmitz, 2005*). Neben diesen Kurzzeit-Veränderungen konnten außerdem auch eine Langzeit-Potenzierung (LTP) und -Depression (LTD) der synaptischen Transmission festgestellt werden. Dabei sind all diese Formen der Plastizität NMDA-Rezeptor unabhängig und werden präsynaptisch ausgebildet, durch eine erhöhte Freisetzung an Neurotransmittern (vor allem Glutamat) aus den synaptischen Vesikeln der Boutons. Experimente zur Untersuchung der Plastizität an der MF-Synapse wurden hauptsächlich an CA3-Pyramidenzellen durchgeführt, allerdings kamen *Lysetskiy et al. (2005)* zu den gleichen Ergebnissen an der MF-Synapse der Mooszellen.

In den letzten Jahren wurde allerdings dargelegt, dass die Entwicklung der synaptischen Plastizität an der MF-Synapse beträchtlich komplexer ausfällt (Übersicht siehe *Kerr und Jonas, 2008*). In mehreren Studien (*Kwon und Castillo, 2008* und *Rebola et al., 2008, 2011*) konnte eine postsynaptische Form der Langzeitpotenzierung gefunden werden, die durch die NMDA-Rezeptoren vermittelt wird und die NMDAR-vermittelte synaptische Transmission selektiv verstärkt. Dies involviert die Insertion von neuen NMDA-Rezeptoren in

die postsynaptische Membran. Außerdem wird eine signifikante Akkumulation von postsynaptischem Kalzium benötigt, wobei die Hauptquelle des Kalziums der Einstrom durch den NMDA-Kanal darstellt, um diese spezielle Form des LTPs zu induzieren (*Kwon und Castillo, 2008*). Für die Induktion wird, im Gegensatz zur traditionellen hochfrequenten Stimulation (meistens eine Serie von mehreren Stimulationszyklen mit einer Frequenz von 100 Hz), eine niederfrequente Stimulation (nur ein Zyklus von circa einer Sekunde bei 25 Hz) verwendet.

Beide beschriebenen Arten der synaptischen Plastizität an der Moosfaser-Synapse (Expression prä- oder postsynaptisch) können an einer individuellen Synapse gleichzeitig existieren und somit unterschiedliche Rollen in den komplexen Netzwerk-Funktionen für Lernen und Gedächtnis einnehmen (*Kerr und Jonas, 2008*).

2.2. Der Spine Apparat und Synaptopodin

2.2.1. Der Spine Apparat

Neurone besitzen ein ausgeprägtes und kontinuierliches Netzwerk aus glattem endoplasmatischem Retikulum, das die gesamte Nervenzelle durchspannt (eine schematische Übersicht siehe Abbildung 2.5, entnommen aus dem Review von *Berridge, 1998*).

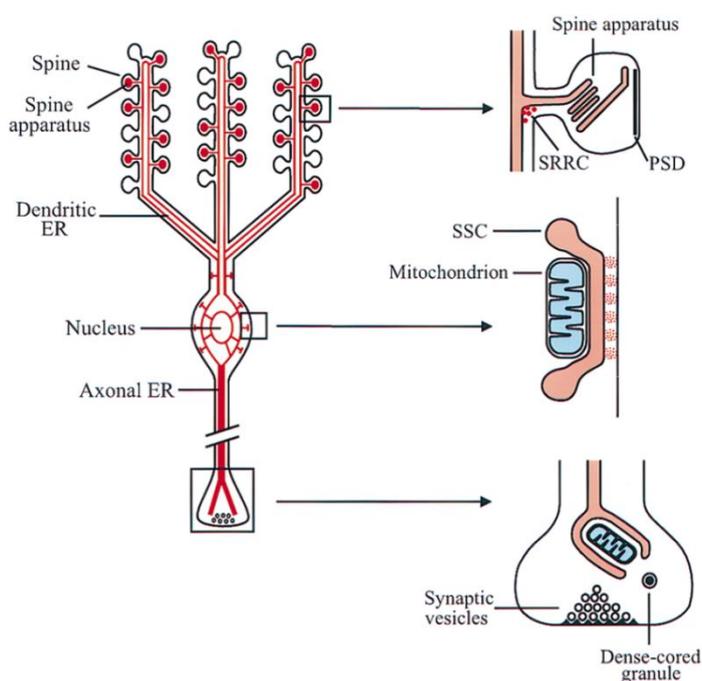


Abb. 2.5: Organisation des kontinuierlichen Netzwerkes aus ER in Neuronen, mit drei Beispielen für lokale Spezialisierungen, von *Berridge, 1998* (Abbildung 2)

PSD = Postsynaptische Dichte;
SRRC = Polyribosomen-Komplex
assoziiert mit Synapse; SSC =
oberflächennahe Zisterne

Dabei besitzt das ER mehrfache lokale Spezialisierungen, zum Beispiel reicht es bis in die dendritischen Spines und bildet dort oft den sogenannten Spine Apparat (SA).

Der Spine Apparat wurde erstmals 1959 durch Gray beschrieben (siehe Abb. 2.6 – A), als spezielle Struktur im Zytoplasma der Spines des zerebralen Cortex. Die Organelle wird dabei aus zwei bis drei oder mehreren ER-Zisternen mit dazwischenliegenden elektronendichten Platten gebildet und kann, wie in Abb. 2.6 unter B erkenntlich (aus Gray, 1959), verschiedene Formen aufweisen.

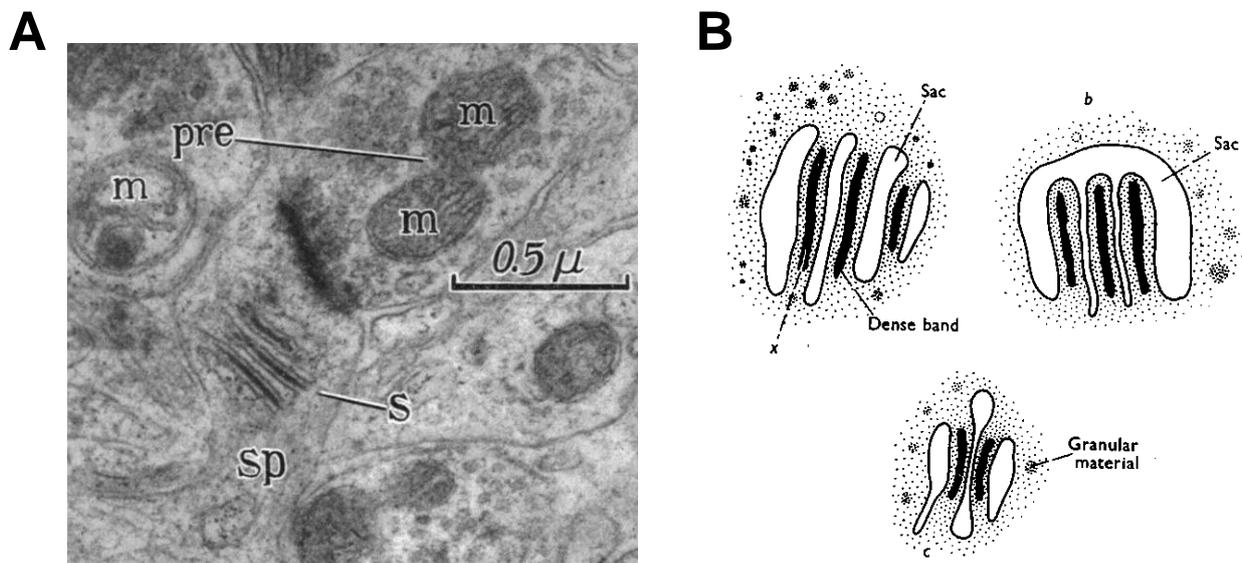


Abb. 2.6: Der Spine Apparat (SA) in dendritischen Spines im zerebralen Cortex, **(A)** Ausschnitt aus der originalen EM-Abbildung des SAs und **(B)** schematische Darstellung der verschiedenartigen Gestaltungen des SA entnommen aus Gray (1959, Abbildung 1 und 12); die Organelle wird gebildet aus ER-Zisternen („Sac“) und dazwischenliegenden elektronendichten Material („Dense band“);
sp = Spine, s = Spine Apparat, pre = präsynaptisches Element, m = Mitochondrium

Bereits Tarrant und Routtenberg zeigten in ihren Studien von 1979, dass der Spine Apparat in großer Nähe zur postsynaptischen Membran zu finden ist. Dabei fanden die Autoren, dass mehr als eine Zisterne rechtwinklig zur Membran ausgerichtet ist und es eine enge physische Assoziation (über „synaptic spinules“) zwischen dem SA und der Postsynaptischen Dichte (PSD) gibt. Diese Beziehung zueinander weist auf eine Beteiligung des SAs während der synaptischen Aktivität hin. Hierfür spricht auch der Befund, dass mit steigender Gesamtfläche der PSD die Anzahl der Zisternen des SAs zunehmen (Spacek und Harris, 1997).

Da der SA ein Abkömmling des glatten ERs ist, sind Funktionen bei der Regulation von Kalzium und weiteren intrazellulären Prozessen wie Transport und Synthese von z.B. Proteinen und Rezeptoren denkbar. Allerdings ist bis heute die genaue Funktion des Spine Apparates weitestgehend unbekannt, auch wenn die Rolle als lokaler Kalzium-Speicher häufig diskutiert wird. Eine Betrachtung der Kalzium-Signale in den dendritischen Spines und eine Zusammenfassung der verschiedenen Ergebnisse liefern dazu z.B. *Rose und Konnerth (2001)* oder auch *Higley und Sabatini (2012)*.

Über die genaue Verteilung des glatten ERs bzw. des SAs in den dendritischen Spines in den verschiedenen Hirnregionen gibt es mehrere zumeist elektronenmikroskopische Untersuchungen. Bereits *Hamlyn (1962)* beschreibt in seiner Erst-Darstellung der Ultrastruktur der Moosfaser-Synapse an den CA3-Pyramidenzellen den Spine Apparat als regelmäßigen Bestandteil der komplexen Spines (siehe Abb. 2.4). *Chicurel und Harris (1992)* zeigten des Weiteren, dass das ER in den verzweigten Spines der CA3-Pyramidenzellen im Hippocampus der Ratte durchgehend präsent ist. Andere Autoren, wie *Spacek und Harris (1997)*, (siehe Abbildung 6c) fanden in ihren Untersuchungen in CA1-Pyramidenzellen der Ratte, dass in rund 93 % der großen sogenannten „Mushroom“-Spines ein glattes ER und in 82 % davon ein voll entwickelter SA vorhanden war. Auch im visuellen Kortex der Maus wurden in 100 % der „Mushroom“-Spines ein SA gefunden (*Spacek, 1985*). All diese Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die Excrescenzen an den proximalen Dendriten der Mooszellen zumeist auch einen Spine Apparat besitzen und sich somit gut eignen, die Funktionen des SAs zu erforschen. Die Purkinje-Zellen im Kleinhirn (Cerebellum) weisen auch ein überaus kompliziertes Netzwerk an ER auf, das sich ebenfalls in die Dendriten und die zahlreichen dendritischen Spines erstreckt. Allerdings werden in diesen Spines keine Spine Apparate ausgebildet und zeigen im Vergleich zu Pyramidenzellen im Hippocampus eine andersartige Kalzium-Signalkaskade (*Svoboda und Mainen, 1999* und *Sabatini et al., 2001*).

Die Ausbildung des Spine Apparates ist ein rein postnataler Prozess. In komplexen Spines von Ratten mit einem Alter von 15 Tagen (postnataler Tag 15 oder auch P15) wurden „unreife“ Organellen mit nur wenigen glatten ER-Blasen gefunden, die sich zum adulten Tier hin in einen komplexen und ausgereiften Spine Apparat mit mehreren Zisternen entwickeln (*Harris et al., 1992*).

2.2.2. Das mit dem Spine Apparat assoziierte Protein Synaptopodin

Eine direkte Verbindung zwischen dem Spine Apparat und einem Protein namens Synaptopodin (Synpo) in Spines von Neuronen im Telencephalon konnte durch *Deller et al. (2000)* gezeigt werden.

Charakterisiert wurde Synaptopodin bereits von *Mundel et al. (1997)* als ein lineares Protein mit einer Masse von 100 Kilo-Dalton (kDA) im Gehirn, einem hohen Anteil an der Aminosäure Prolin und einer engen Assoziation zu Aktin. Ursprünglich wurde Synpo in einer Verbindung zu den Aktin-Mikrofilamenten der Podozytenfußfortsätze in den Nierenkörperchen (Glomeruli) gefunden, wo es eine Rolle bei der Regulation von Rückzug und Verlängerung dieser Fortsätze spielt. Außerdem wurde das Protein in verschiedenen Bereichen des Gehirns, wie im Olfaktorischen Bulbus, im zerebralen Kortex, im Striatum und im Hippocampus, gefunden. Allerdings gab es keine Expression im Cerebellum, was gut dazu passt, dass in dieser Hirnregion keine Spine Apparate ausgebildet werden. Bei genaueren Untersuchungen konnte die Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) für Synpo nur in den Zellkörpern der Neurone und das exprimierte Protein nur in den dendritischen Schichten nachgewiesen werden. In Immunhistochemischen Färbungen zeigt sich Synpo meist als punktförmige Markierung vor allem in Spines und zu einem geringeren Ausmaß in den Dendriten (*Deller et al., 2000*). Außerdem ordnen sich die Synpo-positiven Punkte in einem charakteristischen regionen- und schicht-spezifischen Muster an, das sogar auf Zellebene besteht (*Bas Orth et al., 2005*). Die Größe und Lokalisation dieser Punkte decken sich dabei mit der Größe und Lokalisation des SAs und zeigen die enge Verbindung von Synpo zu dieser speziellen Organelle.

Der erste Nachweis von Synaptopodin als Protein im Gehirn konnte in Western-Blot-Analysen durch *Mundel et al. (1997)* um den Postnatalen Tag 15 erbracht werden und ein maximales Level der Expression im Gehirn von adulten Tieren. Eine genauere Analyse zeigte, dass bereits ab P5 eine schwache Expression zu erkennen war, die im Zeitverlauf drastisch zunahm und ab der zweiten postnatalen Woche das Niveau der adulten Tiere erreichte (*Czarnecki et al., 2005*). Dabei folgte die Bildung von Synpo der Differenzierung der Prinzipalneurone im Hippocampus. Zwischen P10 und P20 kommt es zu einem drastischen Anstieg der Anzahl der dendritischen Spines, der wiederum von einer deutlichen Zunahme der Synaptopodin-Expression begleitet ist. Die Proteinbildung folgt somit annähernd dem zeitlichen Verlauf der Bildung der mit Synpo assoziierten Spine Apparate (*Harris et al., 1992*), die vollentwickelt nicht vor P16 zu erkennen sind.

Dass Synaptopodin eine wichtige Komponente des Spine Apparates ist, zeigten *Deller et al. (2003)*. Die Autoren entwickelten eine Knock-out (KO) Maus, bei der das Gen für Synpo ausgeschaltet wurde. Die KO-Mäuse entwickelten sich völlig normal und zeigten keinerlei offensichtliche patho-histologische Veränderungen. Die Nieren, in denen eine starke Expression von Synpo erfolgt, zeigten in ihrer Feinstruktur und Funktion ebenfalls keine Defizite. Die Architektur des Gehirns war unverändert und die Neurone zeigten eine normale Morphologie, Orientierung und Verzweigung der Dendriten mit ebenfalls normaler Anzahl bzw. Dichte und Größe der Spines. Allerdings wurden bei ausführlichen elektronenmikroskopischen Betrachtungen keinerlei Spine Apparate gefunden, nur gelegentliche glatte ER-Zisternen (siehe nachfolgende Abb. 2.7 aus *Deller et al., 2003*).

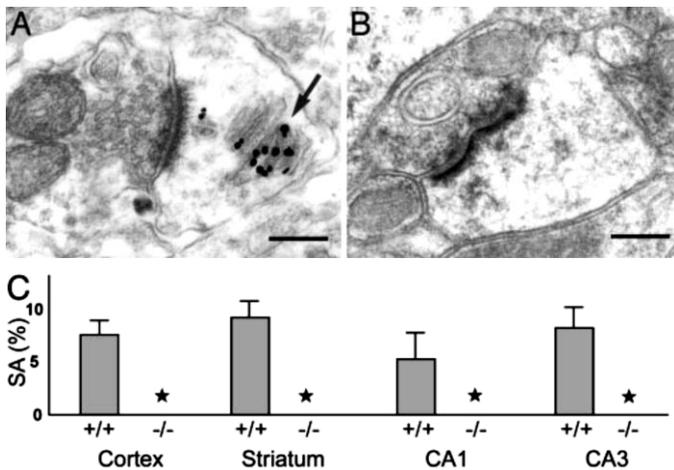


Abb. 2.7: Synaptopodin Knock-out Mäuse besitzen keinen Spine Apparat; **(A)** Immunogoldmarkierung (schwarze Punkte) von Synpo im WT (+/+) assoziiert mit dem SA (siehe Pfeil); **(B)** KO (-/-) ohne SA; **(C)** durchschnittliche Verteilung des SA in verschiedenen Hirnregionen (aus *Deller et al., 2003*)

Durch elektrophysiologische Untersuchungen konnte eine normale basale synaptische Transmission festgestellt werden. Dagegen war eine Langzeitpotenzierung (LTP) an der Schaffer-Kollateral-Synapse in CA1-Pyramidenzellen jedoch deutlich seltener induzierbar und die erreichten Amplituden der Potenzierung waren in akuten Hippocampus-Schnitten von Synpo-defizienten Mäusen erheblich reduziert. Passend dazu wurde bei Verhaltenstests eine Minderung in der Fähigkeit zum räumlichen Lernen im „Radial-Arm-Maze“ festgestellt. Des Weiteren waren die KO-Mäuse weniger ängstlich im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (im „elevated-plus-maze test“) und eine reduzierte horizontale lokomotorische Aktivität konnte bestimmt werden („open-field-test“).

Die Synaptopodin Knock-out Maus ist demnach ein gutes Modell zur Untersuchung der Funktion des Spine Apparates vor allem in Hinsicht auf seine Rolle als Kalzium-Speicher im Spine und der Beteiligung an der synaptischen Transmission und Plastizität.

2.3. Zwei-Photonen-Mikroskopie und Glutamat-Uncaging

2.3.1. Prinzipien der Zwei-Photonen-Mikroskopie

Um hochauflösende Beobachtungen der dynamischen Veränderungen von Struktur und Funktion individueller Neurone in einem kompakten Gewebe durchführen zu können, wurde in den letzten beiden Jahrzehnten meist die Technik der Multiphotonen-Mikroskopie angewendet. Vor allem die Zwei-Photonen-Mikroskopie ermöglichte es den Wissenschaftlern in kleinen Kompartimenten wie den dendritischen Spines Untersuchungen zur Kalzium-Dynamik durchzuführen (siehe dazu *Svoboda und Yasuda, 2006* und *Zipfel et al., 2003*).

Die erste Beschreibung des Prinzips der Zwei-Photonen-Anregung für die Anwendung in der Laser-Scanning-Mikroskopie erfolgte durch *Denk et al. (1990)*. Während der Ein-Photonen-Anregung bei der Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie wird ein Photon mit einer kurzen Wellenlänge z.B. 488 nm von einem Fluoreszenz-Farbstoffmolekül absorbiert und kann dann wiederum ein einzelnes Photon der Fluoreszenz emittieren. Im Gegensatz dazu werden bei der Zwei-Photonen-Anregung simultan (innerhalb von 0,5 Femtosekunden) zwei Photonen mit einer längeren Wellenlänge wie z.B. 960 nm durch das Molekül absorbiert. Die Energien der beiden Photonen werden kombiniert, um das Molekül in den angeregten Zustand zu versetzen und anschließend wiederum das Fluoreszenz-Photon auszusenden. Eine Gegenüberstellung der beiden Prozesse ist in dem vereinfachten Jablonski-Schema in Abb. 2.8 – A dargestellt.

Die Ein-Photonen-Anregung ist ein Prozess, der linear abhängig ist von der einfallenden Lichtintensität und deshalb findet die Absorption innerhalb des gesamten Anregungs-Lichtkegels statt (*Helmchen und Denk, 2005*). Multiphotonen-Prozesse werden oft als nicht linear bezeichnet, da die Rate, mit der die Prozesse auftreten, eine nicht lineare Abhängigkeit zur Intensität zeigen. Es besteht bei der Zwei-Photonen-Absorption somit eine quadratische Abhängigkeit zur Lichtintensität. Bei einer Verdopplung der Intensität kommt es dadurch zu einer vierfach erhöhten Fluoreszenz (*Zipfel et al., 2003*). Um eine ausreichende Fluoreszenz durch die Zwei-Photonen-Anregung zu erzeugen, werden hauptsächlich gepulste Laser genutzt (*Zipfel et al., 2003*). Diese erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Photonen simultan mit dem Farbstoffmolekül interagieren können. Hierbei werden sehr häufig durchstimmbare Ultrakurzpuls-Laser, wie z.B. sogenannte modengekoppelte Titan:Saphir-Laser (Ti:Sa-Laser), verwendet. Die im Fokuspunkt des Lasers durch Zwei-Photonen-

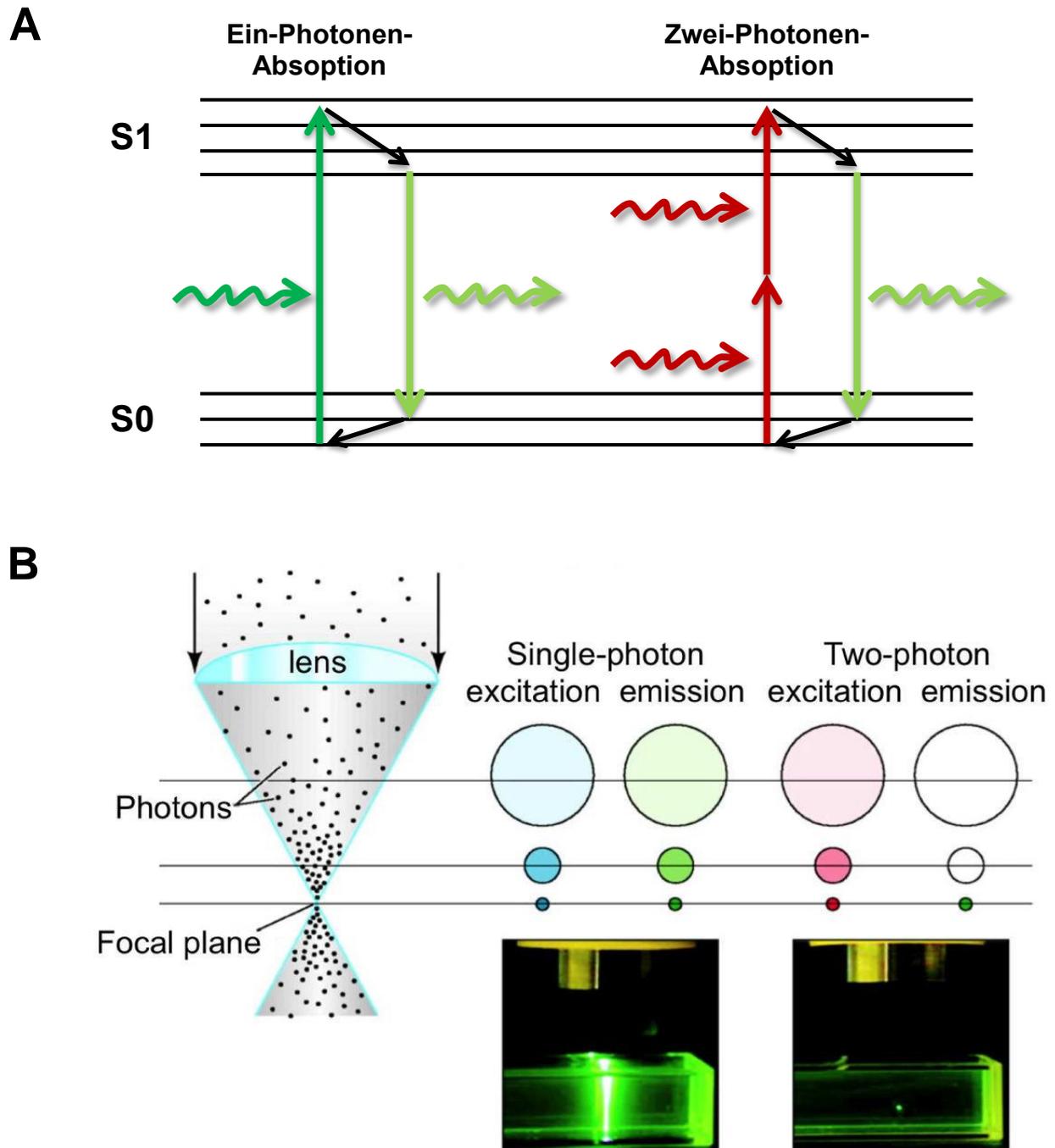


Abb. 2.8: Vergleich zwischen Ein- und Zwei-Photonen-Anregung; **(A)** Schematische Darstellung der Ein-Photonen- und Zwei-Photonen-Anregung in einem vereinfachten Jablonski-Schema; **(B)** Das linke Schema zeigt die ansteigende Konzentrierung der Photonen in der fokalen Ebene („focal plane“) durch die Objektiv-Linse („linse“). Durch die lineare Natur der Ein-Photonen-Anregung kommt es entlang der gesamten Z-Achse zu Emission von Fluoreszenz (grüne Kreise in der Mitte). Im Gegensatz dazu produziert die Zwei-Photonen-Anregung nur in einem Punkt in der Fokusebene eine Emission von Fluoreszenz durch ihre nicht-lineare Abhängigkeit (grüne und weiße Kreise rechts). Die photographischen Abbildungen zeigen das Emissions-Profil von einer Ein- und Zwei-Photonen-Anregung in einer Küvette mit einer grün fluoreszierenden Flüssigkeit (Abbildung 1 aus *Ellis-Davies, 2011*).

Absorption generierte Fluoreszenz-Intensität fällt dabei entlang der z-Achse quadratisch mit der Entfernung von der Fokus-Ebene ab (*Svoboda und Yasuda, 2006*). Ein Ergebnis davon ist, dass Fluorophore in einem ausschließlich sehr kleinen beugungsbegrenzten fokalen Volumen angeregt werden. Als Folge der lokalen Anregung wird kein räumlicher Filter (Lochblende oder auch „pinhole“) im Detektionsweg benötigt, im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie, bei der die resultierende Fluoreszenz über die Scan-Spiegel und durch eine Lochblende auf die Detektoren geleitet wird. So können in der Zwei-Photonen-Mikroskopie alle emittierten Fluoreszenz-Photonen (auch die am Gewebe gestreuten) aus dem gesamten Gesichtsfeld in alle Richtungen detektiert und die Effizienz dramatisch erhöht werden. Eine Gegenüberstellung der Ein- und Zwei-Photonen-Anregung ist in Abb. 2.8 – B zusehen (aus *Ellis-Davies, 2011*).

Die Restriktion der Multiphotonen-Anregung verringert dadurch auch das Bleichen eines Fluorophores, die Schädigung eines Gewebes (Photo-Toxizität) außerhalb der Fokusebene (*Zipfel et al., 2003*) und außerdem das Hintergrundsignal im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie mit ultravioletter-(UV)-Anregung (*Sako et al., 1997*). In kompakten Nervengeweben, wie z.B. in organotypischen Schnittkulturen, wird Licht mit einer sichtbaren Wellenlänge besonders stark gestreut (*Denk et al., 1994*), und vor allem in größeren Gewebetiefen kommt es durch diese starke und vielfache Lichtstreuung zu einer Verzerrung und Unschärfe der Abbildungen (*Helmchen und Denk, 2005*). Bei der Zwei-Photonen-Anregung in einem Wellenlängen-Bereich von Rot oder Infrarot (IR) ist die Streuung erheblich reduziert und daher die optische Eindringtiefe in ein Gewebe verbessert und eine höhere räumliche Auflösung seitlich (lateral) und senkrecht (vertikal) möglich (*Denk et al., 1994*).

2.3.2. Die optische Freisetzung von Neurotransmittern (Uncaging)

Die synaptische Aktivität und vor allem die synaptische Plastizität von Neuronen war und ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (siehe Reviews von *Segal, 2005*; *Muller et al., 2002*; *Zucker und Regehr, 2002* oder speziell für die MF-Synapse *Nicoll und Schmitz, 2005*). Dafür entwickelten die Wissenschaftler viele Methoden, um einzelne Neurone zu stimulieren und/oder elektrophysiologisch ableiten zu können. Weit verbreitete Techniken dabei sind die elektrische Stimulation über eine Elektrode oder auch eine lokale Verabreichung einer Substanz zur Manipulation einer Nervenzelle. Auf diesem Level ist es allerdings sehr schwer, wenn nicht sogar unmöglich, einen einzelnen Spine oder auch eine individuelle Synapse

kontrolliert zu aktivieren. Besondere Probleme stellten dabei kompakte Gewebe wie z.B. Akutschnitte oder Schnittkulturen dar.

Vor allem bei der Untersuchung der synaptischen Vorgänge an der speziellen Moosfaser-Synapse zwischen Körnerzelle und Mooszelle ist es mit den traditionellen Methoden fast unmöglich eine individuelle Synapse zu stimulieren. Die Axone der Körnerzellen durchziehen den Hilus in Form zahlreicher dünner Faszikel und nicht in einem kompakten Faserbündel und sind somit für eine elektrische Stimulation schwer zugänglich. Des Weiteren bilden ein Moosfaser-Bouton und eine Excrescence nicht nur eine, sondern eine Vielzahl an Synapsen aus, z.B. laut *Henze et al. (2000)* in CA3-Pyramidenzellen zwischen drei und achtzig. Eine lokale Verabreichung von manipulativen Substanzen wird somit auch immer mehrere Synapsen aktivieren.

Eine Technik, die eine räumlich selektive Stimulation individueller Synapsen ermöglicht, ist das optische Freisetzen von Neurotransmittern durch Licht (Uncaging). Dabei wird das gewünschte Molekül durch die chemische Modifikation mit einer Schutzgruppe, die durch Licht abgespalten werden kann, biologisch inaktiviert (*Ellis-Davies, 2007*). Durch kurze Belichtung (zumeist im UV-Spektrum) kommt es zur Spaltung und in Folge dessen zu einem Anstieg der Konzentration des jetzt biologisch aktiven Moleküls. Diese freigesetzten Botenstoffe können nun an dem entsprechenden Zielort, wie z.B. den synaptischen Rezeptoren, binden und zelluläre Prozesse auslösen.

Vorteile dieser speziellen Methode liegen darin, dass die Freisetzung des Biomoleküls sehr schnell und repetitiv erfolgen kann und dass fein graduierte Konzentrationsänderungen des Moleküls in Abhängigkeit von der Stimulationsstärke erreicht werden können (*Ellis-Davies, 2007*).

Gerade die Verwendung inaktivierter Neurotransmitter eignet sich besonders als Hilfsmittel für die kontrollierte Stimulation von Synapsen oder auch extrasynaptischen Transmitter-Rezeptoren. Dabei bieten sie den Vorteil, dass nur ein einzelner und spezieller Neurotransmitter freigesetzt und dessen Wirkung untersucht werden kann, wohingegen bei einer elektrischen Stimulation auch andere Substanzen aus der axonalen Terminale mit ausgeschüttet werden. Die Aktivierung von Spannungs-gesteuerten Kanälen zur Transmitter-Freisetzung aus der Präsynapse ist nicht erforderlich. Durch die Kontrolle des Uncaging-Volumens können viele Rezeptoren oder auch mehrere Synapsen gleichzeitig aktiviert werden (*Ellis-Davies et al., 2007*).

Viele chemisch maskierte („caged“) Substanzen finden ihre Anwendung in der konfokalen Mikroskopie und werden im UV-Bereich freigesetzt. Dabei gelten all die Einschränkungen wie bereits für die Ein-Photonen-Anregung im vorangegangenen Kapitel

beschrieben. Durch die Entwicklung von chemisch maskierten Substanzen, die auch in der Zwei-Photonen-Mikroskopie eingesetzt werden, können diese Nachteile vermieden werden. Wie bereits für die Zwei-Photonen-Anregung beschrieben, können diese Substanzen in einem sehr kleinen und fokal begrenzten Volumen freigesetzt werden. Außerdem ist die Freisetzung, im Gegensatz zu UV, auch in tiefen Schichten von Geweben möglich, die Streuung des Lichtes (vom Laser) ist verringert und die Verwendung längerer Wellenlängen ist weniger toxisch für lebende Zellen, insbesondere für Langzeitbeobachtungen (siehe dazu auch der Vergleich zwischen Zwei-Photonen und UV-konfokale Mikroskopie von *Sako et al., 1997*).

Für die Untersuchung exzitatorischer Synapsen und deren Funktion hat sich im Allgemeinen das für die Zwei-Photonen-Mikroskopie geeignete 4-Methoxy-7-nitroindoliny-Glutamat kurz MNI-Glutamat (*Matsuzaki et al., 2001*) durchgesetzt, obwohl es mittlerweile eine ganze Anzahl an chemisch maskierten Glutamat-Derivaten gibt (siehe Auflistung bei *Ellis-Davies, 2013*). Durch das Zwei-Photonen-Uncaging des maskierten Glutamats können lokalisiert und kontrolliert einzelne Spines bzw. individuelle Synapsen stimuliert werden. Dabei wird das MNI-Glutamat, das biologisch inaktiv ist, durch zumeist kurze Laserpulse bei einer Wellenlänge von rund 720 nm gespalten. Das jetzt aktive Glutamat kann an die verschiedenen Glutamat-Rezeptoren, binden. Eine schematische Darstellung der Wirkungsweise des Zwei-Photonen Ungagings ist in Abb. 2.9 zu finden.

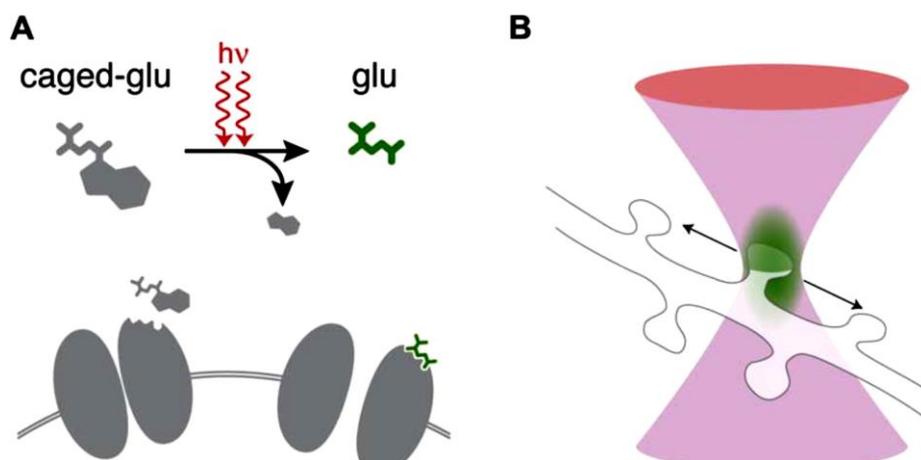


Abb. 2.9: Lokalisierte Stimulation eines Spines durch Zwei-Photonen Freisetzung von Glutamat (Uncaging); **(A)** Allgemeines Funktionsprinzip: durch einen kurzen Laserpuls wird der Neurotransmitter freigesetzt und kann an die Zielrezeptoren binden und diese aktivieren; **(B)** durch das Zwei-Photonen Uncaging kann in einem kleinen Volumen die Substanz freigesetzt werden und somit kann ein einzelner Spine bzw. eine einzelne Synapse kontrolliert stimuliert werden (Abbildung aus *Judkewitz et al., 2006*)

2.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Untersuchung der Hypothese, dass der Spine Apparat an der Kalzium-Dynamik während der synaptischen Transmission als zusätzliche Kalzium-Quelle beteiligt ist. Dazu sollen Kalzium-Transienten in Excrescencen der Mooszellen im Hilus des Gyrus dentatus in organotypischen Schnittkulturen von Wildtyp und Synaptopodin-Knock-out Mäusen miteinander verglichen werden. Für die Experimente werden die Patch-Clamp-Technik mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie und der optischen Freisetzung von Glutamat (Zwei-Photonen-Uncaging) kombiniert.

Untersucht werden soll die basale synaptische Transmission mittels Induktion von einzelnen exzitatorischen postsynaptischen Strömen (uEPSCs) und postsynaptischen Potentialen (uEPSPs) durch Glutamat-Uncaging an individuellen Synapsen.

Außerdem soll durch spezifische pharmakologische Blockade ionotroper Glutamat-Rezeptoren die Beteiligung der postsynaptischen Rezeptoren an den elektrophysiologischen Antworten und Kalzium-Signalen analysiert werden.

Des Weiteren sollen resultierende Kalzium-Transienten während einer starken Stimulation, die zur Induktion von synaptischer Plastizität führen kann, zwischen den Genotypen verglichen werden. Dazu sollen die durch Uncaging induzierten exzitatorischen postsynaptischen Potentiale und in die Zelle zurückpropagierende Aktionspotentiale kombiniert werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

Für alle in dieser Untersuchung verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte sind die genauen Bezeichnungen und Bezugsquellen im Anhang (Abschnitt 7.1.) aufgelistet.

3.2. Methoden

3.2.1. Gewebekultur

3.2.1.1. Versuchstiere

Für diese Arbeit wurden homozygote Mäuse, entweder Wildtyp (WT) oder Synaptopodin Knock-out (KO, *Deller et al., 2003*) mit einem C57/Bl6-Hintergrund, mit einem Alter von drei bis fünf Tagen (postnatal, P3 bis P5) verwendet. Die Haltung und Tötung der Tiere erfolgte gemäß den deutschen Richtlinien zum Umgang mit Versuchstieren.

3.2.1.2. Präparation

Die Herstellung der organotypischen Schnittkulturen des entorhino-hippocampalen Komplexes erfolgte nach der von *Stoppini, Buchs und Muller (1991)* entwickelten Methode und wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Jungtiere wurden mit einer großen Schere dekapitiert und die Schnittfläche und Kopfhaut mit Isopropanol desinfiziert. Anschließend konnten die Kopfhaut und die Schädel-

decke mit sterilem Besteck vorsichtig entfernt werden. Das so freigelegte Gehirn wurde mittels eines Spatels in ein vorbereitetes Petri-Schälchen mit kaltem Präparationsmedium (genaue Zusammensetzung siehe Anhang unter Abschnitt 7.2. Medien und diverse Lösungen) überführt. Alle weiteren Schritte erfolgten unter einem Stereomikroskop.

Der frontale Kortex wurde zusammen mit dem Riechkolben durch einen koronaren Schnitt entfernt und das Kleinhirn vom Rest des Gehirns abgetrennt. Durch einen Sagittalschnitt wurden schließlich die beiden Hemisphären voneinander getrennt und in ein neues Petri-Schälchen vorsichtig überführt. Das Umsetzen gewährleistete dabei eine Situation von relativ konstanten reduzierten Temperaturen während der Präparation, was eine optimale Entwicklung der Kulturen begünstigte. Außerdem wurden die beiden Hirn-Hemisphären auch im sterilen Präparationsmedium gespült und dadurch die Anzahl von potentiell infektiösen Mikroorganismen, in Hinsicht auf die lange Haltung der Schnitt-Kulturen, verringert.

Nach dem Entfernen des Mittelhirns wurde der Hippocampus mit dem am temporalen Pol befindlichen entorhinalen Kortex isoliert. Anschließend wurden 300 µm dicke transversale Schnitte (Schema siehe Abb. 3.1 – A) mittels eines Gewebeschniders angefertigt. Mithilfe von zwei Spateln konnten nun die Schnitte mittig auf die mit Präparationsmedium angefeuchtete Kulturmembran aufgelegt werden. Auf jeder Membran befand sich letztendlich jeweils nur ein Schnitt (eine schematische Darstellung siehe Abb. 3.1 – B). Von jedem Hippocampus konnten meist drei Schnitte und somit von einem Tier im Mittel sechs Kulturen gewonnen werden.

3.2.1.3. Kultivierung

Die Membranen mit den angefertigten Schnittkulturen wurden in Falcon™ Multiwell-Zellkulturplatten (6-well) mit 1,2 ml Inkubations-Medium (Rezeptur siehe Anhang Abschnitt 7.2.) überführt und in einem CO₂-Inkubator bei 37° C, 5 % CO₂ und mit einer Luftfeuchtigkeit von 95 % gehalten.

Jeden zweiten Tag erfolgten anschließend eine Begutachtung der Kulturen hinsichtlich der Qualität der Schnitte und möglicher Infektionen und das Auswechseln des Inkubations-Medium. Für die hier durchgeführten Experimente wurden die organotypischen Schnitte 25 bis 35 Tage in Kultur gehalten (Days In Vitro, DIV 25-35), um die Ausreifung der Zellen bzw. der Spines und des Spine Apparates zu gewährleisten.

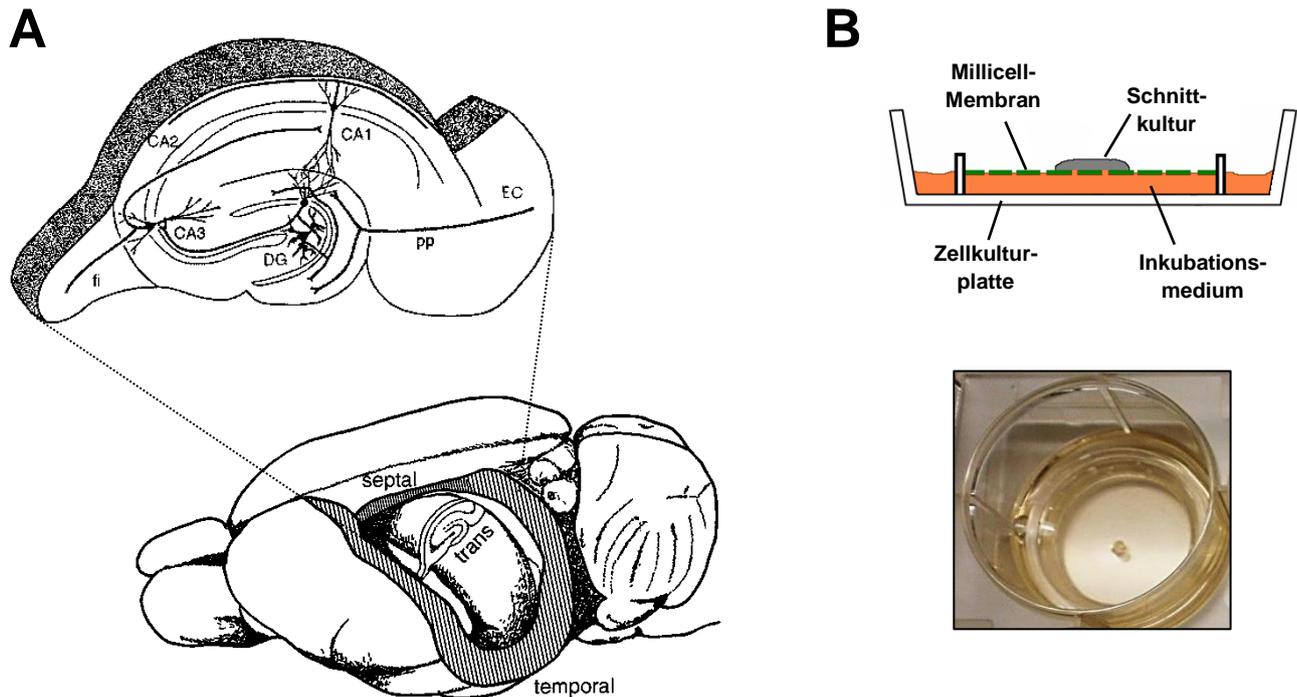


Abb. 3.1: Herstellung einer organotypischen Schnittkultur des Komplexes aus Hippocampus und enthorinalen Kortex; **A** schematische Darstellung der Lage des Hippocampus im Gehirn eines Nagers und der erzeugten transversalen Schnittkulturen, integriert sind die Zellen bzw. Zellbänder der Prinzipalneurone im Hippocampus und ihre jeweiligen Projektionen (modifiziert nach: Andersen et al., *“The Hippocampus Book”*, 2007); **B** Illustration des angewendeten Kultivierungs-Verfahrens, die Gewebe-Kultur liegt dabei auf einer Membran und sollte nicht mit dem Inkubationsmediums bedeckt sein (modifizierte Darstellung der Abb. 1A aus *Stoppini et al.*, 1991), Aufnahme einer frisch präparierten Schnittkultur einer Maus im Alter von P4

fi = Fimbria, CA1-3 = Pyramidenzellbänder, DG = Gyrus Dentatus, pp = Tractus Perforans (perforant pathway), EC = Entorhinaler Kortex

3.2.2. Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die organotypischen Schnittkulturen beider Genotypen (KO und WT) bis zu einem Alter von circa 19-20 Tagen wie oben beschrieben gehalten (DIV 19-20). Nach der Kultivierung konnten die Mooszellen unter dem Mikroskop mittels der Patch-Clamp-Technik (exakte Beschreibung folgt in Abschnitt 2.2.4. Elektro-physiologie) mit einem Farbstoff, in diesem Falle mit 100 μM Alexa Fluor® 488 Dextran, gefüllt werden.

Anschließend erfolgte eine Immersions-Fixierung mit einer 4 %igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (PB), beide Rezepturen sind im Anhang in Abschnitt 7.2. zu finden, für circa 2,5 h bei Raumtemperatur (RT) und über Nacht bei 4° C. Nach mehrmaligem Spülen in 0,1 M PB konnten die fixierten Kulturen mit einem Vibratom auf 50 µm geschnitten werden.

Zuerst wurde eine Vorinkubation der Schnitte mit einer Lösung mit 5 % Normal Goat Serum (NGS) in 0,1 M PB bei RT für eine halbe Stunde durchgeführt. Danach erfolgte die Inkubation in der primären Antikörper-Lösung, bestehend aus 1 % NGS, 0,1 % NaN₃, 0,1 % Triton X-100 und dem Erstantikörper Rabbit-anti-Synaptopodin in einer 1:10.000 Verdünnung (SE-19, Sigma) in 0,1 M PB, über zwei Tage bei 4° C. Die Schnitte wurden nach erneutem mehrmaligen Spülen mit 0,1 M PB mit dem Zweit-Antikörper (Alexa 594 Goat-anti-Rabbit 1:500 in 0,1 M PB) über Nacht ebenfalls bei 4° C inkubiert. Zum Abschluss erfolgte noch eine Markierung der Zellkerne zur besseren Orientierung im Schnitt mit Diamidino-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) mit einer Verdünnung von 1:10.000 in 0,1 M PB (30 min bei RT).

Letztendlich wurden die Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen und mit einem für die Fluoreszenz-Mikroskopie geeigneten Eindeckmediums und einem kleinen Deckglas eingeschlossen.

Die so gefärbten Schnitte, entweder mit oder ohne die markierten Mooszellen, konnten nun mit einem konfokalen Mikroskops (LSM 510, Zeiss) untersucht werden. Dazu wurde hauptsächlich ein Plan-Neofluar 40x/1,3 Öl DIC Objektiv benutzt und es wurden Aufnahmen (Z-Stapel) mit einer Voxel-Größe von 0,12 µm (x,y) und 0,3 µm (z) angefertigt. Aus den so entstandenen Rohdaten wurden mit dem Programm ImageJ Abbildungen der mit Farbstoff gefüllten Mooszellen und der immunhistochemischen Markierung von Synaptopodin erstellt.

3.2.3. Immunogold-Markierung (EM) von Synaptopodin

Die Immunogold-Markierung von Synaptopodin (Synpo) in den Spines bzw. Excrescencen der Mooszellen in organotypischen Schnittkulturen erfolgte vor der Einbettung („Pre-Embedding“) für die Elektronen-Mikroskopie (EM).

Die Fixierung der Wildtyp-Kulturen erfolgte dafür nach 26 Tagen in Kultur (DIV 26) mit einer Fixierlösung für die EM (siehe Abschnitt 7.2. im Anhang unter Fixativ für die EM-Immunzytochemie) über rund 2,5 h bei RT unter mehrmaligen Wechsel der Lösung. Daran schloss

sich eine Postfixierung mit einer 4 %igen PFA-Lösung an (Rezeptur siehe ebenfalls im Anhang unter Abschnitt 7.2.) über Nacht bei 4° C. Nachdem die fixierten Kulturen am darauffolgenden Tag mehrmals mit 0,1 M PB gespült wurden, konnten diese anschließend in kaltem PB mit einem Vibratom auf 50 µm horizontal geschnitten werden.

Eine Vorbehandlung der Schnitte mit einer kryoprotektiven Lösung, bestehend aus 12,5 % Saccharose und 5 % Glycerin in 50 mM PB, erfolgte bei RT für eine halbe Stunde. Anschließend wurden sie überführt in eine weitere 50 mM PB-Lösung mit diesmal 25 % Saccharose und 10 % Glycerin und für 1 h bei RT inkubiert. Die Permeabilisierung der Membran erfolgte durch das Schockfrieren der Schnitte für 2-3 s in Isopentan in flüssigem Stickstoff. Nach einer kurzen Verweildauer in der kryoprotektiven Lösung mit höherem Gehalt an Saccharose und Glycerin erfolgten zwei jeweils 10 minütige Spül-Schritte, zuerst in 50 mM PB und anschließend in einer 50 mM Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS, 0,9 % Natriumchlorid).

Danach erfolgte eine Vorinkubation in einer Blockierungs-Lösung bestehend aus 10 % NGS in 50 mM TBS für eine halbe Stunde bei RT. Mit der Erstantikörper-Lösung, zusammengesetzt aus 2 % NGS in 50 mM TBS und dem Erstantikörper Rabbit-anti-Synaptopodin (SE-19, der gleiche Antikörper wie unter Abschnitt 2.2.3. verwendet) in einer Konzentration von 1:2.000, wurden die Schnitte bei 4° C für zwei Tage inkubiert. Die Schnitte wurden über 40 min mit 50 mM TBS unter mehrmaligem Wechsel der Lösung gespült. Hierauf erfolgte die Inkubation mit einem sekundären *Nanogold*-Antikörper (1,4 nm Gold-konjugiert Goat- anti-Rabbit) in einer Verdünnung von 1:100 bei 4° C über Nacht.

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte bei zweimaligem Wechsel mit 50 mM TBS für 20 min gespült und des Weiteren in eine 25 mM Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) überführt und nochmals 20 min gewaschen. Eine Postfixierung mit 1 % Glutaraldehyd in 25 mM PBS für 10 min bei RT schloss sich an. Das Fixativ wurde durch 25 mM PBS ausgewaschen und anschließend erfolgten zwei weitere Spül-Schritte in Aqua bidest (ddH₂O) für 30 s. Eine Intensivierung der Gold-Nanopartikel mit Silber (HQ Silver TM Enhancement Kit) wurde unter dunklen Bedingungen für eine Dauer von circa 8 min durchgeführt. Anschließend erfolgte nach mehrmaligem Spülen der Schnitte in ddH₂O und zum Schluss in normalen 0,1 M PB eine Nachfixierung mit einer 1 %igen Osmiumtetroxidlösung (OsO₄ in 0,1 M PB) für 35 min bei RT. Nach wiederholtem Waschen in 0,1 M PB und nach 10 minütiger Behandlung mit 50 % Ethanol (EtOH) folgte eine Inkubation mit einer 1 %igen Uranylacetatlösung in 70 % EtOH für 35 min bei RT, um eine Negativkontrastierung der Schnitte zu erhalten. Vor der Flacheinbettung in Durcupan wurden verschiedene Dehydrierungs-Schritte (jeweils 10 min in

90 %, 95 % und zwei Mal in 100 % EtOH) und weiteres Waschen (zwei Mal für jeweils 15 min) in Propylenoxid durchgeführt.

Ultradünn-Schnitte wurden hergestellt und auf Formvar-beschichtete Kupfer-Netzchen (Grids) aufgezogen. Diese konnten letztendlich unter einem Phillips-CM 100 Elektronenmikroskops angeschaut und Aufnahmen der mit Synaptopodin markierten Spine Apparate in komplexen Spines von Mooszellen angefertigt werden.

3.2.4. Elektrophysiologie

Die Schnittkulturen auf den Millicell Membranen wurden zu Beginn eines Experimentes mehrmals in einer künstlichen Nährlösung (ACSF, genaue Zusammensetzung siehe Anhang Abschnitt 7.2.) kurz gespült, um das serumhaltige Inkubations-Medium zu entfernen. Anschließend wurden die Kulturen direkt in eine individuell gefertigte Messkammer des Mikroskops transferiert und mit genau 700 µl ACSF mit MNI-Glutamat (20 mM) bedeckt. Die Begasung der Lösung mit angefeuchtetem Carbogen (5 % CO₂ und 95 % O₂) zur Einstellung des richtigen pH Bereichs erfolgte über zwei integrierte Kanäle im Deckel der Messkammer. Dieser diente auch dazu, die Membran ein wenig unter Spannung zu halten, um Bewegungen der Kultur bzw. der Zellen zu minimieren. Dies ermöglichte im weiteren Verlauf der Experimente einen zumeist konstanten Zugang zu den Zellen (Patch-Clamp-Technik) und stabile Bedingungen für die Abbildungsverfahren (Imaging) und die optische Glutamat-Freisetzung (Uncaging). Eine integrierte Heizung im Deckel erwärmte außerdem das ACSF auf eine Temperatur von circa 33° bis 34° C, die über das gesamte Experiment automatisch aufgezeichnet und geregelt wurde. Bei dieser Temperatur erfolgten auch alle experimentellen Messungen. Um die Verdunstung von Wasser auszugleichen und eine konstante Osmolarität des ACSFs zu gewährleisten, wurde mittels einer Peristaltischen Pumpe gleichmäßig Wasser mit einer Rate von ungefähr 3,2 µl pro Minute zugeführt.

Die großen Somata der Mooszellen im Hilus des Gyrus dentatus (Hilar Mossy Cells) wurden mit Hilfe der Infrarot (IR) Gradientenkontrast-Mikroskopie (*Dodt und Zieglängsberger, 1994*) über eine CCD-Kamera identifiziert und aufgenommen (Beispielbild siehe Abb. 3.2). Für die Experimente wurden meist Mooszellen im Hilus am suprapyramidalen Blatt der Körnerzellen nah des Zellbandes ausgewählt.

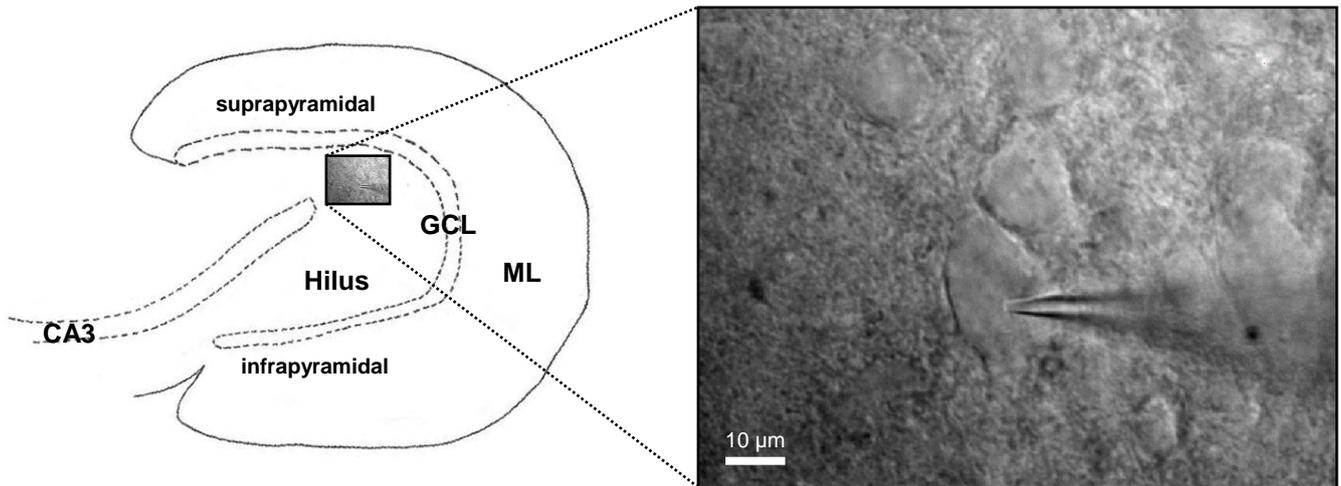


Abb. 3.2: Abbildung einer lebenden Mooszelle in einer organotypischen Schnittkultur; Schematischer Aufbau des DG (adaptiert aus *Andersen et al., 2007*) mit vergrößertem Ausschnitt aus dem Hilus; Aufnahme mittels IR-Gradientenkontrast-Mikroskopie (*Dodt und Zieglgänsberger, 1994*); In der Mitte ist der große Zellkörper einer Mooszelle (WT, P5, DIV 27) nach erfolgreichem Patchen mit der Pipette zu sehen. Weiterhin erkennbar sind kleinere Somata anderer Zellen und das diffus aussehende Neuropil. GCL – Körnerzellband, ML – Molekularschicht, CA3 - Pyramidenzellband

Um die elektrophysiologischen Signale der Mooszellen aufzunehmen, wurde ein Zugang in der „Whole-Cell“ Konfiguration zu den Zell-Somata mittels der Patch-Clamp-Technik hergestellt. Dabei wurden Pipetten aus Borosilikat-Glaskapillaren verwendet, die mit einem Elektrodenziehgerät hergestellt wurden. Die Patch-Pipetten hatten dabei im Schnitt einen Widerstand von 6 bis 11 M Ω . Um eine Stabilität der Messungen über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten, wurde ein kleiner piezo-getriebener Mikromanipulator verwendet. Die Elektrodenspitze wurde bei allen Experimenten mit einer farbstofffreien intrazellulären Lösung (Rezeptur siehe im Anhang Abschnitt 7.2.) gefüllt, um während des Patchens (bis zur Seal-Bildung) eine starke Hintergrundfärbung im Schnitt zu vermeiden.

Jeweils vor Beginn und nach Beendigung der Experimente (vor erster Testpulsreihe und nach dem Potenzierungsprotokoll) wurden das Ruhemembranpotential und der Serienwiderstand der Zelle gemessen. Das Membranpotential lag direkt nach dem Patchen meist zwischen -55 bis -65 mV. Für die Messungen in der Voltage-Clamp-Konfiguration (VC) wurden die Zellen bei einer Spannung von ungefähr -60 mV geklemmt. In der Current-Clamp-Konfiguration (CC) wurde bei Bedarf ein konstanter Strom in die Zelle injiziert, um das Membranpotential bei rund -60 mV zu halten. Für beide Bedingungen galt, dass bei einer Strominjektion von mehr als -150 pA oder wenn das Potential bei -40 mV lag, die Messungen abgebrochen wurden. Der Serienwiderstand erreichte zu Beginn Werte zwischen 10 M Ω und

30 M Ω . Ab einem Widerstand von mehr als 30 M Ω wurden die Experimente sofort abgebrochen bzw. die Zellen in der Auswertung verworfen.

Für die Serie der in die Spines zurück propagierenden Aktionspotentiale (bAPs) wurden über die Patch-Pipette kurze somatische Ströme (1-2 ms, 1,5 nA) appliziert, entweder 15 Pulse mit einer Frequenz von 50 Hz oder 24 Pulse mit 25 Hz. Konnten keine APs ausgelöst oder Kalzium-Transienten gemessen werden, erfolgte ebenfalls ein Abbruch der Experimente.

Für die Kontrolle des Patch-Clamp-Verstärkers (ELC-03XS) sowie die zeitliche Koordinierung der Strominjektionen wurde ein in der Gruppe eigens entwickeltes Aufnahme-Programm, entworfen in der Entwicklungsumgebung von LabView, verwendet. Die elektro-physiologischen Daten wurden ebenfalls durch dieses Programm erfasst und bei 100 kHz digitalisiert und gespeichert unter Nutzung der Computersteckkarte NI PCI-6251.

3.2.5. Abbildungsverfahren (Imaging)

Die Messkammer wurde in ein individuell gefertigtes Zwei-Photon-Laser-Scanning Mikroskop integriert, basierend auf einem BX50WI Mikroskop und einer FluoView 300 Scanning Einheit.

Um die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen sichtbar zu machen (Calcium-Imaging), wurde der grüne Kalzium-sensitive Farbstoff Fluo-5F Pentakaliumsalz mit einer Konzentration von 200 μ M verwendet. Dieser Kalzium-Farbstoff besitzt eine mäßige Affinität für Kalzium mit einer Dissoziationskonstante K_d im Puffer von rund 2,3 μ M (laut Katalogangabe Molecular Probes) und ist somit für die Detektion von Kalzium-Konzentrationen bis zu wenigen μ M geeignet (Yasuda *et al.*, 2004). Allerdings ändert sich die K_d des Indikators und somit die Affinität für Kalzium in Abhängigkeit von der vorherrschenden Temperatur während der Messungen *in vitro* (siehe dazu Woodruff *et al.*, 2002) und kann somit nicht exakt für die hier durchgeführten Experimente angegeben werden. Als zweiter Farbstoff mit einer roten Fluoreszenz wurde 100 μ M Alexa Fluor® 594 Dextran (10.000 MW, anionisch und fixierbar) für die Zellmorphologie verwendet. Es wurde an jedem Experiment-Tag ein frischer Farbstoff-Ansatz verwendet (siehe dazu im Anhang Punkt 7.2.).

Zur Zwei-Photonen-Anregung der beiden Farbstoffe diente ein modengekoppelter Titan:Saphir (Ti:Sa) Laser mit einer Pulswiederholrate von 1 GHz, einer Pulsweite von mehreren hundert Femtosekunden auf der Fokusebene und einer spektralen Halbwertsbreite von rund 30 nm (GigaJet 20C). Bei allen durchgeführten Experimenten erfolgten die Aufnahmen der Zellmorphologie sowie der Kalzium-Transienten immer bei einer Wellenlänge

von circa 805 nm. Der Ti:Sa-Laser wurde dabei durch einen Neodym-dotierten Yttrium-Vanadat Festkörperlaser (kurz Nd:YVO₄, Verdi V5) bei 532 nm optisch gepumpt.

Der Laser-Strahl wurde im Verlauf zum Mikroskop mit einem Teleskop auf etwa das Zweifache der hinteren Eintritts-Pupille des verwendeten Wasserimmersions-Objektivs (100x, NA 1.0, LUMPFL) aufgeweitet, um eine maximale räumliche Auflösung zu erhalten.

Da die Zwei-Photonen-Anregung direkt zu einer auf den Focus beschränkten Fluoreszenz führt und sich somit im Gegensatz zur Ein-Photonen-Anregung der hier notwendige räumliche Filter (Lochblende oder auch „pinhole“) und somit auch die Rückführung des Fluoreszenzlichtes über die Scanspiegel erübrigt, kann alles (auch am Gewebe gestreutes) Licht aus dem Präparat in alle Richtungen detektiert werden. Diese sogenannte non-descanned Detektion erhöht dramatisch die Detektions-Effizienz insbesondere bei stark streuenden Geweben und ist ein wesentliches Argument für die Anwendung der Zwei-Photonen-Mikroskopie. Die emittierte Fluoreszenz der Farbstoffe wurde durch einen dichromatischen Spiegel (680 DCXXR) direkt über dem Objektiv abgelenkt. Nach dem Passieren eines farbigen Bandpass-Glasfilters (2 mm mit anti-reflektierender Beschichtung, BG39) und eines HQ 510/80 Filters wurde das grüne Licht von einer bikonvexen-asphärischen Linse (fokale Länge: 29,5 mm) auf einen Photomultiplier (PMT, Type R3896) fokussiert („grüner Epikanal“). Das abgegebene Fluoreszenz-Licht wurde außerdem durch einen Ölimmersion-Kondensator (BX-UCDB-2) gesammelt und anschließend durch einen dichromatischen Spiegel (560 DCXR) hinter einem IR-blockierenden Kurzpassfilter (HC-2P Emitter 680/SP) geteilt. Nach dem Passieren entsprechender Bandpassfilter (HQ 510/80 für den „grünen Transkanal“ und HQ 610/75 für den „roten Transkanal“) wurde das Fluoreszenz-Licht schließlich auf zwei PMTs fokussiert und detektiert, wie bereits für den „grünen Epikanal“ beschrieben. Die emittierte Fluoreszenz der beiden Farbstoffe wurde wie beschrieben simultan detektiert und aufgezeichnet. Für die Analyse der Kalzium-Signale (siehe Abschnitt 3.2.8.) wurden die zwei grünen Kanäle (Epi und Trans) summiert.

Die verstärkten PMT-Ausgangssignale für die quantitative Auswertung der verwendeten punktuellen Abtastungen (Point-Scans) wurden bei 2,5 MHz über das Multifunktions-Datenerfassungsmodul NI PCI-6132 (National Instruments) digitalisiert. Das Scannen kontrollierte dabei die FluoView Software (Version 4.2, Olympus) und die zeitliche Koordinierung und Datenerfassung erfolgte mit dem selbst entwickelten Programm unter LabView (siehe Datenerfassung Elektrophysiologie).

Es wurden Punkt-Scans anstatt Linien-Scans verwendet, um eine maximale zeitliche Auflösung zu erhalten und größere Zeitverzögerungen innerhalb der Messungen zu verhindern. Das bedeutet, dass ein unnötiger Aufenthalt des Laserstrahls in nicht

interessierenden Bereichen, wie z.B. das den Spine umgebende Neuropil, und Verschwendung von wertvoller Lichtsammel-Zeit entfällt. Dadurch war es nicht nötig den Durchschnitt aus mehreren Mess-Wiederholungen eines einzelnen Experimentes zu berechnen, sondern es konnten individuelle Ereignisse bzw. Kalzium-Transienten ausgewertet werden. Die Messung erfolgte dabei immer zentral im Zytoplasma des Spine-Kopfes (ein Beispiel dafür ist in der Ausschnitts-Vergrößerung einer Mooszelle in Abb. 3.3 zu sehen).

Die Aufzeichnung der PMT-Signale erfolgte über einen Zeitraum von zwei Sekunden. Dabei war der Laser-Strahl in den ersten und letzten 100 ms durch eine mechanische Blende (Shutter) geblockt und die eigentliche Fluoreszenz wurde nur für 1,8 s aufgenommen.

Eine Übersichtsaufnahme (Voxelgröße $x-y = 0,138 \mu\text{m}$ und $z = 0,5 \mu\text{m}$) der lebenden Mooszelle und eine Detaildarstellung (Voxelgröße $x-y = 0,055 \mu\text{m}$ und $z = 0,25 \mu\text{m}$) des gemessenen Spines wurde mit dem Programm FluoView erstellt und bearbeitet. Ein Beispiel einer aufgenommenen Mooszelle und des dazugehörigen erfolgreich gemessenen Spines ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

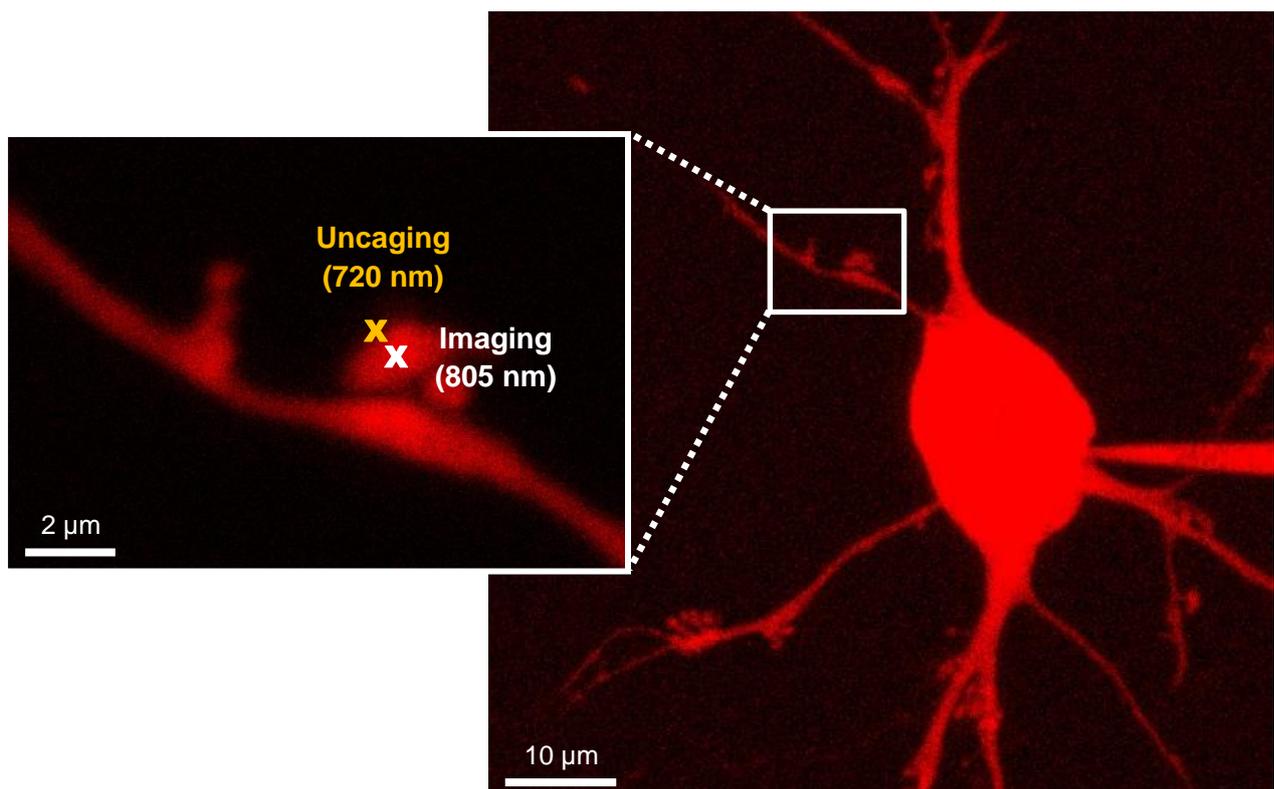


Abb. 3.3: Aufnahme einer lebenden Mooszelle in einer organotypischen Schnittkultur mittels der Zwei-Photonen-Mikroskopie; gleiche Zelle wie in der IR-Aufnahme in Abb. 3.2; typische Mooszelle mit großem multipolaren Zellkörper mit Excrescenzen an den proximalen Dendriten (WT, DIV 27); gefüllt mit Alexa 594 Dextran ($100 \mu\text{M}$) mittels der Patch-Clamp-Technik; Patch-Pipette rechts am Soma zu erkennen; Ausschnitts-Vergrößerung eines großen Spines mit der Markierung des Punkt-Scans für die optische Glutamat-Freisetzung an der Synapse (Uncaging mit MIRA bei 720 nm) und das Kalzium-Imaging im Spine (GigaJet bei 805 nm).

3.2.6. Glutamat-Uncaging

Für die optischen Glutamat-Freisetzung (Uncaging) wurde das 4-Methoxy-7-nitroindoliny (MNI)-gebundenes Glutamat (für die Zwei-Photonen-Mikroskopie entwickelt und beschrieben von *Matsuzaki et al., 2005*) in ACSF gelöst und in einer Konzentration von 20 mM für alle Experimente verwendet. Die allgemeine Funktionsweise und Anwendung des MNI-Glutamats ist in Abb. 3.4 dargestellt.

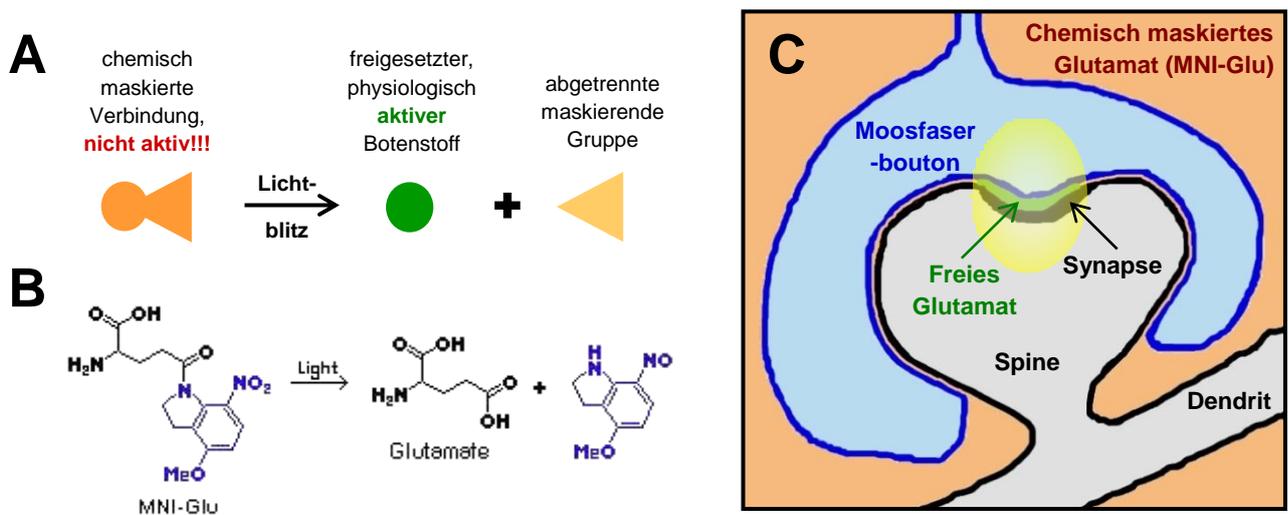


Abb. 3.4: Allgemeines Funktionsprinzip der optischen Freisetzung (Uncaging) von chemisch maskierten Neurotransmittern; **(A)** schematische Darstellung der optischen Freisetzung eines Neurotransmitters; dabei wird aus einer nicht aktiven, gebundenen, chemischen Verbindung durch einen kurzen Lichtpuls ein physiologisch-aktiver Botenstoff freigesetzt; **(B)** chemische Formel und Reaktion des in diesen Experimenten verwendeten MNI-Glutamats nach *Ellis-Davies, 2007* (siehe dazu Abbildung 2b); **(C)** Illustration des Glutamat-Uncagings an einer einzelnen Moosfaser-Synapse eines Spines, lokale Freisetzung durch einen Punkt-Scan (gelbe Ellipse entspricht der Punktspreizfunktion = PSF des Punkt-Scans) nur im Synaptischen Spalt.

Für das Uncaging wurde ein zweiter modengekoppelter Ti:Sa-Laser (MIRA Optima 900) bei einer Wellenlänge von 720 nm betrieben. Dieser wurde ebenfalls durch einen Nd:YVO4 Festkörperlaser (Verdi V10) optisch gepumpt.

Die Freisetzung des Glutamats erfolgte immer 400 ms nach Beginn der elektro-physiologischen sowie Fluoreszenz-Aufnahmen durch einen kurzen Laser-Puls (oder durch eine Abfolge von 24 Pulsen mit einer Frequenz von 25 Hz bei der Potenzierung). Die hierbei verwendete Pulsdauer von 0,5 ms wurde durch einen elektro-optischen Modulator erzeugt.

Für das Uncaging wurden ebenfalls Punkt-Scans verwendet, die an der Oberfläche der Spines positioniert wurden. Von wesentlicher Bedeutung dabei war die exakte Lage des Scan-Punktes, da die Synapse genau getroffen werden musste, um erfolgreich Signale zu induzieren. Da in den Übersichtsaufnahmen der lebenden Zellen die Synapsen nicht markiert waren, wurde deren Position am Spinekopf abgeschätzt. Sehr häufig resultierte ein erfolgreiches Uncaging, wenn der Punkt-Scan in Einbuchtungen der Spines platziert wurde. Eine schematische Darstellung ist in Abb. 3.4 zu finden und Abb. 3.3 zeigt in der Ausschnittsvergrößerung einen Spine mit der Markierung des Punkt-Scans, an dem ein erfolgreiches Uncaging stattfand.

Es wurde eine Serie von sechs Einzel-Ereignissen an einem individuellen Spine bzw. einer einzelnen Synapse ausgelöst und die jeweiligen resultierenden Reaktionen darauf aufgezeichnet. Dabei stieg mit jeder Wiederholung des Experiments die Laser-Leistung an, beginnend mit 10,0 mW über 13,23 mW, 15,81 mW, 18,03 mW, 20,0 mW zu maximal 21,79 mW. Aufgrund der quadratischen Abhängigkeit des Zwei-Photonen-induzierten Effektes zu der Intensität des Lichts resultierte aus dieser Leistungs-Reihe ein erwarteter linearer Anstieg der freigesetzten Glutamat-Menge. Die Laser-Leistungen wurden dabei durch einen elektro-optischen Modulator genau reguliert. Für die verwendeten Uncaging-Stufen wurde im Vorfeld die exakte Leistung des Lasers direkt nach dem Objektiv bestimmt.

Das Uncaging-Protokoll wurde für die Einzel-Ereignisse zuerst im Voltage-Clamp- und anschließend im Current-Clamp-Modus durchlaufen, um die resultierenden exzitatorischen postsynaptischen Ströme (uEPSCs) bzw. die Potentiale (uEPSPs) zu bestimmen. Die Messung der elektrophysiologischen Ereignisse erfolgte am Soma über die Patch-Pipette und gleichzeitig wurde die dazugehörige Veränderung der Kalziumkonzentration in dem angeregten Spine beobachtet.

Ein modifiziertes Stimulations-Protokoll wurde im Anschluss an die erfolgreich induzierten Einzelsignale und die beiden Aktionspotential-Serien (15 und 24 bAPs) im CC-Modus durchgeführt. Adaptiert wurde dieses Protokoll von den Experimenten von *Kwon und Castillo, 2008*, die durch eine niederfrequente Stimulation eine NMDA-Rezeptor-abhängige postsynaptische Langzeitpotenzierung (LTP) an der Moosfaser-Synapse induzieren konnten. Eine Abfolge von 24 einzeln induzierten EPSPs mit einer Frequenz von 25 Hz wurde durch das Glutamat-Uncaging bei einer konstanten Laser-Leistung von 20,00 mW und einer Pulsdauer von 0,5 ms erzeugt. Diese uEPSPs wurden mit 24 bAPs mit 25 Hz, ausgelöst durch Strominjektion im Soma (wie bereits im Abschnitt über die Elektrophysiologie beschrieben), kombiniert. Dabei folgten die ausgelösten Aktionspotentiale mit einer Zeitverzögerung von 10 ms auf die Uncaging-Ereignisse. Das Zeitintervall von 10 ms zwischen der synaptischen

Aktivität und den Aktionspotentialen wurde gewählt, um eine Potenzierung auszulösen, wie bei den Experimenten von *Astori et al. (2010)* an der Moosfaser-Synapse in CA3 Pyramidenzellen.

Alle Experimente wurden abgebrochen, wenn die basale „grüne“ Fluoreszenz (summierte Kalzium-Kanäle) deutlich anstieg als Anzeichen für Photo-Toxizität (*Koester et al., 1998*) oder wenn, wie bereits erwähnt, eine Verschlechterung des Membranpotentials oder des Eingangswiderstands beobachtet wurde.

Alle experimentellen zeitlichen Abläufe, sowie die Steuerung des EOMs für Puls-Leistung und -Dauer, wurden über den Computer und das bereits erwähnte Aufnahme-Programm unter LabView gesteuert.

3.2.7. Pharmakologie

Um die beteiligten Komponenten an den elektrophysiologischen Signalen genauer zu analysieren, wurden in Kontroll-Versuchen zwei verschiedene Blocker der postsynaptischen ionotropen Glutamat-Rezeptoren verwendet.

In einem Set an Experimenten wurde zusätzlich zu dem MNI-Glutamat (20 mM) dem ACSF noch 200 μ M 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (APV) zugegeben. Bereits in einer geringen Konzentration wirkt dieser kompetitive und selektive Antagonist hemmend auf die NMDA-Rezeptoren.

Einer weiteren Versuchsgruppe wurde der kompetitive Antagonist 6-Cyano-7-nitrochinoxalin-2,3-dion (kurz CNQX) mit einer Konzentration von 20 μ M verwendet, um die AMPA- und Kainat-Rezeptoren zu blockieren.

Unter beiden Kontroll-Bedingungen (APV und CNQX) wurden exakt die gleichen Experimente mit derselben Abfolge, wie für die Normalbedingung (nur MNI-Glutamat im ACSF) bereits beschrieben, durchgeführt und die entsprechenden Antworten aufgezeichnet.

3.2.8. Schematischer allgemeiner Versuchsablauf:

Patchen der Mooszelle

- Verteilung der Farbstoffe für circa 15 min
- Übersichtsaufnahme des zu messenden Spines
- Bestimmung Serienwiderstand und RMP der Zelle

Induzierte Einzel-Signale im VC-Modus (uEPSCs)

- Uncaging mit steigender Laser-Leistung und Pulsdauer von 0,5 ms:
10,00 mW - 13,23 mW - 15,81 mW - 18,03 mW - 20,0 mW - 21,79 mW
- Aufzeichnung der resultierenden elektrophysiologischen Antworten und Kalzium-Signale

Induzierte Einzel-Signale im CC-Modus (uEPSPs)

- Uncaging mit steigender Laser-Leistung und Pulsdauer von 0,5 ms:
10,00 mW - 13,23 mW - 15,81 mW - 18,03 mW - 20,0 mW - 21,79 mW
- Aufzeichnung der resultierenden elektrophysiologischen Antworten und Kalzium-Signale

Serie von 15 bAPs mit 50 Hz

- Strominjektion im Soma (1-2 ms, 1,5 nA)
- Aufzeichnung der resultierenden elektrophysiologischen Antworten und Kalzium-Signale

Serie von 24 bAPs mit 25 Hz

- Strominjektion im Soma (1-2 ms, 1,5 nA)
- Aufzeichnung der resultierenden elektrophysiologischen Antworten und Kalzium-Signale

Stimulations-Protokoll:

24 uEPSPs (25 Hz) kombiniert mit 24 bAPs (25 Hz)

- Uncaging mit konstanter Laser-Leistung von 20,00 mW und Pulsdauer von 0,5 ms
- Strominjektion im Soma (1-2 ms, 1,5 nA) mit einer Zeitverzögerung von 10 ms
- Aufzeichnung der resultierenden elektrophysiologischen Antworten und Kalzium-Signale

Experiment-Ende

- Bestimmung Serienwiderstand und RMP der Zelle
- Übersichtsaufnahme der Zelle und des gemessenen Spines

3.2.9. Datenanalyse

Das benutzte Programm zum automatischen Auswerten der gesammelten Daten, sowohl elektrophysiologische als auch die Fluoreszenz-Signale der Veränderung der Kalzium-Konzentrationen, wurde ebenfalls in LabView erstellt. Die graphische Aufbereitung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte hauptsächlich mit dem Programm Excel (Microsoft Office 1997 - 2003).

Die Induktion der exzitatorischen postsynaptischen Ereignisse (uEPSCs und uEPSPs) mittels der Methode des Glutamat-Uncagings erfolgte immer 400 ms nach Beginn der Aufzeichnungen und konnte dadurch leicht detektiert werden. Um eine Verringerung des Rauschens der Signale innerhalb der aufgezeichneten Rohdaten (gefiltert bei 5 kHz durch den Verstärker) zu erhalten, wurde zunächst eine Regressions-Routine angewandt, die steile Anstiege weitgehend erhält (*Scheipl und Kneib, 2009*). Aus diesen Daten konnten anschließend die maximale Amplituden und die 20 % - 80 % Anstiegsraten der Einzel-Signale bestimmt werden. Anschließend wurde von diesen Werten für jede der sechs Uncaging-Stufen der Mittelwert getrennt nach dem Genotyp (Wildtyp oder Synaptopodin Knock-out) und der Standard-Fehler (SEM) und die Standard-Abweichung (SD) berechnet. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde nur der SEM verwendet. Für die Abbildung eines beispielhaften durchschnittlichen exzitatorischen postsynaptischen Ereignisses (EPSE) beider Genotypen wurden jeweils die induzierten Signale in der höchsten Leistungs-Stufe von 21,79 mW genutzt. Eine exemplarische mittlere elektrophysiologische Kurve wurde ebenfalls für die beiden Aktionspotential-Serien und für das Stimulations-Protokoll zur Induktion der NMDA-Rezeptor-abhängigen Potenzierungen erstellt.

Zur Analyse der Fluoreszenz-Signale bzw. der Kalzium-Transienten wurde wie folgt verfahren. Zu Beginn wurde vor jedem Experiment die Hintergrund-Fluoreszenz im Gewebe außerhalb der mittels Farbstoff gefüllten Zelle gemessen. Anschließend wurden die einzelnen Experimente durchgeführt und jeweils die Fluoreszenz-Signale der drei PMTs (roter Transkanal, grüner Epi- und Transkanal) über zwei Sekunden aufgezeichnet. Die beiden grünen Kanäle wurden für die Analyse schließlich summiert. Am Anfang der Messung war die Laserblende (Shutter) des Gigajets für 100 ms geschlossen, um zusätzlich den Dunkelstrom der PMTs zu bestimmen. Außerdem wurde die Blende 100 ms vor Beendigung der Messung geschlossen, so dass die eigentliche Bestimmung der Fluoreszenz-Signale nur über einen Zeitraum von 1,8 s erfolgte. Die Basislinie der grünen Fluoreszenz bzw. des basalen Kalziumlevels in dem jeweiligen Spine (Grün_{Basal}) wurde aus circa 200 ms vor dem Uncaging-

Ereignis oder der Abfolge der bAP, die immer bei 400 ms nach Beginn der Aufzeichnung ausgelöst wurden, bestimmt. Die allgemeine Bestimmung der grünen Basal-Fluoreszenz aus den aufgezeichneten Rohdaten der PMTs ist für ein Beispiel in Abbildung 3.5 veranschaulicht. Die Festlegung der durchschnittlichen Fluoreszenz für den roten morphologischen Farbstoff (Rot) erfolgte über die gesamten 1,8 Sekunden der Messung.

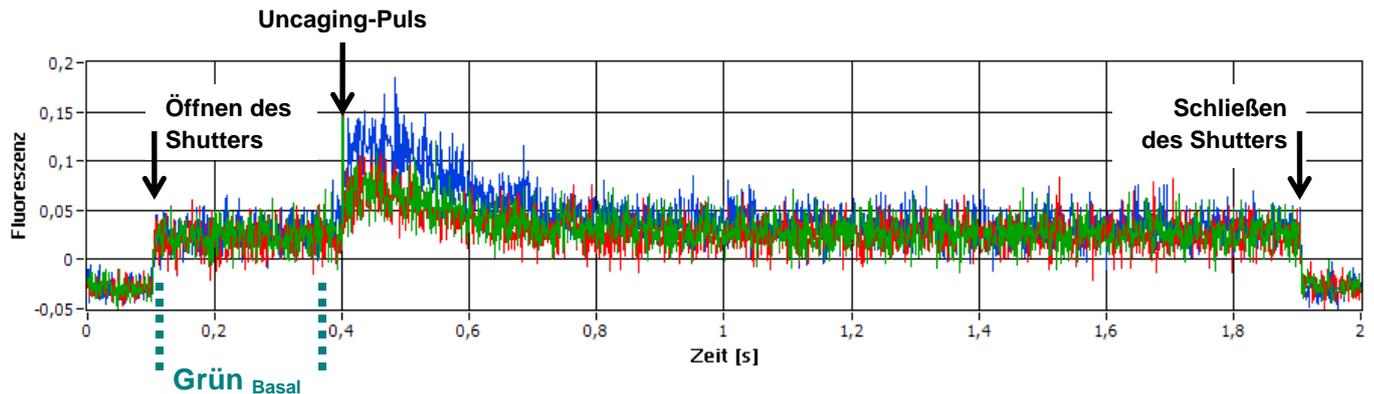


Abb. 3.5: Bestimmung der basalen grünen Fluoreszenz aus den Aufnahmen der Kalzium-Transienten; Rohdaten der summierten Signale des grünen Epi- und Transkanals; vor dem Öffnen der Laserblende (Shutter) bei 0,1 s oder nach dem Schließen bei 1,9 s konnte der Dunkelstrom der PMTs bestimmt werden; das Fluoreszenz-Signal wurde somit über einen Zeitraum von 1,8 s aufgezeichnet; bei 0,4 s wurde immer das Uncaging-Ereignis durch einen kurzen Laser-Puls (0,5 ms) ausgelöst; aus dem circa 300 ms langen Signal vor dem Puls konnte die grüne Basal-Fluoreszenz (**Grün Basal**) bestimmt werden.

Die Berechnung der relativen Änderung der Fluoreszenzen bzw. Kalzium-Konzentrationen $\Delta [\text{Ca}^{2+}]$ erfolgte nach *Yasuda et al. (2004)*. Nach Subtraktion der jeweiligen Hintergrund-Fluoreszenz wurde die aktuelle grüne Fluoreszenz (Grün) minus basaler grüner Fluoreszenz ($\text{Grün}_{\text{Basal}}$) durch die durchschnittliche rote Fluoreszenz (Rot) geteilt. Es ergibt sich folgende Gleichung:

$$\Delta [\text{Ca}^{2+}] = (\text{Grün} - \text{Grün}_{\text{Basal}}) / (\text{Rot})$$

oder kurz:

$$\Delta [\text{Ca}^{2+}] = \Delta \text{G} / \text{R}$$

Die so ermittelten Kurven wurden an eine Modellfunktion angepasst (im Englischen „Fit“), der die Annahme zugrunde liegt, dass es eine konstante Einstromrate (k_{in}) während der Anstiegsphase (t_{in}) des Kalzium-Transienten gibt und eine Extrusionsrate (k_{ex}), die zur aktuellen Kalzium-Konzentration proportional ist:

$$\text{Anstieg: } Y(t) = (k_{in} / k_{ex}) * (1 - \exp(-k_{ex} * t)) \quad | : t < t_{in}$$

$$\text{Abfall: } Y(t) = Y(t_{in}) * \exp(-k_{ex} * (t - t_{in})) \quad | : t > t_{in}$$

wobei (k_{in} / k_{ex}) die Amplitude des Gleichgewichtszustandes zwischen Einstrom und Extrusion darstellt und $Y(t_{in})$ den Höchstwert der Amplitude repräsentiert, die am Ende der Einstromphase erreicht wird (siehe Vorlesungs-Manuskript von Prof. M. Sernetz und Mitarbeiter mit dem Titel „Pharmakokinetik und Wachstumskinetik“, Ausgabe 2000).

Für die so berechneten Kalzium-Transienten aller Experimente wurden folgende Parameter bestimmt: maximale Amplitude Kalzium $\Delta G/R$, Einstromrate k_i Kalzium $[\Delta G/R]/s$ und Ausstromrate k_e Kalzium $[\Delta G/R]/s$. Für diese Parameter erfolgte, wie bereits für die elektrophysiologischen Ergebnisse beschrieben, die Bestimmung der Mittelwerte und der SEM und die SD in den jeweiligen Uncaging-Stufen getrennt nach dem Genotyp und die graphische Darstellung der Ergebnisse. Der prozentuale Anteil der Spines bzw. Synapsen, die auf einen Uncaging-Puls zusätzlich zu der elektrophysiologischen auch eine Kalzium-Antwort zeigten, wurde ebenfalls bestimmt. Zu Grunde dafür lagen die Gesamtzahl der Spines mit einem erfolgreich induzierten Strom oder Potential und die Anzahl der Spines mit einem Kalzium-Transienten.

Für den statistischen Vergleich aller Parameter zwischen den beiden Genotypen wurde ein generalisierter „Wilcoxon, Mann und Whitney“-Test oder auch kurz U-Test auf der Ebene der einzelnen Spines verwendet. Der U-Test findet Anwendung bei zwei unabhängigen Stichproben bei nicht normalverteilten Werten (*Ramm und Hofmann „Biomathematik“, 1987*). Die Generalisierung für unterschiedliche Standardabweichungen und Stichprobengrößen erfolgte nach *Neuhäuser und Ruxton (2009)*. Das Signifikanz-Niveau wurde dabei auf $\alpha = 0,05$ festgelegt und die jeweiligen signifikanten Werte mit einem Sternchen markiert (*). Da an denselben Spines viele Hypothesen simultan getestet wurden, bestand eine nicht zu ignorierende Wahrscheinlichkeit, zufällig einige falsch signifikante Ergebnisse zu erhalten („false discovery rate“, FDR). Um die FDR zu kontrollieren, wurden entsprechend der Methode von *Benjamini und Hochberg (Benjamini und Hochberg, 1995; Benjamini und Yekutieli, 2001)* die jeweils betroffenen einzelnen p-Werte angepasst.

4. ERGEBNISSE

4.1. Immunhistochemische Färbungen

Von vier bis fünf Tagen (P4-5) alten Wildtyp und Synaptopodin Knock-out Mäusen (WT bzw. KO) wurden nach der Methode von *Stoppini et al. (1991)* organotypische Schnittkulturen vom Hippocampus und enthorinalen Kortex hergestellt. Nach 19- bzw. 20-tägiger Kultivierung (DIV 19-20) wurden die Schnitte in die Messkammer im Mikroskop platziert und mit einer künstlichen Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF-Lösung, mit Carbogen begast) durch eine kontinuierliche Perfusion versorgt.

Durch die Patch-Clamp-Technik konnte anschließend über die Pipette ein Fluoreszenz-Farbstoff (Alexa Fluor® 488 Dextran, 10.000 MW, 100 µM) in die Mooszelle eingebracht werden. Nach den Experimenten erfolgte eine Fixierung (4 %iges PFA) der Kulturen und eine immunhistochemische Färbung gegen Synaptopodin (Synpo). Dazu wurde der Erstantikörper Rabbit-anti-Synaptopodin in einer 1:10.000 Verdünnung (SE-19, Sigma) und der Zweitantikörper Alexa 594 Goat-anti-Rabbit 1:500 verwendet. Zur Orientierung innerhalb der Schnitte wurden zusätzlich alle Zellkerne mit DAPI (Konzentration von 1:10.000) markiert.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen sind in den Abbildungen 4.1 und 4.2 dargestellt. Dabei zeigt die Abb. 4.1 jeweils eine Übersichtsaufnahmen beider Genotypen über einen großen Bereich der Kulturen, allerdings ohne eine mit Farbstoff gefüllte Mooszelle. In der Synpo-KO konnte keine spezifische Markierung festgestellt werden (siehe Abb. 4.1 unter A). Im WT hingegen war eine deutliche punktuelle Färbung (Überblick in Abb. 4.1 in B) zu finden, die besonders ausgeprägt im Stratum oriens und im Stratum lucidum von CA3 und im Hilus des Gyrus dentatus war (siehe Ausschnitts-Vergrößerung in Abb. 4.1 in C und D). Eine solche punktförmige Färbung von Synaptopodin fanden bereits *Deller et al. (2000)* in der Ratte. In dieser Untersuchung konnte ebenfalls eine besonders starke Synpo-positiv Markierung im Bereich des Stratum lucidum von CA3 in Form von größeren Punkten festgestellt werden. Allerdings zeigte der Hilus im Gegensatz zu den hier durchgeführten Färbungen nur eine geringe Anzahl der punktförmigen Markierungen. Diese Abweichung ist möglicherweise zurückzuführen auf die unterschiedlichen Versuchstiere (Maus vs. Ratte) und untersuchten Abschnitte des Hippocampus.

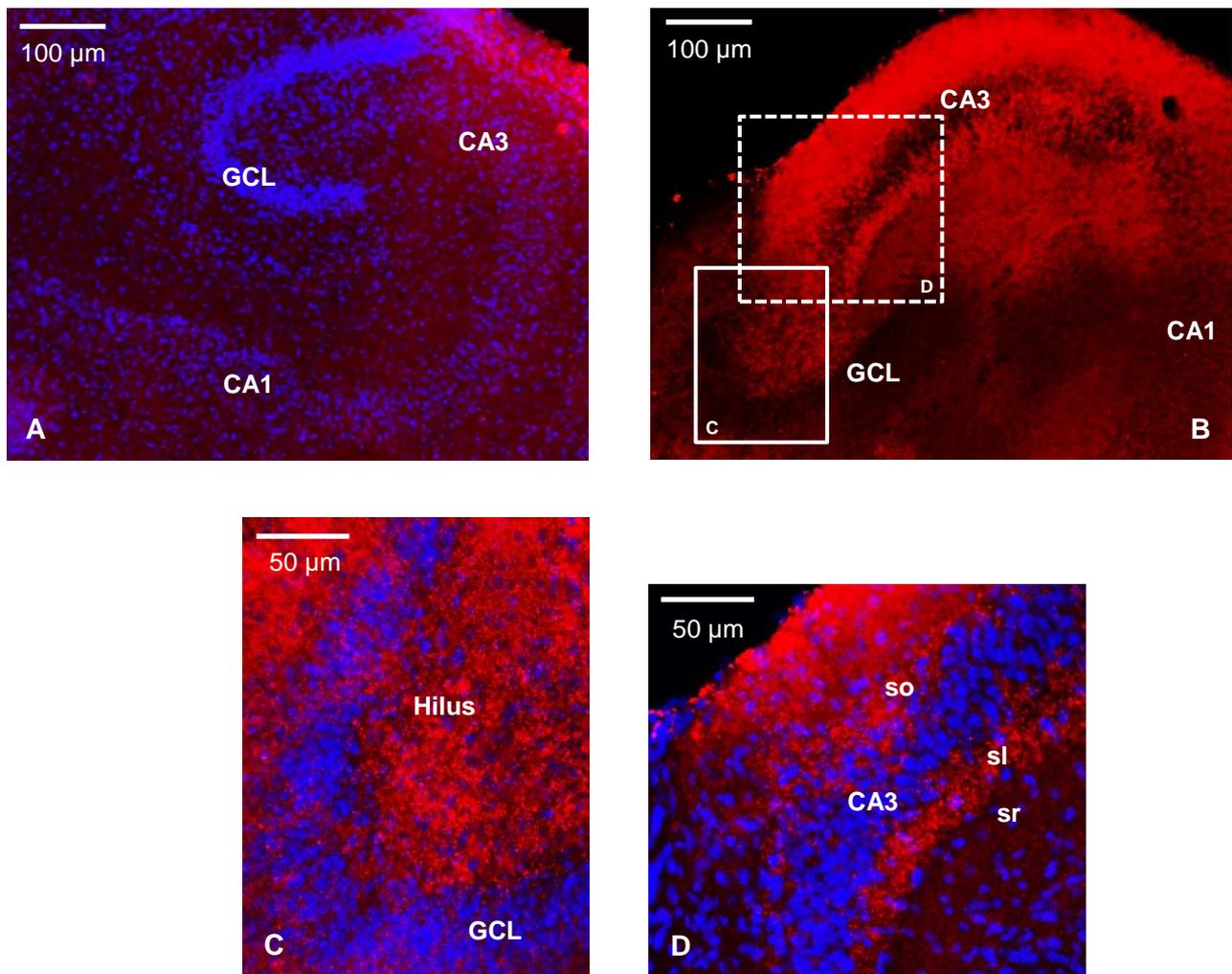


Abb. 4.1: Immunhistochemische Färbung gegen Synaptopodin (Synpo) in organotypischen Schnittkulturen (DIV 19-20) vom Komplex aus Hippokampus und enthorinalem Kortex; **(A)** Aufnahme einer Knock-out Kultur mit negativer Synpo-Färbung und Zellkernmarkierung durch DAPI; **(B)** Übersicht über eine positive Markierung von Synpo in einer Wildtyp-Kultur; Zellbänder im Hippokampus sind als Negativ zu erkennen; weißes Rechteck mit durchgängiger Linie markiert Bereich unter (C) und mit gestrichelter Linie Ausschnitt in (D); Vergrößerungen des Hilus **(C)** und von CA3 **(D)** mit Zellkernfärbung und deutlicher punktueller Synaptopodin-Färbung, auffällig starke Anfärbung vor allem des Stratum lucidum im Vergleich zum Stratum radiatum von CA3; DAPI 1:10.000 (**blau**), Synaptopodin 1:10.000 (**rot**); GCL – Körnerzellband, CA1 und CA3 – Pyramidenzellbänder, so – Stratum oriens, sl – Stratum lucidum, sr – Stratum radiatum

Des Weiteren konnten von den mit Farbstoff gefüllten Zellen konfokale Aufnahmen in einer höheren Auflösung angefertigt werden. Die Abb. 4.2 – A zeigt eine Mooszelle in Grün mit ihrer typischen Morphologie. Die Zelle zeichnet sich durch ein großes Soma und eine multipolare Organisation der Dendriten mit einzelnen komplexen Spines bzw. Excrescenzen

(durch Pfeile markierte Strukturen in der Vergrößerung in Abb. 4.2 unter D) aus. Die immunhistochemische Färbung (rot) gegen Synaptopodin ergab wie bereits erwähnt eine punktuelle Markierung (siehe Abb. 4.2 – B und E). Auf Einzelzellniveau zeigten bereits *Bas Orth et al. (2005)*, dass diese Synpo-positiven Punkte zu 95 % in den dendritischen Spines der Prinzipalneurone des Hippocampus zu finden sind. Daher kann gesagt werden, dass die einzelnen punktuellen Markierungen zum größten Teil die einen Spine Apparat enthaltenden Spines im Neuropil der Schnittkultur repräsentieren. Bei der Überlagerung beider Farbkanäle (siehe Abb. 4.2 in C und F) war schließlich zu erkennen, dass es hauptsächlich in den großen Riesenspines bzw. Excrescencen der Mooszellen zu einer deutlichen Kolo-kalisation der Signale kam.

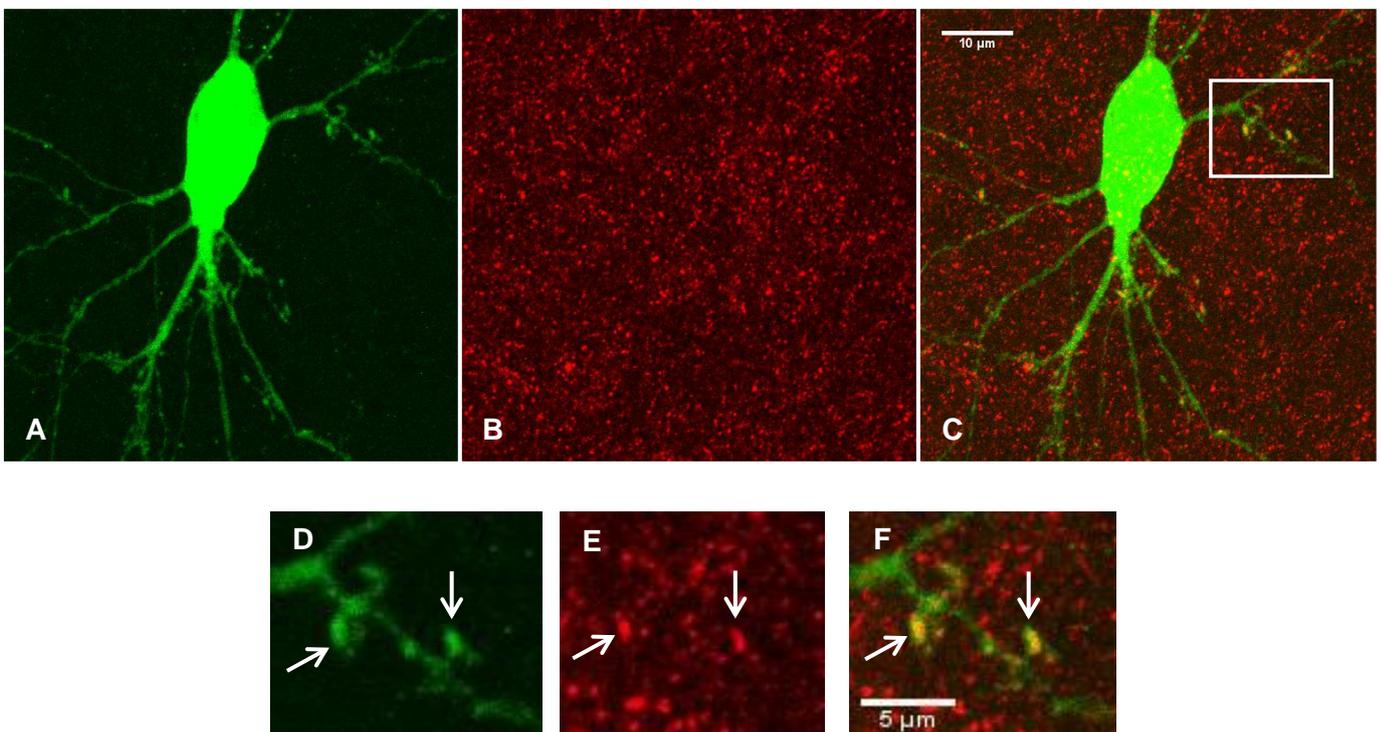


Abb. 4.2: Synatopodin ist lokalisiert in komplexen Spines von Mooszellen; Konfokale Aufnahme einer mittels Patch-Clamp Technik mit Farbstoff gefüllten Mooszelle und immunhistochemisch nachgewiesenes Synaptopodin in einer organotypischen Schnittkultur (DIV 19-20); **(A)** Aufnahme einer Mooszelle im Hilus gefüllt mit Alexa Fluor® 488 Dextran; **(B)** punktuelle Färbung von Synaptopodin im Neuropil; **(C)** Überlagerung der beiden Kanäle; weißes Rechteck markiert den Ausschnitt unter (D) bis (F); **(D)** Vergrößerte Darstellung eines Dendriten mit komplexen Spines (markiert durch die beiden Pfeile); **(E)** Vergrößerter Ausschnitt aus dem gegen Synaptopodin gefärbten Neuropil; Pfeile an gleicher Position wie in (D) markieren große gefärbte Strukturen; **(F)** Überlagerungen der beiden Fluoreszenz-Aufnahmen; deutliche Kolo-kalisation von den Spines und Synaptopodin (siehe Pfeile);
Mooszelle (**grün**), Synaptopodin (**rot**)

Diese Ergebnisse sind gut mit der Präsenz von Synpo-positiv markierten Spine Apparaten (SA) in den von Moosfasern innervierten komplexen Riesen- oder auch „Mushroom“-Spines vereinbar, da durch *Deller et al. (2000)* eine direkte Beziehung zwischen Synpo und dem SA gezeigt wurde. Außerdem besitzen nach *Spacek und Harris (1997)* die ausgereiften „Mushroom“-Spines der CA1-Pyramidenzellen fast immer eine solche spezielle Organelle. Des Weiteren konnte zu 100 % ein SA in diesem Spine-Typ im visuellen Kortex der Maus gefunden werden (*Spacek, 1985*). Daher stellt die ausgeprägte Färbung im Hilus und im Stratum lucidum von CA3 das Vorhandensein eines SA in den dort lokalisierten Excrescencen der Moos- und Pyramidenzellen dar.

4.2. Immunogold-Markierung von Synaptopodin

Es wurden organotypische Schnittkulturen vom Komplex aus Hippocampus und entorhinalen Kortex von Wildtyp-Mäusen (P4) nach 26 Tagen in Kultur (DIV 26) fixiert und für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Außerdem erfolgte eine Immunogold-Markierung nach der *Preembedding*-Methode von Synaptopodin (SE-19) mit dem gleichen Antikörper wie in den bereits beschriebenen Fluoreszenz-Färbungen mit einer Konzentration von 1:2.000. Es wurden dann elektronenmikroskopische Abbildungen im Bereich des Hilus mit den Mooszellen und vor allem deren Excrescencen angefertigt.

In Abbildung 4.3 ist ein komplexer Spine (S) bzw. ein Spine-Kopf einer Excrescence einer Mooszelle aus dem Hilus zu erkennen. Dieser Spine bildete mehrere Synapsen (markiert mit Pfeilspitzen) mit zwei Moosfaser-Terminalen der Körnerzellen (Moosfaser-Boutons, MFB), die anhand der vielen Vesikel im Zytoplasma zu identifizieren waren. Innerhalb des Spines ist ein Mitochondrium (M) zu erkennen und in unmittelbarer Nähe ein Spine Apparat (siehe Pfeil in Abb. 4.3). An dem Spine Apparat sind silberintensivierte Goldkörner (schwarze Strukturen) zu finden, die aus der Immun-Reaktion für Synaptopodin resultieren.

Damit konnte direkt gezeigt werden, dass in den verwendeten Schnittkulturen ein SA, der assoziiert ist mit Synpo, in den Excrescencen von Mooszellen gebildet wurde.

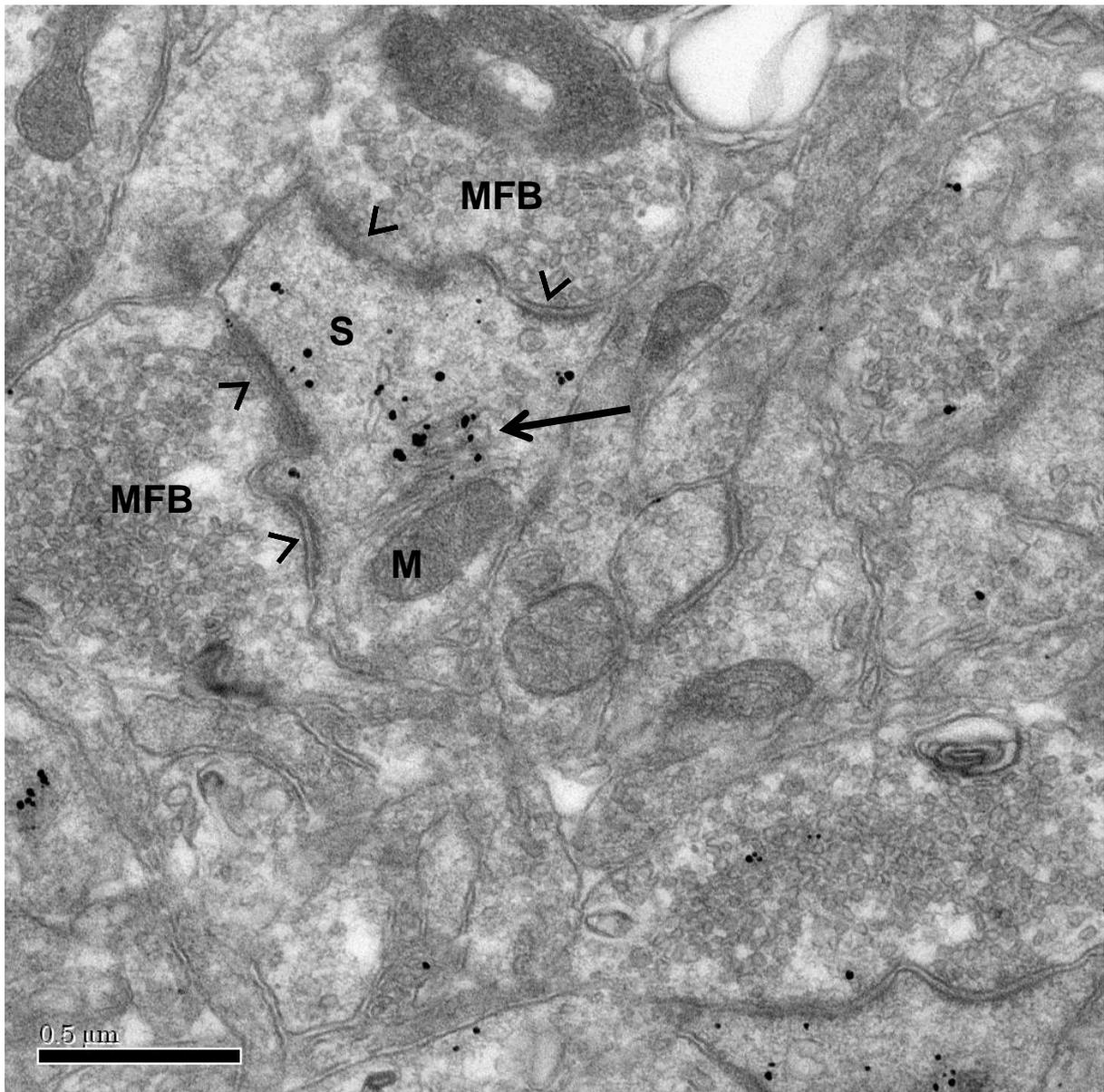


Abb. 4.3: Synaptopodin ist kolokalisiert mit dem Spine Apparat in Excrescenzen von Mooszellen; Elektronenmikroskopische Aufnahme eines komplexen Spines im Wildtyp einer organotypischen Schnittkultur (DIV 26); silberintensivierte Immunogold-Markierung von Synaptopodin (schwarze Punkte) assoziiert mit dem Spine Apparat (siehe Pfeil); der Spine bildet mehrere Synapsen (Pfeilspitze) mit den zwei angrenzenden Moosfaser-Boutons der Körnerzellen (mit vielen Vesikeln im Zytoplasma) aus; S – Spine; MFB – Moosfaser-Bouton; M – Mitochondrium

4.3. Optische Freisetzung von Glutamat (Uncaging)

Nach 25- bis 35-tägiger Kultivierung (DIV 25-35, Methode nach *Stoppini et al., 1991*) der entorhino-hippocampalen Schnitte wurden diese komplett mit der Membran in die Messkammer im Mikroskop platziert. Die Messkammer war mit 0,7 ml einer Salzlösung gefüllt, die in ihrer Zusammensetzung der Cerebrospinalflüssigkeit entsprach (ACSF-Lösung). Die Kultur wurde während der gesamten Experimentzeit bei einer Temperatur von circa 33° C gehalten. Um eine konstante Osmolarität und einen korrekten pH-Wert zu gewährleisten, wurde kontinuierlich Wasser und befeuchtetes Carbogen über den Deckel der Messkammer eingeleitet.

Mittels der Dodt-Gradientenkontrast-Mikroskopie (*Dodt und Zieglgänsberger, 1994*) wurden anschließend im Hilus die großen Somata der Mooszellen gesucht und mittels der Patch-Clamp-Technik über die Pipette ein Zugang zur Zelle hergestellt. In der sogenannten „Whole-Cell“-Konfiguration konnten nun die Zellen elektrophysiologisch abgeleitet und gleichzeitig mit zwei Farbstoffen gefüllt werden. Für die morphologische Identifikation der Zellen, vor allem der zu untersuchenden komplexen Spines, diente ein roter Fluoreszenz-Farbstoff (Alexa Fluor® 594 Dextran, 10.000 MW, 100 µM) und zur Visualisierung der Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen ein grüner Kalzium-Fluoreszenz-Farbstoff (Fluo-5F, 200 µM). Beide Farbstoffe waren für die Zwei-Photonen-Mikroskopie geeignet und wurden in diesen Experimenten mit einer Wellenlänge von 805 nm mit einem Titan-Saphir-Laser (Ti:Sa-Laser) angeregt und über getrennte Photomultiplier (PMTs) detektiert.

4.3.1. Experimente unter Normalbedingungen

Bei den Versuchen unter Normalbedingungen enthielt das ACSF zusätzlich einen chemisch maskierten exzitatorischen Neurotransmitter, der optisch freigesetzt werden konnte (Uncaging). Das für das Zwei-Photonen-Uncaging geeignete 4-Methoxy-7-nitroindolinyI-(MNI)-Glutamat (entwickelt und beschrieben von *Matsuzaki et al., 2001*) wurde dabei in einer Konzentration von 20 mM verwendet. Dieses MNI-Glutamat konnte nun durch einen kurzen Puls mit einem zweiten Ti:Sa-Laser bei einer Wellenlänge von 720 nm sehr lokalisiert im synaptischen Spalt an der Moosfaser-Synapse optisch freigesetzt werden. Durch die

speziellen Eigenschaften der Zwei-Photonen-Anregung muss der Spine bzw. die Synapse genau mit dem hier verwendeten Punkt-Scan getroffen werden, da nur in der Fokusebene (Punkt) und nicht darüber oder darunter eine Anregung bzw. Freisetzung stattfindet. Außerdem kommt es durch die Verwendung höherer Wellenlängen nicht zu einer Schädigung des Gewebes wie durch kurzwelliges UV-Licht und die Eindringtiefe ins Gewebe wird deutlich erhöht. Das so aktivierte Glutamat diente schließlich als normaler physiologischer Neurotransmitter und konnte durch Bindung an die verschiedenen Rezeptoren eine postsynaptische Reaktion auslösen.

Unter diesen Normalbedingungen besaßen die untersuchten Mooszellen ein für diesen Zelltyp typisches Ruhemembranpotential (RMP) von -60 mV bis -65 mV (siehe dazu Abb. 4.8 unter D). Die ebenfalls aufgezeichnete spontane Aktivität, die auf eine direkte Moosfaser-Aktivierung zurückzuführen ist (*Scharfman, 1993*), zeichnete sich durch eine hohe Frequenz und Größe der jeweiligen synaptischen Signale aus. Zwei Beispiele für diese hohe spontane Aktivität sind in Abbildung 4.4 und 4.7 jeweils für den Voltage-Clamp-(VC)- bzw. den Current-Clamp-(CC)-Modus dargestellt.

4.3.1.1. Induzierte Einzel-Signale im Voltage-Clamp-Modus (uEPSCs)

Durch kurze Laser-Pulse (0,5 ms) mit ansteigender Leistung konnten durch Uncaging induzierte exzitatorische postsynaptische Ströme (uEPSCs) erzeugt und über die Patch-Pipette am Soma abgeleitet werden. Gleichzeitig wurde im ausgewählten Spine die resultierende Kalzium-Antwort mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie gemessen. Die Rohdaten eines beispielhaften Experimentes im Voltage-Clamp-Modus mit drei ausgewählten Uncaging-Stufen an einem individuellen Spine sind in Abb. 4.4 zu sehen. Dabei wurden die verwendeten Leistungs-Stufen so gewählt, dass eine lineare Zunahme der freigesetzten Glutamatmenge erreicht und dass ein möglichst großer Wirkungsbereich der Synapsen abgedeckt wurde.

Im Allgemeinen stiegen mit zunehmender Leistung die Amplituden der induzierten elektrophysiologischen Signale in beiden Genotypen an. Beginnend bei der niedrigsten Laser-Leistungsstufe von 10 mW erreichten die gemessenen elektrischen Ströme (uEPSCs) im Durchschnitt eine maximale Amplitude von $-26,0 \pm 3,6$ pA ($n = 74$) für den Wildtyp und $-29,3 \pm 4,4$ pA ($n = 81$) für den Knock-out. Nach schrittweiser Erhöhung der Leistung und somit vermehrter Freisetzung an Glutamat konnten in der stärksten Laser-Leistungsstufe von 21,79 mW maximale Amplituden für den Wildtyp von $-115,6 \pm 9,4$ pA ($n = 74$) und beim Knock-

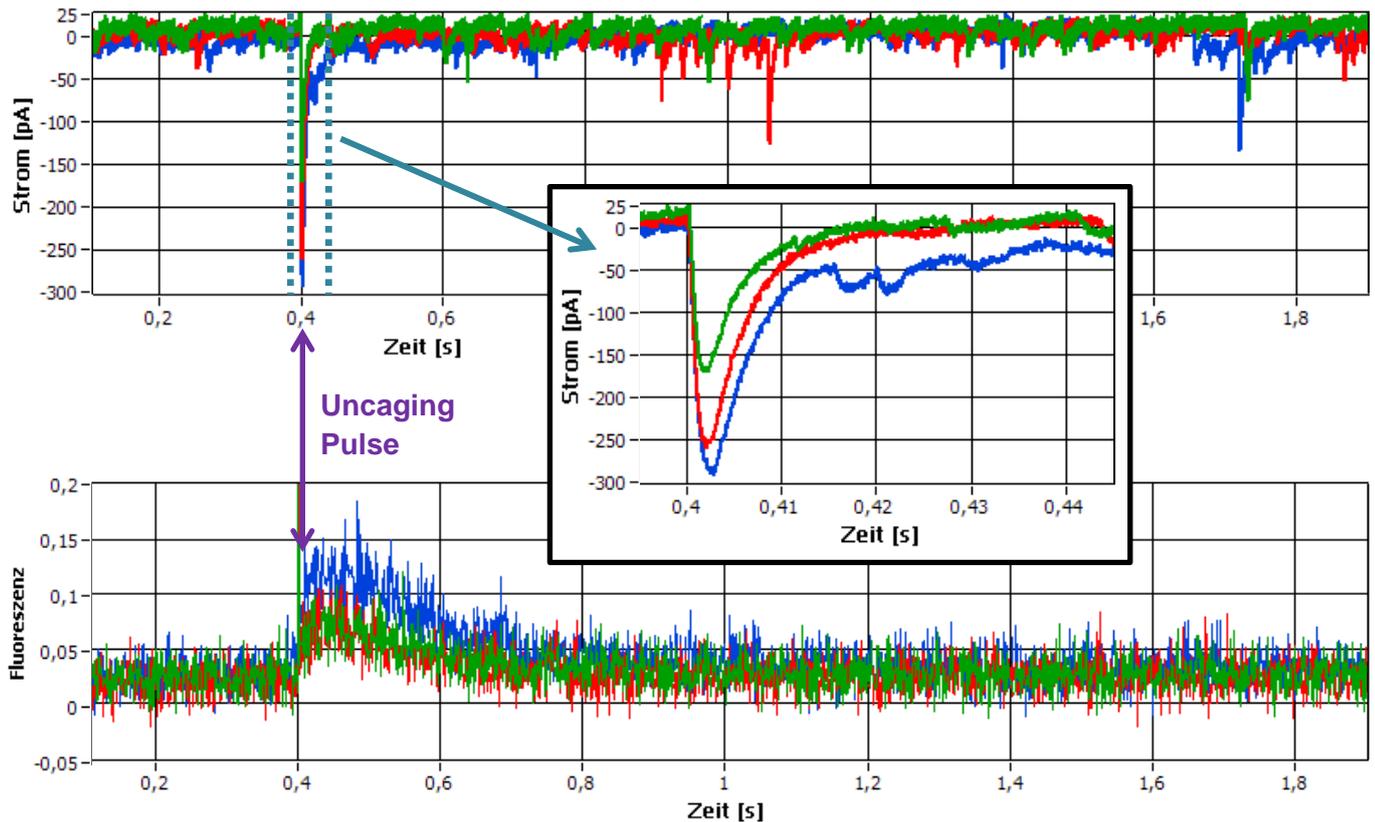


Abb. 4.4: Messungen von exzitatorischen postsynaptischen Strömen (uEPSCs) und gleichzeitig resultierende Kalzium-Antworten in einem individuellen Spine induziert durch Zwei-Photonen-Uncaging; Ausschnitte aus den Rohdaten für die Elektrophysiologie (obere Zeile) und grüne Fluoreszenz-Signale (untere Zeile) der Experimente mit 20 mM MNI-Glutamat (Normalbedingung); bei 0,4 s erfolgte durch einen kurzen Laser-Puls (0,5 ms bei 720 nm) immer die optische Freisetzung des Transmitters; mit zunehmender Laser-Leistung stiegen die Amplituden der induzierten Signale an; verwendete Uncaging Stufen von **10,00 mW** – **13,23 mW** – **20,00 mW**

out von $-94,3 \pm 7,1$ pA ($n = 83$) erzielt werden. Eine schematische Darstellung der Ergebnisse für die durchschnittlichen Werte der maximalen Amplituden für die einzelnen Uncaging-Stufen ist in Abb. 4.5 unter A zu finden und die Messwerte sind in Tab. 7.1 im Anhang aufgelistet.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse war zu erkennen, dass zwischen den beiden Genotypen in den ersten vier Uncaging-Stufen keine auffälligen Unterschiede zwischen den maximalen Amplituden zu finden waren. Allerdings fand sich ab der fünften Stufe ein Trend zu größeren Amplituden im WT. So erreichten z.B. bei 20,00 mW die mittleren Amplituden für den WT $-108,5 \pm 9,5$ pA ($n = 75$) und waren damit deutlich höher als im KO mit $-87,2 \pm 7,1$ pA ($n = 80$). Die mittleren Amplituden zeigten über alle Stufen hinweg zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede. Die Zunahme der EPSC-Amplituden mit steigender Laser-Leistung folgte im WT in etwa einem linearen Anstieg, wohingegen die Werte im KO ab den letzten beiden Uncaging-Stufen einen sublinearen Anstieg im Sinne einer Sättigung zeigten.

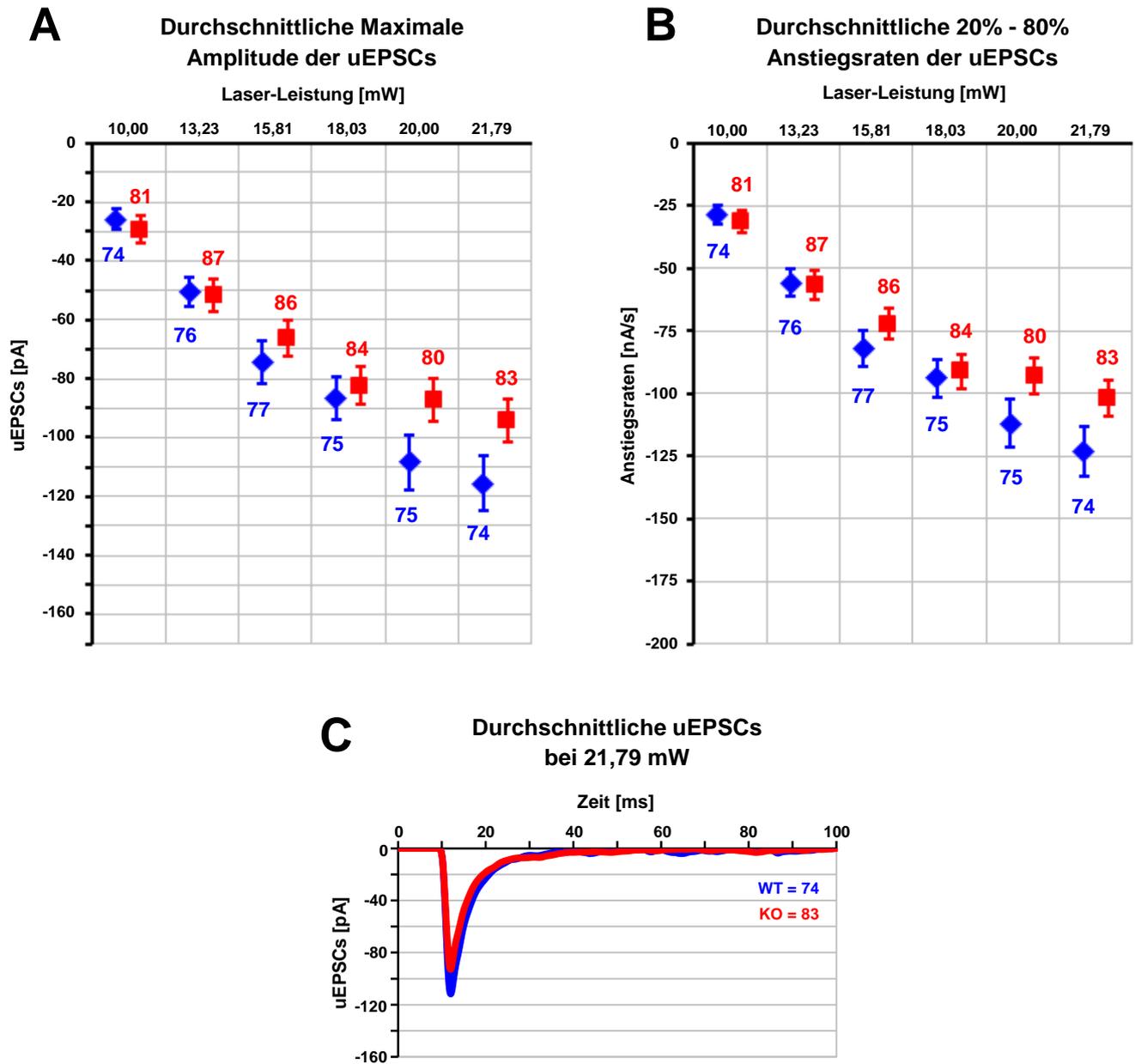


Abb. 4.5: Elektrophysiologische Einzel-Signale gemessen im Voltage-Clamp-(VC)-Modus nach optischer Glutamat-Freisetzung (Uncaging) mit steigender Laserleistung; 20 mM MNI-Glutamat im ACSF enthalten (Normalbedingung); vergleichende Darstellung der Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) von Wildtyp (WT – blaue Raute) und Knock-out (KO – rotes Quadrat); Zahlenangaben über den Werten in der jeweiligen Farbe entsprechen der Anzahl (n) der erfolgreich gemessenen Spines; **(A)** maximale durchschnittliche Amplitude der mittels Uncaging ausgelösten exzitatorischen postsynaptischen Ströme (uEPSCs) in Abhängigkeit von der Laser-Leistung; **(B)** entsprechende 20 % - 80 % Anstiegsraten der unter A gemessenen uEPSCs über alle Uncaging-Stufen; **(C)** Darstellung des durchschnittlichen Stroms beider Genotypen in der höchsten Leistungs-Stufe von 21,79 mW.

Mit zunehmender durchschnittlicher maximaler Amplitude nahmen auch die 20 % - 80 % Anstiegsraten der uEPSCs zu (siehe Abb. 4.5 – B und im Anhang Tab. 7.1). Angefangen bei $-28,8 \pm 3,7$ nA/s ($n = 74$) für den WT und $-31,4 \pm 4,3$ nA/s ($n = 81$) für den KO bei der kleinsten Leistungsstufe von 10,00 mW stiegen die Raten an bis hin zu $-123,1 \pm 9,7$ nA/s (WT, $n = 74$) und $-102,0 \pm 7,5$ nA/s (KO, $n = 83$) bei der höchsten gemessenen Stufe von 21,79 mW. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden. Allerdings zeigten die Anstiegsraten des WTs eine annähernd lineare Zunahme über alle Uncaging-Stufen hinweg und im KO konnte eher ein sublinearer Anstieg vor allem in den beiden letzten Stufen beobachtet werden. Damit folgten die Werte der Anstiegsraten denen der maximalen Amplitude, wo bereits ein solcher Zusammenhang auftrat.

Von der Gesamtanzahl der Spines, in denen erfolgreich ein postsynaptischer Strom mittels Uncaging erzeugt wurde, zeigten nicht alle auch gleichzeitig eine entsprechende Kalzium-Antwort. Bei der kleinsten Uncaging-Stufe (10 mW) konnte in rund 65 % der Spines im WT und in 64 % im KO ein Kalzium-Transient gemessen werden (siehe die integrierte Tabelle in Abb. 4.6 – B). Mit zunehmender Laser-Leistung nahm der prozentuale Anteil der mit Kalzium antwortenden Spines zu, bis hin zu Werten von 93 % im WT und 90 % im KO bei 21,79 mW. Allerdings konnte selbst in der höchsten Stufe bei einigen Spines keine Kalzium-Antwort zusätzlich zu den uEPSCs ausgelöst werden. Zwischen den beiden Genotypen war kein großer Unterschied in der prozentualen Verteilung der mit Kalzium antwortenden Spines ersichtlich.

Bei der Analyse dieser Kalzium-Transienten erreichten die antwortenden Spines dabei im Durchschnitt eine maximale Amplitude (max. $\Delta G/R$) von $0,012 \pm 0,001$ (WT, $n = 48$) und $0,014 \pm 0,002$ (KO, $n = 52$) in der kleinsten Uncaging-Stufe von 10,00 mW. Mit zunehmender Laser-Leistung bzw. Glutamat-Freisetzung nahm, wie bereits erwähnt, nicht nur der Anteil der antwortenden Spines zu, sondern auch die Amplitude des Kalzium-Signals stieg an. Die Zunahme folgte in den drei ersten Uncaging-Stufen vor allem im WT einem linearen Verlauf, wohingegen im KO der Wert ($0,021 \pm 0,002$; $n = 69$) in der dritten Stufe von 15,81 mW gegenüber dem WT ($0,025 \pm 0,002$) deutlich abfällt (siehe Abb. 4.6 – A). Bei allen Leistungsstufen bestand dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (siehe Abb. 4.6 – A und in Tab. 7.2 im Anhang). In den letzten drei Uncaging-Stufen konnte ein sublinearer Anstieg bis hin zu einer Art Sättigung der Kalzium-Amplituden registriert werden. So erreichten die Mittelwerte im WT maximal $0,030 \pm 0,003$ ($n = 69$) bei 21,79 mW und im KO maximal $0,029 \pm 0,003$ ($n = 73$) bei 20,00 mW. Im direkten Vergleich der durchschnittlichen Kalzium-Transienten in der höchsten Uncaging-Stufe von 21,79 mW konnten, wie in Abb. 4.6

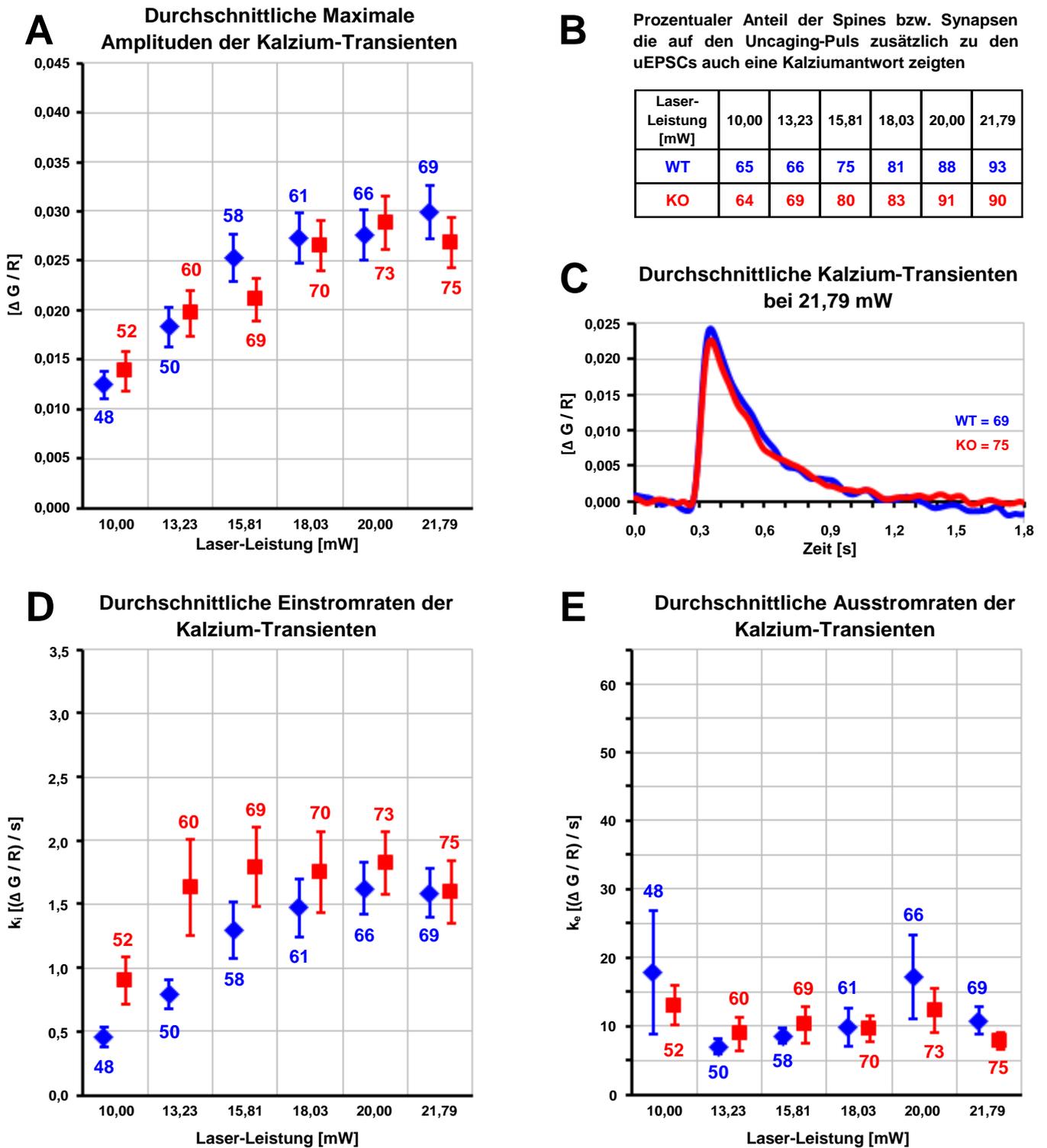


Abb. 4.6: Kalzium-Antworten der Einzel-Signale im VC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung; 20 mM MNI-Glutamat (Normalbedingung); vergleichende Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von **WT** (blaue Raute) und **KO** (rotes Quadrat); Angaben über den Werten entsprechen der Anzahl (n) der erfolgreich gemessenen Kalzium-Antworten; **(A)** Durchschnittliche maximale Amplituden ($\Delta G/R$) der gemessenen Kalzium-Transienten; **(B)** Prozentualer Anteil der Spines, die auf einen Uncaging-Puls zusätzlich zu einem Strom eine gleichzeitige Kalzium-Antwort zeigten; **(C)** Darstellung eines durchschnittlichen Kalzium-Transienten beider Genotypen in der Leistungs-Stufe von 21,79 mW; Werte der Einstrom- k_i **(D)** und Ausstromraten k_e **(E)** für die durchschnittlichen Kalzium-Transienten.

unter C ersichtlich, keine offensichtlichen Unterschiede im Kurvenverlauf zwischen Wildtyp und Knock-out festgestellt werden.

Bei genauer Analyse der Kalzium-Transienten in Bezug auf die Einstromrate k_i und die Ausstromrate k_e , das heißt der Anstieg und der Abfall von $\Delta G/R$ pro s, waren zwischen den beiden Genotypen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zu finden (siehe Abb. 4.6 D und E und im Anhang unter Tab. 7.3). Auffällig bei den Einstromraten waren allerdings die im Allgemeinen sehr großen Werte für den Standardfehler und die Standardabweichung, vor allem zutreffend für den KO. Außerdem zeigten die Raten für den KO keine kontinuierliche Zunahme, sondern befanden sich bereits auf einem hohen Niveau (Werte zwischen $1,596 \pm 0,250$ / s bei 21,79 mW; $n = 75$ bis maximaler Wert $1,823 \pm 0,244$ / s bei 20,00 mW; $n = 73$) mit Ausnahme der niedrigsten Stufe ($0,902 \pm 0,185$ / s; $n = 52$). Im Gegensatz dazu nahmen die Einstromraten beim WT anfangs linear zu (beginnend mit $0,455 \pm 0,076$ / s bei 10,00 mW; $n = 48$), aber ab der vierten Stufe (18,03 mW) wurde ebenfalls eine Art Plateau erreicht, wobei der maximale Wert von $1,625 \pm 0,205$ / s ($n = 66$) bei der fünften Stufe (20,00 mW) lag. Damit war die Zunahme der Anstiegsraten im Wildtyp vom Verlauf her entsprechend mit dem Verlauf des Anstiegs der maximalen Kalzium-Amplituden. Bei der Kalzium-Ausstromrate konnte keine besondere Verteilung der Werte bei beiden Genotypen festgestellt werden. Die Werte schwankten beim Wildtyp zwischen $6,992 \pm 1,083$ / s ($n = 50$, bei 13,23 mW) und $17,875 \pm 9,023$ / s ($n = 48$, bei 10,00 mW) und beim Knock-out in einem etwas kleineren Bereich von einer minimal erreichten Rate von $7,909 \pm 1,213$ / s ($n = 75$, bei 21,79 mW) und maximal von $13,029 \pm 2,865$ / s ($n = 54$, bei 10,00 mW). Besonders auffällig waren die großen Standardfehler (und auch Standardabweichung) bei den Stufen von 10,00 und 20,00 mW im WT.

4.3.1.2. Induzierte Einzel-Signale im Current-Clamp-Modus (uEPSPs)

Unter Normalbedingungen wurden anschließend an die Messungen im VC-Modus dieselben sechs Leistungs-Stufen zum optischen Freisetzen des Glutamats unter Current-Clamp-(CC)-Bedingungen verwendet und die resultierenden exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (uEPSPs) und die entsprechenden Kalzium-Antworten gemessen. Für den CC-Modus sind in Abb. 4.7 ebenfalls die Rohdaten eines beispielhaften Experimentes im mit drei ausgewählten Uncaging-Stufen an einem individuellen Spine dargestellt.

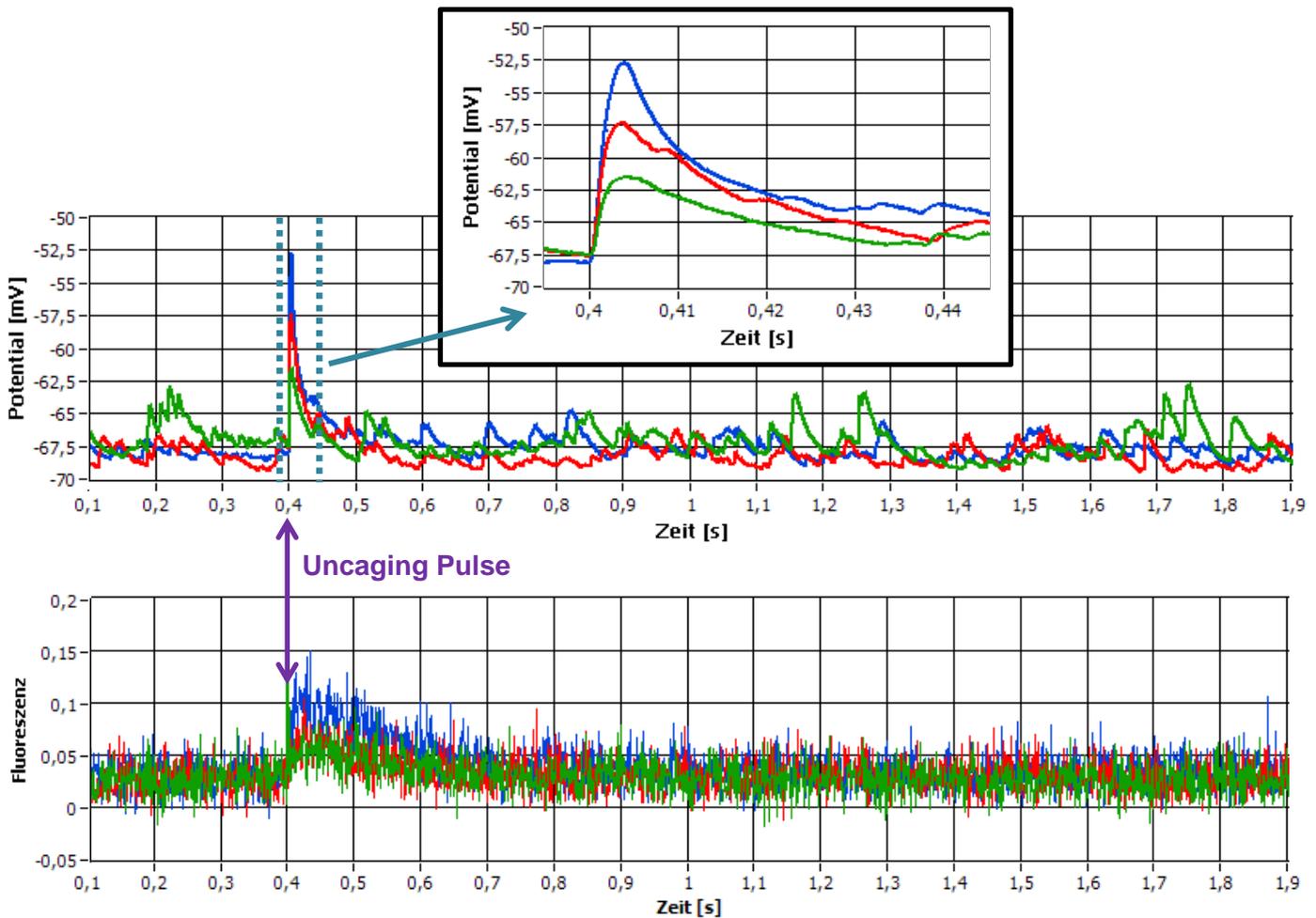


Abb. 4.7: Messungen von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (uEPSPs) und gleichzeitig resultierende Kalzium-Antworten in einem individuellen Spine induziert durch Zwei-Photonen-Uncaging; Ausschnitte aus den Rohdaten für die Elektrophysiologie (obere Zeile) und grüne Fluoreszenz-Signale (untere Zeile) der Experimente mit 20 mM MNI-Glutamat (Normalbedingung); bei 0,4 s erfolgte durch einen kurzen Laser-Puls (0,5 ms bei 720 nm) immer die optische Freisetzung des Transmitters; mit zunehmender Laser-Leistung stiegen die Amplituden der induzierten Signale an; verwendete Uncaging Stufen von **10,00 mW** – **13,23 mW** – **18,03 mW**

Während der kompletten Messungen an einem Spine, die circa 10 bis 15 min dauerte, wurde (wenn nötig) ein konstanter hyperpolarisierender Strom in das Soma injiziert, um das RMP der Mooszelle unter -60 mV zu halten. Aus den Rohdaten des CC-Modus wurde das jeweilige RMP für die einzelnen Experiment-Abschnitte bestimmt. Über die einzelnen Uncaging-Stufen hinweg war im Durchschnitt aller gemessenen Zellen das RMP konstant (siehe Abb. 4.8 – D und Tab. 4 / Anhang), so dass die Ausgangslage für die Aktivierung spannungsabhängiger Ionenkanäle in beiden Genotypen dieselbe war.

Die durchschnittlichen maximalen Amplituden der erzeugten uEPSPs verhielten sich gleichermaßen wie im Voltage-Clamp-Modus, das heißt sie nahmen von der kleinsten bis zur

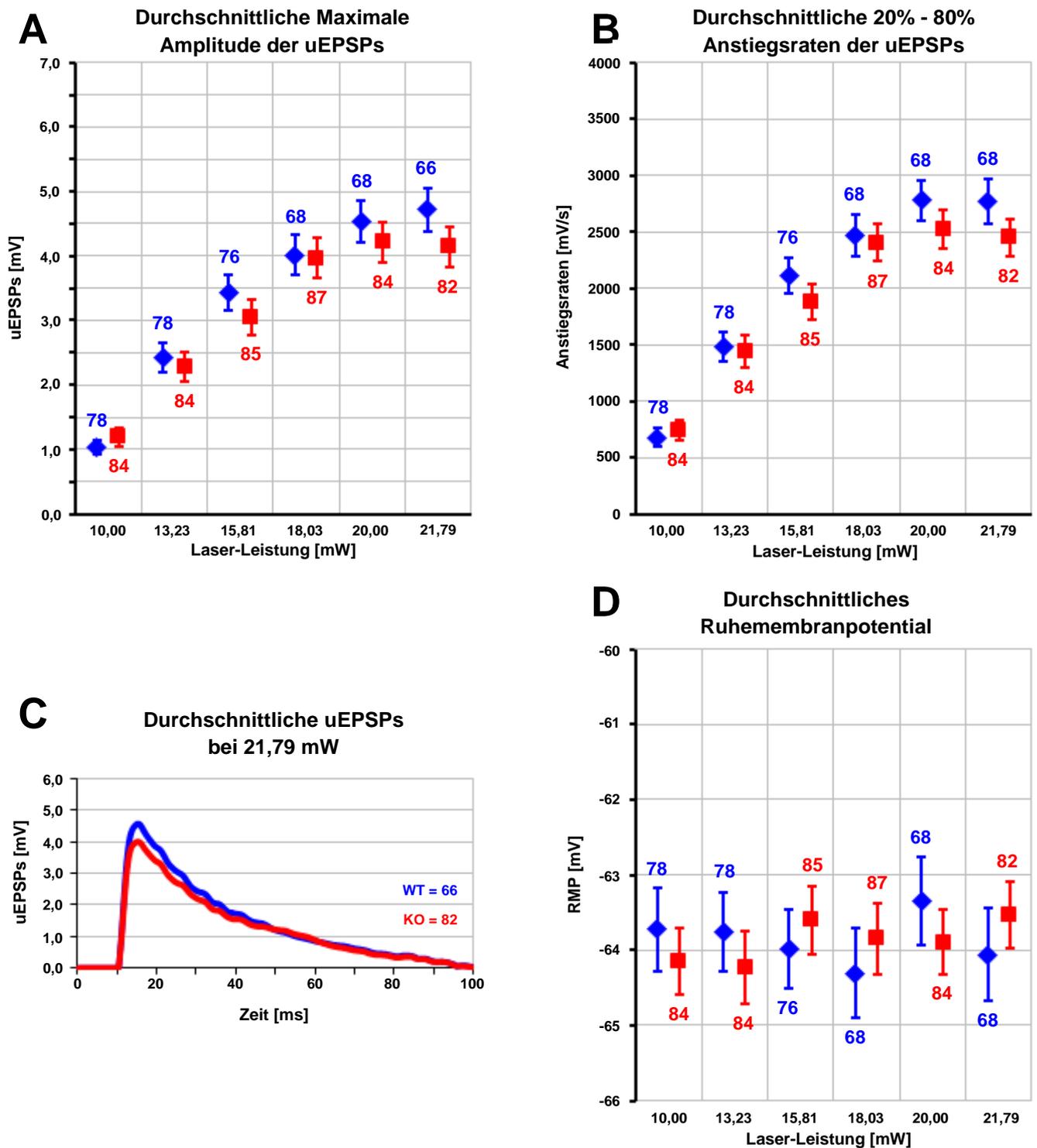


Abb. 4.8: Elektrophysiologische Einzel-Signale gemessen im CC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung; 20 mM MNI-Glutamat im ACSF enthalten (Normalbedingung); vergleichende Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von Wildtyp (WT – blaue Raute) und Knock-out (KO – rotes Quadrat); Zahlenangaben über den Werten entsprechen der Anzahl (n) der erfolgreich gemessenen Spines; **(A)** maximale durchschnittliche Amplitude der mittels Uncaging ausgelösten exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (uEPSPs) in Abhängigkeit von der Laser-Leistung; **(B)** entsprechende 20 % - 80 % Anstiegsraten der unter A gemessenen uEPSPs; **(C)** Darstellung eines durchschnittlichen Stroms beider Genotypen in der höchsten Uncaging-Stufe von 21,79 mW; **(D)** durchschnittliches Ruhemembranpotential (RMP) über alle Uncaging-Stufen hinweg

größten Leistungsstufe in beiden Genotypen zu. So wurden Werte von $1,0 \pm 0,1$ mV (WT, $n = 78$) und $1,2 \pm 0,1$ mV (KO, $n = 84$) in der ersten Stufe (10,00 mW) bis hin zu $4,7 \pm 0,3$ mV (WT, $n = 66$) und $4,1 \pm 0,3$ mV (KO, $n = 82$) bei dem höchsten Uncaging-Level von 21,79 mW erreicht (siehe Abb. 4.8 – A und Tab. 7.5 im Anhang). Dabei folgte die Zunahme von Stufe zu Stufe in den ersten vier Werten einen linearen Verlauf und bog in den beiden größten Laser-Leistungen in eine Sättigung ab, was bereits bei den Ergebnissen im VC-Modus ersichtlich war. Dieser Anstieg der uEPSPs war in beiden Genotypen zu erkennen, allerdings war er im KO deutlicher ausgeprägt, wo sogar der letzte Mittelwert der maximalen Amplitude gegenüber dem Vorletzten leicht abfällt. Vergleichend konnte zwischen den induzierten Potentialen der beiden Genotypen über alle Stufen hinweg kein signifikanter Unterschied (die exakten p-Werte sind in Tab. 7.5 im Anhang aufgelistet) festgestellt werden, im Gegensatz zu den uEPSCs, bei denen ein signifikanter Unterschied in der größten Uncaging-Stufe auftrat. Ebenfalls waren keine Unterschiede in der Kinetik der elektrophysiologischen Signale zu erkennen, wie bei der gemeinsamen Darstellung der durchschnittlichen Potentiale der beiden Genotypen in der höchsten Leistungs-Stufe von 21,79 mW in Abb. 4.8 – C ersichtlich ist.

Die 20 % - 80 % Anstiegsraten (Abb. 4.8 – B und Tab. 7.5 / Anhang) folgten auch dem gleichen Muster, wie bereits bei den Experimenten unter der VC-Bedingung beschrieben. Die Raten stiegen ebenfalls von der kleinsten Stufe (10,00 mW) von 679 ± 78 mV/s (WT, $n = 78$) und 743 ± 85 mV/s (KO, $n = 84$) zu maximal 2769 ± 195 mV/s (WT, $n = 66$) und 2447 ± 162 mV/s (KO, $n = 82$) in der höchsten Stufe (21,79 mW) an. Dabei folgte der Kurvenverlauf der Zunahme der Raten über die Uncaging-Stufen hinweg bei beiden Genotypen dem Verlauf der maximalen Amplituden der uEPSPs, mit einem linearen Anstieg in den ersten vier Stufen und einem sublinearen weiteren Anstieg der übrigen Werte. Auch hier trat kein signifikanter Unterschied zwischen den bestimmten Anstiegsraten der uEPSPs der beiden Genotypen auf.

Auch unter diesen elektrophysiologischen Messbedingungen (CC) war zu beobachten, dass nicht jeder erfolgreich gemessene Spine zusätzlich zu einem uEPSP auch eine gleichzeitige Kalzium-Antwort zeigte. So konnten bei der kleinsten Stufe von 10,00 mW in nur 43 % (WT) und 45 % (KO) der Spines ein Kalzium-Transient (siehe Abb. 4.9 in der Tabelle unter B) detektiert werden. Die prozentualen Anteile nahmen mit steigender Laser-Leistung bis zu maximalen Werten von 85 % bzw. 82 % in der letzten Stufe (21,79 mW) für die Genotypen (WT bzw. KO) zu. Die prozentuale Verteilung der mit Kalzium antwortenden Spines unter Voltage-Clamp-Bedingungen war annähernd vergleichbar mit der im Current-Clamp. Nur in der kleinsten Uncaging-Stufe konnten im CC rund 20 % weniger Kalzium-Transienten gemessen werden als im VC. In diesen Experimenten gab es ebenfalls Spines, die bis

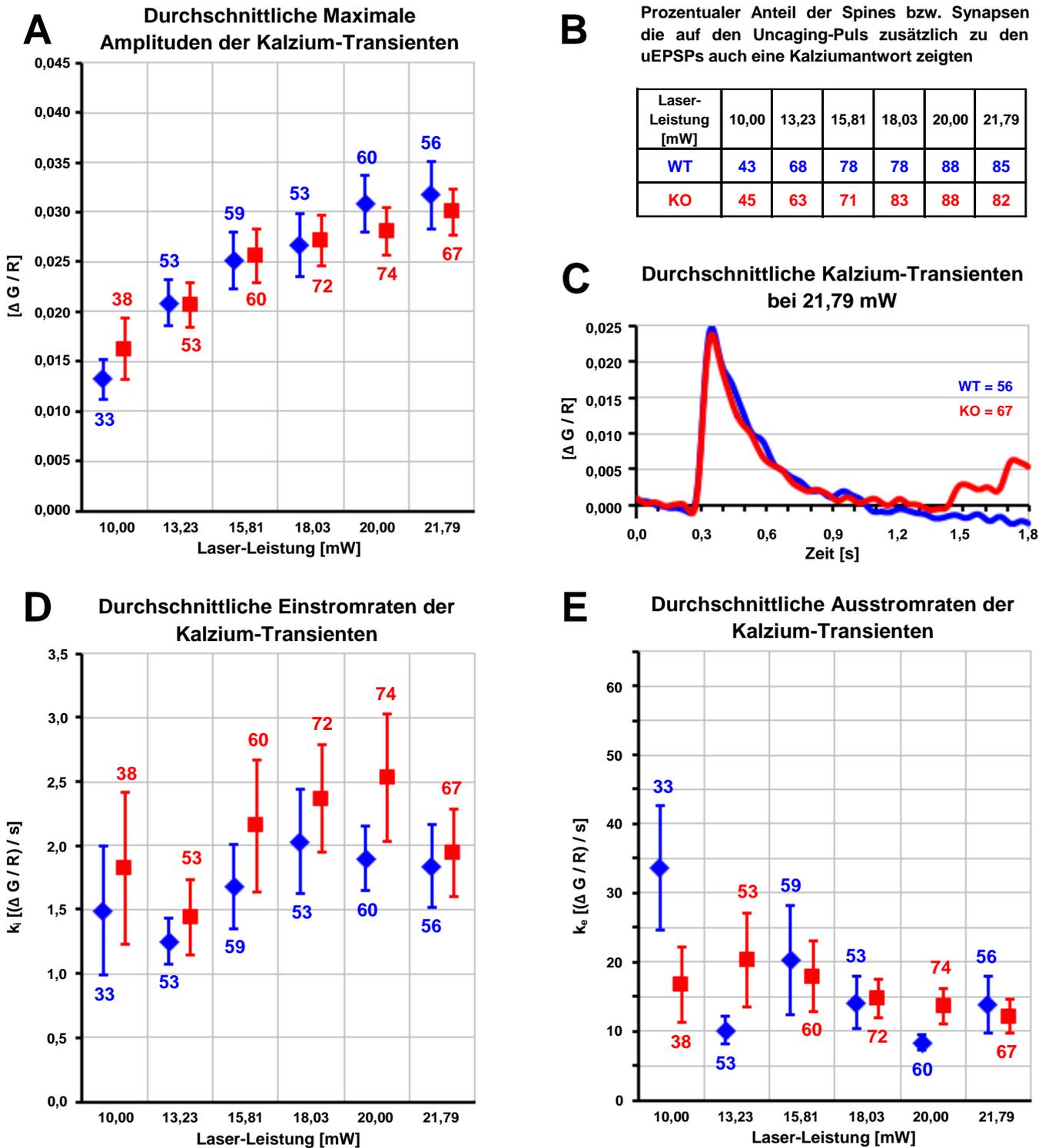


Abb. 4.9: Kalzium-Antworten der Einzel-Signale im CC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung; 20 mM MNI-Glutamat (Normalbedingung); vergleichende Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von **WT (blaue Raute)** und **KO (rotes Quadrat)**; Zahlenangaben über den Werten entsprechen der Anzahl (n) der erfolgreich gemessenen Kalzium-Antworten; **(A)** Durchschnittliche maximale Amplituden ($\Delta G/R$) der gemessenen Kalzium-Transienten; **(B)** Prozentualer Anteil der Spines, die auf einen Uncaging-Puls zusätzlich zu einem Potential eine gleichzeitige Kalzium-Antwort zeigten; **(C)** Darstellung eines durchschnittlichen Kalzium-Transienten beider Genotypen in der Leistungs-Stufe von 21,79 mW; Werte der Einstrom- k_i **(D)** und Ausstromraten k_e **(E)** für die durchschnittlichen Kalzium-Transienten.

einschließlich des höchsten Leistungslevels nur eine elektrophysiologische Reaktion und kein Kalzium-Signal auf die optische Glutamat-Freisetzung zeigten.

Bei der Betrachtung der durchschnittlichen maximalen Amplituden ($\max. \Delta G/R$) der Kalzium-Transienten war kein offensichtlicher Unterschied zwischen den beiden Genotypen ersichtlich. Die gemessenen Werte (siehe Abb. 4.9 – A und im Anhang in Tab. 7.6) erreichten $0,013 \pm 0,002$ (WT, $n = 33$) und $0,016 \pm 0,003$ (KO, $n = 38$) in der kleinsten Leistungs-Stufe von 10,00 mW und stiegen leicht an bis zu einem Maximum in der höchsten Stufe (21,79 mW) von $0,032 \pm 0,003$ (WT, $n = 56$) im Vergleich zu $0,030 \pm 0,002$ (KO, $n = 67$). Dabei entsprachen die Amplituden annähernd den Werten, die bereits unter VC-Bedingungen gefunden wurden. Im Allgemeinen konnten allerdings leicht höhere Amplituden festgestellt werden, z.B. für den WT 0,030 im VC gegenüber 0,032 im CC. Des Weiteren war auch hier ein linearer Anstieg der Amplituden über die ersten drei Uncaging-Stufen hinweg zu erkennen, der in eine sublineare Zunahme in den höheren Stufen überging. Auch im CC-Modus gab es bei den durchschnittlichen Kalzium-Transienten in der größten Laserleistungs-Stufe (21,79 mW) keine auffallenden Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (siehe Abb. 4.9 – C).

Die beiden Parameter Einstrom- und Ausstromrate der Kalzium-Transienten ($\Delta G/R$ pro s) zeigten auch unter Current-Clamp-Bedingungen eine hohe Varianz innerhalb der einzelnen Stufen und über beide Genotypen verteilt (siehe die sehr großen Fehlerbalken in Abb. 4.9 – D und E und SEM- und SD-Werte in Tab. 7.7 / Anhang). Dabei konnten für beide Parameter keine besonderen Verteilung der Werte über die Stufen hinweg beobachtet werden. Im Allgemeinen wurden jedoch deutlich höhere Einstromraten erreicht als unter VC-Bedingungen, so lagen z.B. die minimalen Raten im WT bei $1,251 \pm 0,178 / s$ ($n = 53$; 13,23 mW) und im KO bei $1,441 \pm 0,291 / s$ ($n = 53$; 13,23 mW) gegenüber $0,455 / s$ bzw. $0,902 / s$ bei 10,00 mW im VC. Die maximalen Raten erreichten Werte von $2,032 \pm 0,410 / s$ (WT, $n = 53$; 18,03 mW) und $2,531 \pm 0,493 / s$ (KO, $n = 74$; 20,00 mW) vs. $1,625 / s$ und $1,823 / s$ im VC. Der gleiche Sachverhalt traf ebenfalls für die Ausstromraten beider Genotypen zu. Die einzelnen Raten vergleichend, lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Knock-out vor.

4.3.1.3. 15 bAPs mit 50 Hz

An die vorhergegangenen Experimente, in denen zuvor einzelne elektrophysiologische Signale sowie Kalzium-Antworten mittels Uncaging induziert wurden, schlossen sich weitere Versuche an, um zu überprüfen, ob in denselben Spines funktionsfähige spannungsgesteuerte Kalzium-Kanäle (VGCCs) vorhanden waren. Dazu wurden Aktionspotentiale (bAPs) ausgelöst, die in den Dendritenbaum und somit auch in den Spine propagierten, hier die Zellmembran depolarisierten und zur Öffnung der VGCCs führten. Dies erfolgte durch kurze Strompulse (1-2 ms mit 1,5 nA) im Current-Clamp-Modus, die über die Patch-Pipette in das Soma der Mooszellen injiziert wurden. Für diese Experimente wurde eine Abfolge von 15 bAPs mit einer Frequenz von 50 Hz ausgelöst. Gleichzeitig konnten im Spine die Kalzium-Antworten, resultierend aus dem Einstrom von Kalzium durch die VGCC und als Folge einer möglichen Kalzium-abhängigen Kalzium-Freisetzung (CICR) aus dem Spine Apparat (SA), gemessen werden.

Eine repräsentative elektrophysiologische Ableitung am Zellsoma, die die Abfolge der 15 bAPs bei 50 Hz zeigt, ist in der Abb. 4.10 in A dargestellt. Dabei konnten eindeutige Aktionspotentiale (eine klare Depolarisation über 0 mV hinaus) festgestellt werden, die nach erfolgter AP-Serie auch schnell wieder auf das Niveau des Ruhemembranpotentials zurückkehrten. Dabei lag im Durchschnitt das RMP im WT bei $-64,6 \pm 0,7$ mV ($n = 51$) und im KO bei $-64,0 \pm 0,5$ mV ($n = 61$). Außerdem zeigten die APs eine für Mooszellen typische Kinetik (*Scharfman und Schwartzkroin, 1988*), da eine Nach-Hyperpolarisation nicht oder nur sehr gering vorhanden war.

Unter Normalbedingungen (nur MNI-Glutamat im ACSF) konnten Kalzium-Transienten mit einer mittleren maximalen Amplitude ($\Delta G/R$) von $0,121 \pm 0,007$ ($n = 51$) für den Wildtyp und $0,092 \pm 0,005$ ($n = 61$) für den Knock-out (siehe Abb. 4.10 unter B und im Anhang Tab. 7.8), als Antwort auf eine erfolgreich induzierten bAP-Serie, ermittelt werden. Dieser Unterschied der mittleren maximalen Amplituden von 23,5 % zwischen den beiden Genotypen war mit einem p-Wert von 0,015087 signifikant.

Bei der Analyse der Parameter der Kalzium-Einstromraten und -Ausstromraten ($\Delta G/R$ pro s) konnte festgestellt werden, dass der Wildtyp eine schnellere Einstrom-Rate aufwies als der Knock-out (zu finden im Anhang unter Tab. 7.9) und zwar $0,607 \pm 0,042$ / s ($n = 51$) gegenüber $0,476 \pm 0,031$ / s ($n = 61$) und dieser Unterschied erreichte ebenfalls eine eindeutige Signifikanz mit einem p-Wert von 0,0438. Die Ausstromraten hingegen

unterschieden sich nicht wesentlich voneinander ($2,484 \pm 0,12 / \text{s}$ im WT vs. $2,502 \pm 0,10 / \text{s}$ im KO).

Diese Ergebnisse deuten auf eine zusätzliche Freisetzung von Kalzium durch den Prozess des CICR aus dem Spine Apparat im WT hin, wohingegen dieser Mechanismus durch den Mangel einer solchen Organelle in der KO fehlt und dadurch zu kleineren Kalzium-Transienten führt.

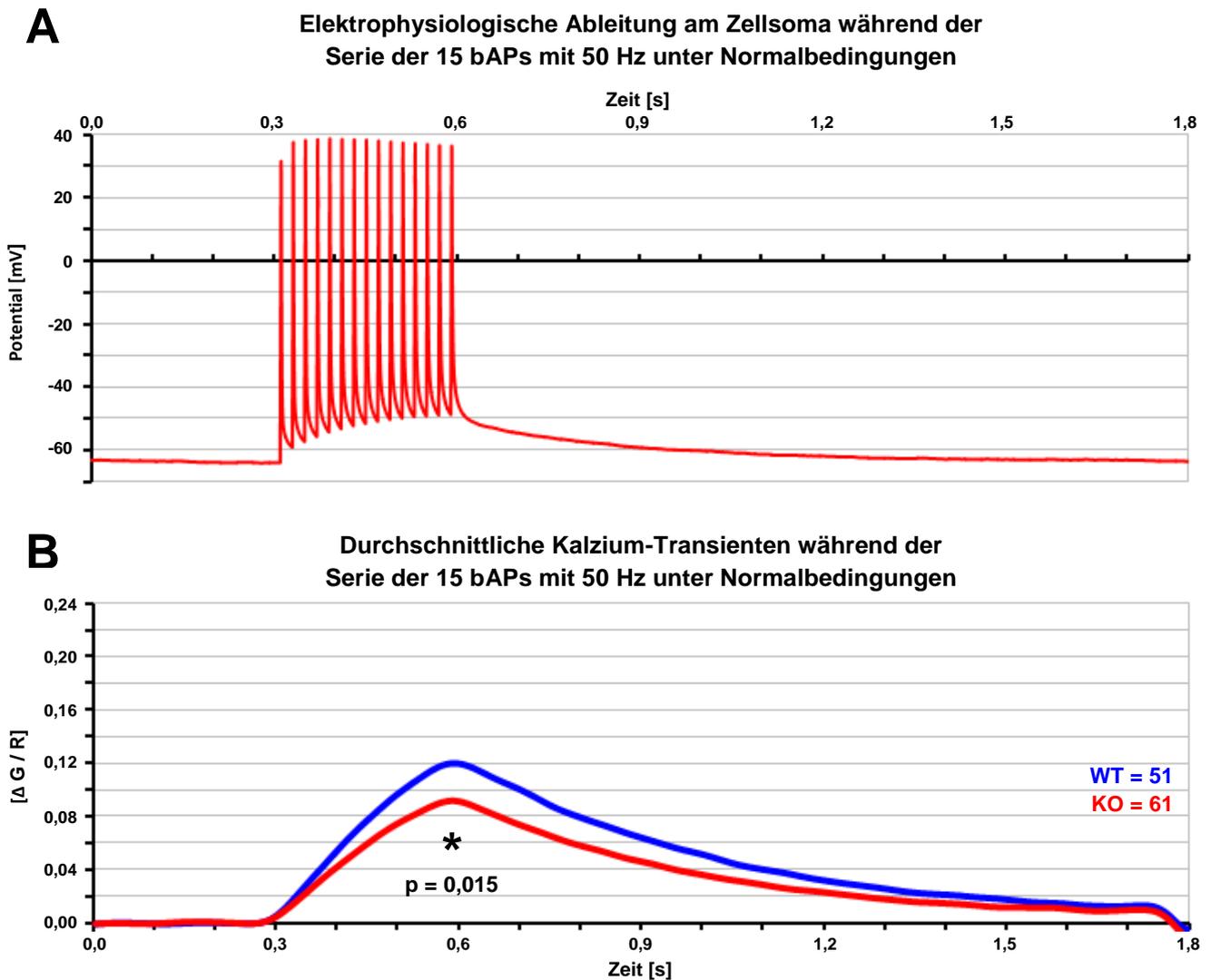


Abb. 4.10: Induzierte Abfolge von 15 bAPs mit einer Frequenz von 50 Hz zur Aktivierung von VGCCs; Auslösen der APs durch kurze depolarisierende Strompulse (im CC-Modus, 1-2 ms, 1,5 nA) im Soma der Mooszellen; 20 mM MNI-Glutamat im ACSF (Normalbedingung); **(A)** Darstellung einer elektrophysiologischen Ableitung (Potentiale) über eine Zeitdauer von 1,8 s; deutliche Depolarisation über 0 mV hinaus, keine Hyperpolarisation der APs; RMP rund -64 mV **(B)** Durchschnittliche erfolgreich gemessene Kalzium-Transienten ($\Delta G/R$) in den komplexen Spines als Antwort auf 15 bAPs bei 50 Hz; vergleichende Darstellung der Ergebnisse von Wildtyp (**WT – blaue Kurve**) und Synaptopodin Knock-out (**KO – rote Kurve**) mit den jeweiligen Angaben für die Anzahl der gemessenen Spines (n); signifikanter Unterschied der maximalen Amplituden mit (*) markiert ($\alpha = 0,05$); SEM und SD der Werte ersichtlich aus Tab. 7.8 im Anhang.

4.3.1.4. 24 bAPs mit 25 Hz

Nach den erfolgreichen Messungen der Kalzium-Transienten (15 bAPs mit 50 Hz) wurden anschließend Experimente mit 24 bAPs mit einer Frequenz von 25 Hz durchgeführt. Das Auslösen der Aktionspotentiale erfolgte ebenfalls durch Strominjektion am Soma und die gleichzeitig resultierende Kalzium-Antwort wurde in denselben Spines wie in den vorangegangenen Experimenten gemessen.

Aus einer beispielhaften elektrophysiologischen Ableitung am Soma der Zellen (siehe Abb. 4.11 unter A) konnte festgestellt werden, dass eine klare Depolarisation über 0 mV hinaus erfolgte und die Aktionspotentiale die charakteristische Kinetik der Mooszellen zeigten (keine Hyperpolarisation). Das Ruhemembranpotential hatte sich dabei im Vergleich mit den Experimenten mit 15 bAPs bei 50 Hz nicht wesentlich geändert und lag im Mittel im WT bei $-63,5 \pm 0,7$ mV ($n = 47$) und im KO bei $-63,2 \pm 0,6$ mV ($n = 54$).

Diese Kalzium-Transienten ($\Delta G/R$) hatten im Vergleich zu denen bei 15 bAPs eine geringere durchschnittliche maximale Amplitude (Abb. 4.11 – B und Tab. 7.8 / Anhang) mit Werten von $0,102 \pm 0,007$ ($n = 47$) im WT und von $0,072 \pm 0,005$ ($n = 54$) im KO. Auch bei diesen geringeren Amplituden war ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Genotypen feststellbar (Differenz WT zu KO von 29,4 %) und mit einem p-Wert von 0,0107 wurde das Signifikanzniveau ($\alpha = 0,05$) erreicht.

Im Allgemeinen erfolgte die Zunahme an Kalzium deutlich langsamer als in den Versuchen mit den 15 bAPs (siehe Tab. 7.9 im Anhang). Die Kalzium-Einstromraten ($\Delta G/R$ pro s) zeigten Werte von $0,277 \pm 0,019$ / s ($n = 47$) im WT und $0,219 \pm 0,031$ / s ($n = 54$) im KO und dieser Unterschied war ebenfalls signifikant ($p = 0,04586$). Bei der Betrachtung der Ausstromraten des Kalziums konnten keine großen Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden, allerdings entsprachen sie in etwa den Raten der vorangegangenen Versuche ($2,47$ / s vs. $2,48$ / s im WT oder $2,72$ / s vs. $2,50$ / s im KO).

Diese Ergebnisse sprechen gleichermaßen für eine Beteiligung des Spine Apparats an der Bildung der Kalzium-Transienten im WT und veränderter Kalzium-Signale im KO.

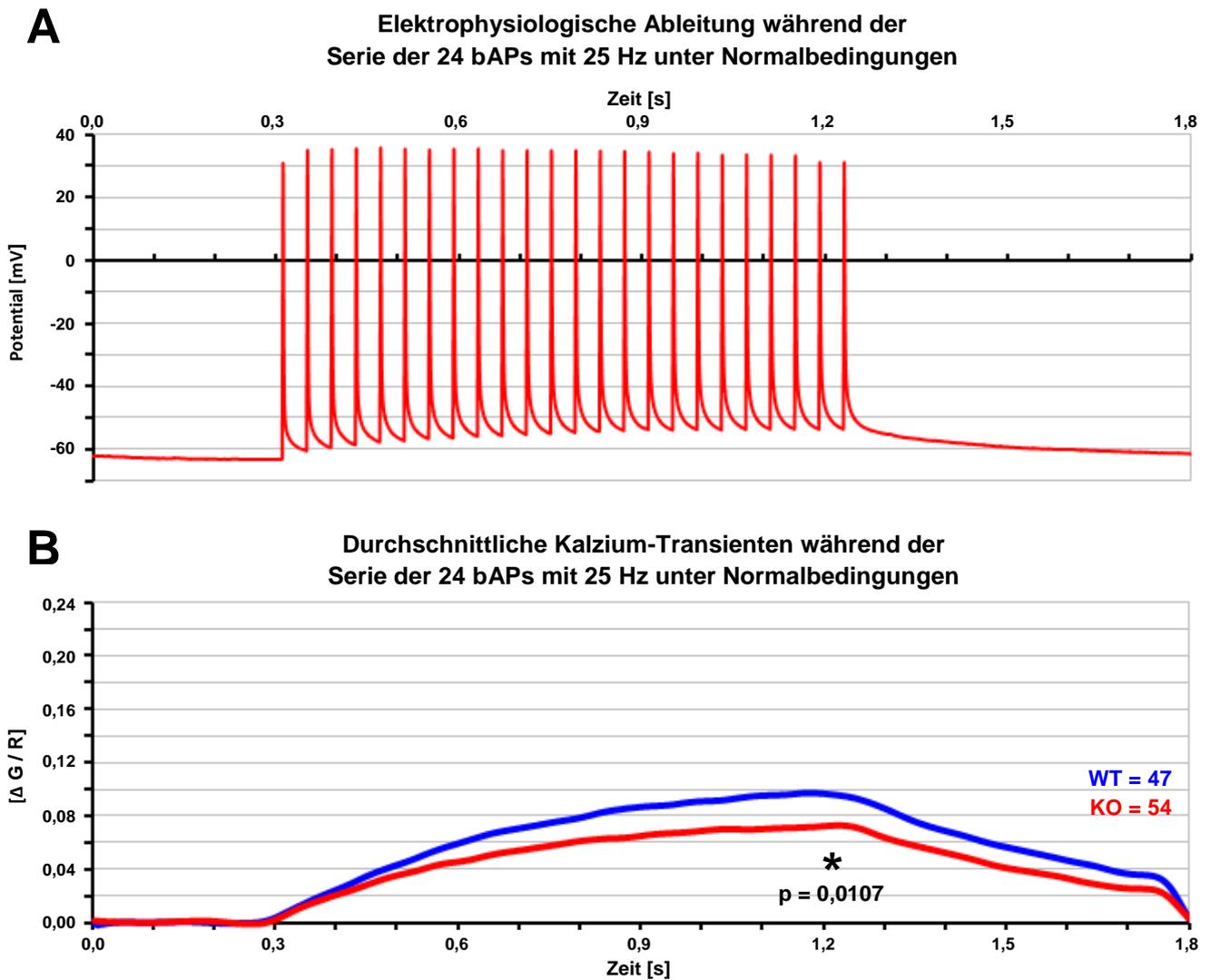


Abb. 4.11: Induzierte Abfolge von 24 bAPs mit einer Frequenz von 25 Hz; Auslösen der APs durch kurze depolarisierende Strompulse (im CC-Modus, 1-2 ms, 1,5 nA) im Soma der Mooszellen; 20 mM MNI-Glutamat im ACSF (Normalbedingung); **(A)** Darstellung einer elektrophysiologischen Ableitung (Potentiale) über eine Zeitdauer von 1,8 s; deutliche Depolarisation über 0 mV hinaus, keine Hyperpolarisation der APs; **(B)** Durchschnittliche gemessene Kalzium-Transienten ($\Delta G/R$) in den komplexen Spines als Antwort auf 24 bAPs bei 25 Hz; vergleichende Darstellung der Ergebnisse von Wildtyp (**WT – blaue Kurve**) und Synaptopodin Knock-out (**KO – rote Kurve**) mit den jeweiligen Angaben für die Anzahl der gemessenen Spines (n); signifikanter Unterschied der maximalen Amplituden mit (*) markiert ($\alpha = 0,05$); SEM und SD der Werte ersichtlich aus Tab. 7.8 im Anhang.

4.3.1.5. 24 uEPSPs (25 Hz) kombiniert mit 24 bAPs (25 Hz)

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Potenzierungs-Protokoll modifiziert angewendet, das durch eine niederfrequente Stimulation eine gezielte NMDA-Rezeptor-abhängige Langzeitpotenzierung (LTP) an der Moosfaser-Synapse postsynaptisch induziert (*Kwon und Castillo, 2008*).

Eine Abfolge von 24 einzeln induzierten EPSPs mit einer Frequenz von 25 Hz (erzeugt mittels Glutamat-Uncaging bei einer konstanten Laser-Leistung von 20,00 mW und 0,5 ms Pulsdauer) wurde kombiniert mit den oben bereits beschriebenen 24 bAPs mit 25 Hz (Strominjektion im Soma). Dabei wurden die Aktionspotentiale mit einer Zeitverzögerung von 10 ms auf die Uncaging-Ereignisse ausgelöst. Das Zeitintervall von 10 ms zwischen der synaptischen Aktivität und den Aktionspotentialen wurde gewählt, um eine Potenzierung an der Moosfaser-Synapse auszulösen, folgend den Experimenten zur Impuls- und zeitabhängigen Plastizität (STDP) von *Astori et al. (2010)*. Diese Kombination von Depolarisation (bAPs) und Glutamatbindung (Uncaging) führt zum Lösen des Magnesiumblocks und zur effektiven Öffnung des Kalzium-permeablen NMDA-Rezeptors. Dieser Kalzium-Einstrom ist Voraussetzung für einige Formen synaptische Plastizität, wobei große Mengen an Kalzium eine Potenzierung induzieren, wohingegen kleine Mengen eine Depression verursachen (*Abbott und Nelson, 2000*). Da in den hier durchgeführten Experimenten eine Potenzierung ausgelöst werden sollte, musste sichergestellt werden, dass eine ausreichend große Menge an Kalzium durch den NMDA-Rezeptor in den Spine einströmt.

In der Darstellung der elektrophysiologischen Ableitung der Zellen in Abb. 4.12 unter A sind die durch Uncaging induzierten Potentiale (uEPSPs) und bAPs, jeweils 24 mit einer Frequenz von 25 Hz, deutlich zu erkennen. Aus der in die Abbildung integrierten Vergrößerung der ersten drei kombinierten Ereignisse (uEPSP und bAP) ist erkenntlich, dass beim ersten Uncaging-Puls ein uEPSP mit einer Amplitude von circa 4 mV und im weiteren Verlauf Potentiale mit rund 2 mV erzeugt wurden. Außerdem waren die folgenden Aktionspotentiale mit einer Zeitverzögerung von 10 ms nach den synaptisch induzierten Signalen deutlich abgrenzbar. Das Ruhemembranpotential der Zellen lag dabei im WT bei $-63,5 \pm 0,8$ mV ($n = 38$) und im KO bei $-63,1 \pm 0,8$ mV ($n = 41$) und unterschied sich nicht zu den Versuchen mit den zwei verschiedenen Serien an bAPs.

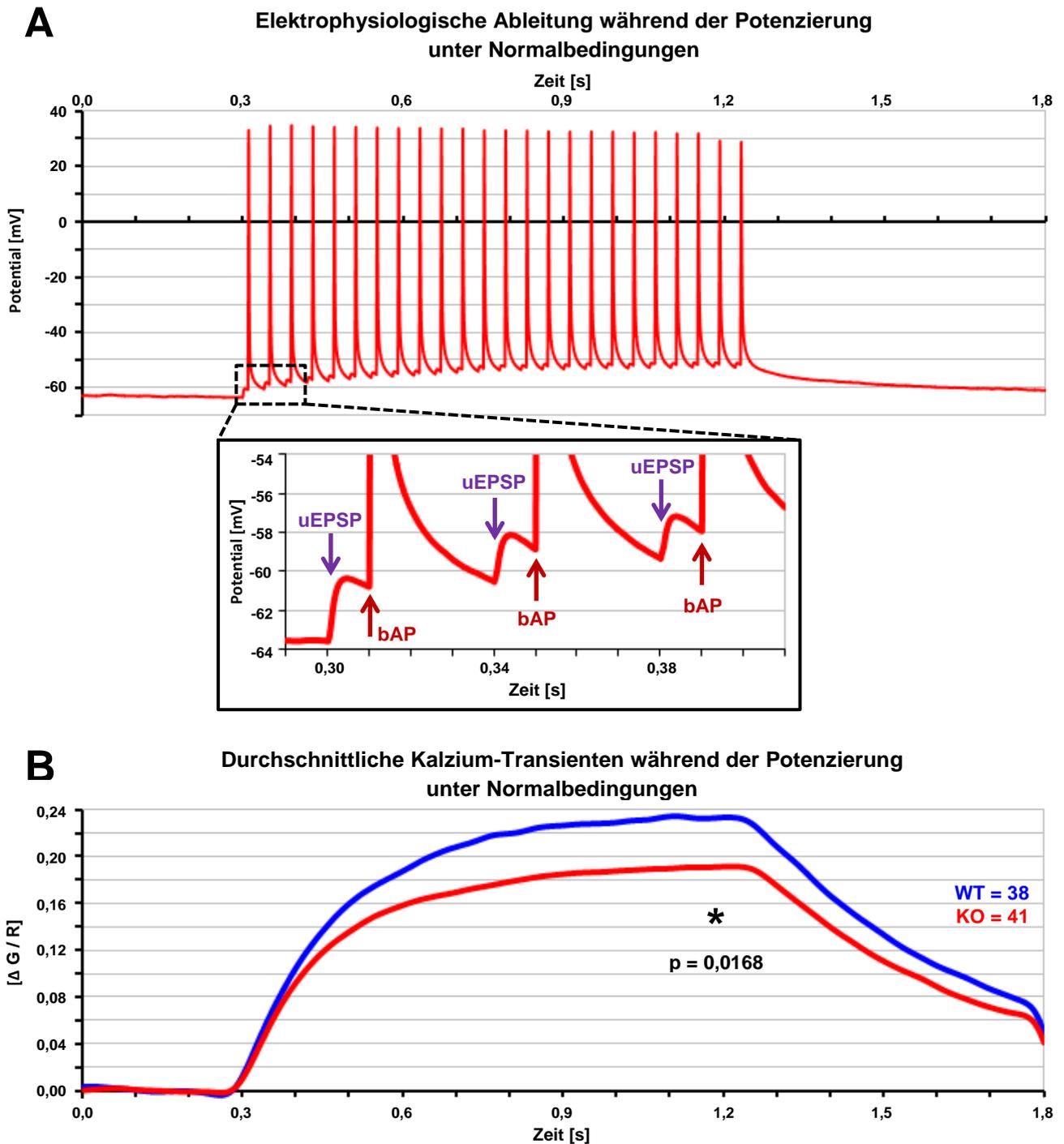


Abb. 4.12: Angewendetes NMDA-Rezeptor-abhängiges Potenzierungsprotokoll; 20 mM MNI-Glutamat im ACSF (Normalbedingung); Abfolge von 24 uEPSPs (Uncaging bei einer konstanten Laser-Leistung von 20,00 mW und 0,5 ms Pulsdauer) und mit einer Zeitverzögerung von 10 ms folgender bAPs (Strominjektion im Soma im CC-Modus, 1-2 ms, 1,5 pA) mit einer Frequenz von 25 Hz; **(A)** Darstellung der gemittelten elektrophysiologischen Ableitung (Potentiale) der Zellen; vergrößerter Ausschnitt der ersten drei kombinierten Ereignisse; **(B)** Mittlere gemessene Kalzium-Transienten ($\Delta G/R$) in den Spines als Antwort auf das Potenzierungsprotokoll; vergleichende Darstellung der Ergebnisse von **WT** (blaue Kurve) und Synpo **KO** (rote Kurve) mit den jeweiligen Angaben für die Anzahl der gemessenen Spines (n); signifikanter Unterschied der maximalen Amplituden mit (*) markiert ($\alpha = 0,05$); SEM und SD der Werte ersichtlich aus Tab. 7.10 im Anhang.

Die in diesen Experimenten gemessenen Kalzium-Transienten zeigten dementsprechend im Vergleich zu den Einzelereignissen sehr hohe durchschnittliche maximale Amplituden ($\Delta G/R$). Es wurden Werte von $0,2489 \pm 0,0154$ ($n = 38$) im Wildtyp und $0,1859 \pm 0,0127$ ($n = 41$) im Knock-out erreicht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die in den voran gegangenen Versuchen (nur 24 bAPs mit 25 Hz) erzielt wurden, war eine deutliche Steigerung der Amplituden zu erkennen. So nahm beispielsweise das maximale Kalzium im WT um rund 0,15 und KO um circa 0,11 zu. Bei dem Vergleich zwischen den beiden Genotypen konnte festgestellt werden, dass die Kalzium-Amplituden im KO erheblich geringer waren als im WT (siehe Abb. 4.12 – B und Tab. 7.10 im Anhang). Der Unterschied betrug zahlenmäßig 0,063, was eine prozentuale Differenz von 25,3 % bedeutete. Außerdem wurde mit einem p-Wert von 0,0168 eine deutliche Signifikanz erreicht.

Die Einstrom- und -Ausstromraten der Kalzium-Transienten ($\Delta G/R$ pro s) wurden ebenfalls berechnet und sind aus Tabelle 7.11 im Anhang zu entnehmen. Der Kalzium-Einstrom war im Vergleich zu den Versuchen mit den bAPs allein deutlich schneller. Es ergeben sich dabei Raten von $1,066 \pm 0,109 / s$ ($n = 38$) im WT und $0,772 \pm 0,069 / s$ ($n = 41$) im KO. Im Vergleich der Genotypen zueinander, konnte zwischen WT und KO kein signifikanter Unterschied bestimmt werden. Für die Ausstromraten ergaben sich zwischen den beiden Genotypen auch keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zu den vorhergegangenen Versuchen waren sie aber deutlich schneller mit Werten von $3,382 \pm 0,336 / s$ (WT, $n = 38$) und $3,415 \pm 0,283 / s$ (KO, $n = 41$).

Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde der vorhergegangenen Versuche. Es wurden ebenfalls Unterschiede von rund 25 % zwischen WT und KO gefunden, was auf eine zusätzliche Freisetzung von Kalzium aus dem Spine Apparat hindeutet.

4.3.2. Experimente unter dem NMDA-Rezeptor Blocker APV

Zusätzlich zum MNI-Glutamat (20 mM) wurde dem ACSF noch 200 μ M 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (APV) beigegeben. Dieser kompetitive und selektive Antagonist wirkt auf die NMDA-Rezeptoren bereits in geringen Konzentrationen hemmend. Unter diesen Bedingungen wurden ebenfalls durch das optische Freisetzen von Glutamat elektrophysiologische Einzel-Signale induziert und entsprechende Kalzium-Antworten im Spine aufgezeichnet.

4.3.2.1. Induzierte Einzel-Signale im Voltage-Clamp-Modus (uEPSCs) unter APV

Unter der Blockade der NMDA-Rezeptoren konnten erfolgreich postsynaptische Ströme durch Uncaging (uEPSCs) induziert werden.

Die durchschnittlichen maximalen Amplituden der uEPSCs beider Genotypen stiegen dabei mit zunehmender Laser-Leistung proportional an (siehe Abb. 4.13 – A und Tab. 7.1 / Anhang). Über alle Ergebnisse hinweg betrachtet, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Ein Beispiel für die gemittelten uEPSCs, induziert bei 21,79 mW, ist in Abb. 4.13 – C dargestellt. Im Vergleich zu den Experimenten unter Normalbedingungen (nur MNI im ACSF, kein Rezeptor Antagonist) war ersichtlich, dass beim WT die durchschnittlichen maximalen Amplituden der ersten drei Stufen fast identisch waren (siehe dazu auch Tab. 7.1 im Anhang). So erreichten zum Beispiel bei 10,00 mW die Amplituden Werte von -26,0 pA nur mit MNI und $-26,8 \pm 5,8$ pA ($n = 22$) mit APV oder bei der dritten Leistungs-Stufe (15,81 mW) von -74,5 pA mit MNI und $-71,4 \pm 11,3$ pA ($n = 23$) unter APV-Einfluss. Bei den restlichen drei Stufen waren die Amplituden leicht größer als unter Normalbedingungen und erzielten unter APV Einwirkung maximal $-134,8 \pm 18,9$ pA ($n = 23$) in der höchsten Uncaging-Stufe von 21,79 mW im Gegensatz zu -115,6 pA ohne Blocker. Im KO hingegen konnten in allen Stufen deutlich größere mittlere Amplituden als unter Normalbedingungen gemessen werden. Beispielsweise wurden uEPSCs erreicht beginnend mit minimal $-45,3 \pm 10,4$ pA ($n = 24$) bei 10,00 mW (unter Normalverhältnissen -29,3 pA) bis hin zu maximal $-150,5 \pm 18,0$ pA ($n = 23$) bei 21,79 mW (hingegen nur -94,3 pA ohne Blocker).

Wie aus der Abb. 4.13 – B zu erkennen ist (Messwerte sind ersichtlich im Anhang in Tab. 7.1), nahmen auch die 20 % - 80 % Anstiegsraten der uEPSCs mit den Uncaging-Stufen

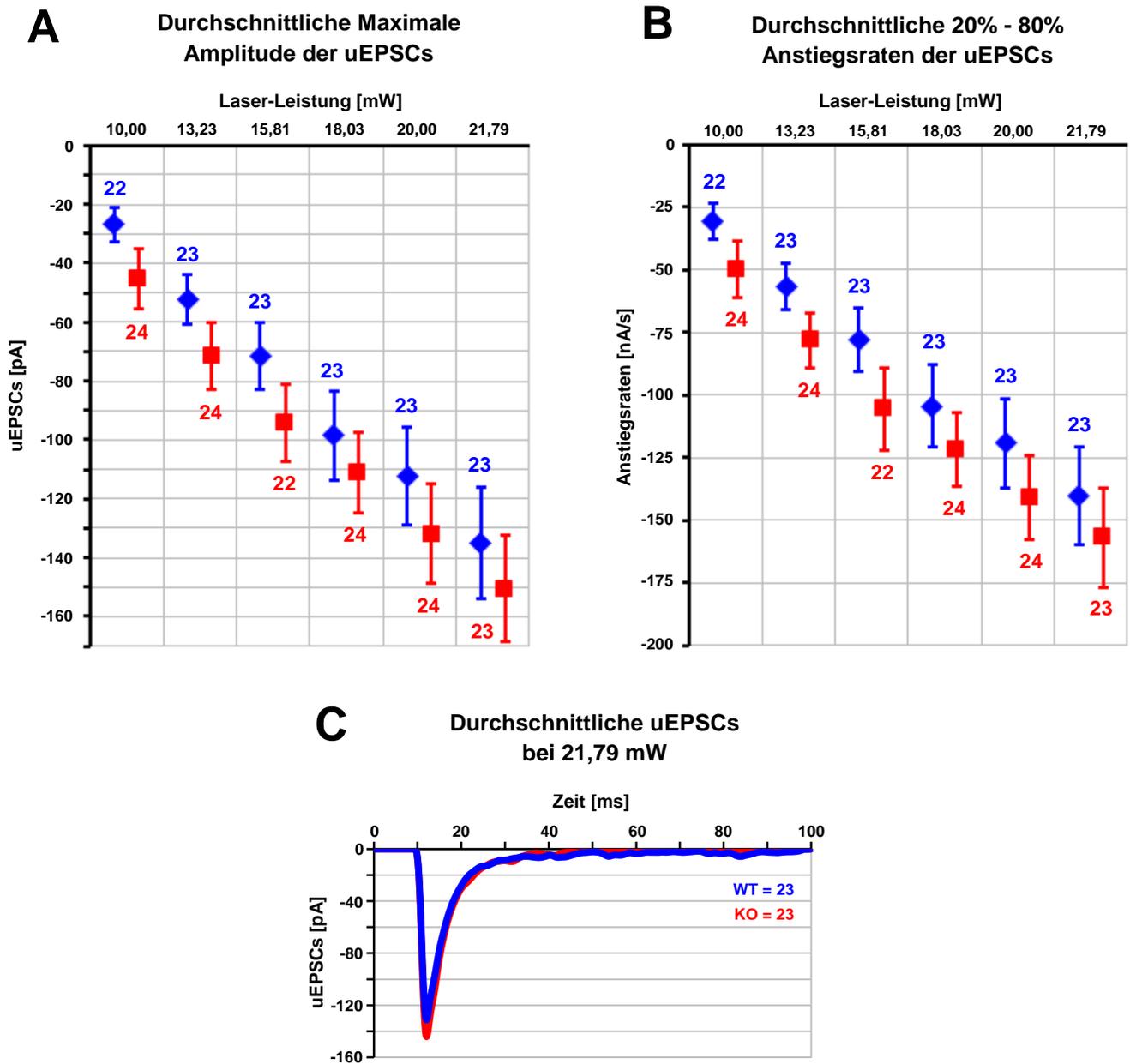


Abb. 4.13: Elektrophysiologische Einzel-Signale gemessen im VC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung; 20 mM MNI-Glutamat und 200 μ M APV (NMDA-Rezeptor Blocker) im ACSF enthalten; vergleichende Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von **WT** (blaue Raute) und **KO** (rotes Quadrat); Zahlenangaben über den Werten in der jeweiligen Farbe entsprechen der Anzahl (n) der erfolgreich gemessenen Spines; **(A)** maximale durchschnittliche Amplitude der mittels Uncaging ausgelösten exzitatorischen postsynaptischen Ströme (uEPSCs) in Abhängigkeit von der Laser-Leistung; **(B)** entsprechende 20% - 80% Anstiegsraten der unter A gemessenen uEPSCs über alle Uncaging-Stufen; **(C)** Darstellung des durchschnittlichen Stroms beider Genotypen in der höchsten Leistungs-Stufe von 21,79 mW.

annähernd linear zu, was für beide Genotypen zutrif. Auch bei diesem untersuchten Parameter waren keine signifikanten Unterschiede zu finden. Passend zu den bereits beschriebenen Werten der maximalen Amplituden zeigten auch die Werte der Anstiegsraten des WT ein sehr ähnliches Verhältnis vergleichend zu den Experimenten ohne Rezeptor Antagonist. Die Raten waren ebenfalls in den ersten drei Stufen nur leicht erhöht und in den letzten Stufen waren die Zunahmen etwas deutlicher ausgeprägt. Im Knock-out fielen diese Unterschiede gegenüber den Normalbedingungen wieder deutlicher aus, z.B. beginnend mit $-49,9 \pm 11,1$ nA/s ($n = 24$) gegenüber $-31,4$ nA/s (MNI) in der kleinsten Stufe (10,00 mW), wurde die größte Differenz zwischen den Raten mit Werten von $-156,9 \pm 19,7$ nA/s ($n = 23$) und $-102,0$ nA/s (MNI) bei der stärksten Uncaging-Leistung von 21,79 mW erreicht.

Im Allgemeinen war auffällig, dass bei beiden Genotypen die Standard-Fehler und -Abweichung (siehe Tab. 7.1 / Anhang) der maximalen Amplituden als auch der 20 % - 80 % Anstiegsraten über alle Uncaging-Stufen deutlich größer ausgefallen sind als unter Normalbedingungen. Allerdings wurden unter APV Einwirkung deutlich weniger Zellen (im Schnitt 23 Spines im WT und 24 im KO gegenüber 75 bzw. 84 ohne Blocker) gemessen.

Wie aus der integrierten Tabelle unter B der Abb. 4.14 erkenntlich ist, reagierten im Allgemeinen weniger Zellen auf einen Uncaging-Puls zusätzlich zu einem elektro-physiologischen Signal auch noch mit einem gleichzeitigen Kalzium-Einstrom in den Spine. Bei der kleinsten Leistungs-Stufe zeigten im Wildtyp nur 23 % (nur fünf Spines von insgesamt 22) und im Knock-out nur 25 % (sechs Spines von 24) der gemessenen Spines überhaupt einen Kalzium-Transienten als Antwort auf den Uncaging-Puls. Der prozentuale Anteil nahm in beiden Gruppen mit zunehmender Laser-Leistung immerhin zu und endete bei der höchsten Stufe von 21,79 mW bei 57 % im WT und 65 % im KO. Vergleichend zu der Verteilung unter Normalbedingungen war eine Reduktion der mit Kalzium antwortenden Spines zu erkennen und zwar um rund ein Drittel, denn unter den Experimenten ohne Blocker lagen die Anteile bei 93 % im WT und 90 % im KO.

Dabei stagnierten die maximalen mittleren Amplituden ($\Delta G/R$) der Kalzium-Transienten (siehe Abb. 4.14 – A und Tab. 7.2 / Anhang) bei den ersten Stufen auf einem sehr geringen Level, um Werte von 0,006 für beide Genotypen, und nahmen mit ansteigender Leistung nur noch geringfügig zu. So wurden maximale Amplituden von rund 0,012 im WT und in der KO in der jeweils höchsten Uncaging-Stufe erreicht. Im Vergleich mit den vorangegangenen Experimenten ohne Antagonist blieben die Ergebnisse allerdings einheitlich um die Werte der kleinsten Stufe von 10,00 mW, wo bereits eine maximale Amplitude von 0,012 bzw. 0,014 (WT vs. KO) bestimmt wurde. Die deutliche Reduktion der maximalen Amplituden ist gut bei den

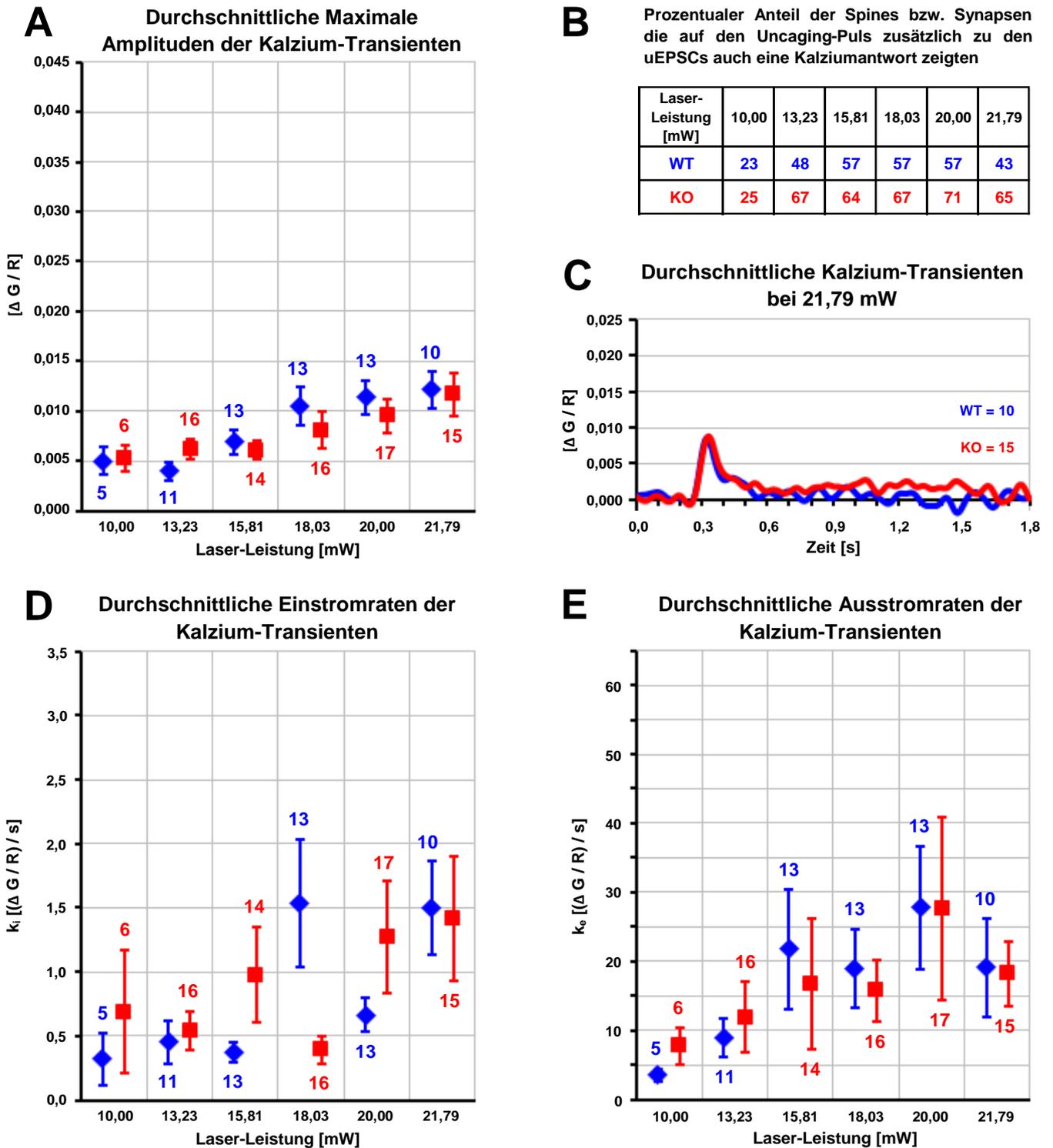


Abb. 4.14: Kalzium-Antworten der Einzel-Signale im VC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung; 20 mM MNI-Glutamat und 200 μ M APV im ACSF; vergleichende Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von **WT** (blaue Raute) und **KO** (rotes Quadrat); Zahlenangaben über den Werten entsprechen der Anzahl (n) der erfolgreich gemessenen Kalzium-Antworten; **(A)** Durchschnittliche maximale Amplituden ($\Delta G/R$) der Kalzium-Transienten; **(B)** Prozentualer Anteil der Spines, die auf einen Uncaging-Puls zusätzlich zu einem Strom eine gleichzeitige Kalzium-Antwort zeigten; **(C)** Darstellung eines gemittelten Kalzium-Transienten beider Genotypen bei 21,79 mW; Werte der Einstrom- k_i **(D)** und Ausstromraten k_e **(E)** für die durchschnittlichen Kalzium-Transienten.

gemittelten Kalzium-Transienten bei 21,79 mW Abb. 4.14 – C im Vergleich zu den Versuchen der Normalbedingung zu erkennen. Zwischen den beiden Genotypen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Für die beiden Parameter der Kalzium-Einstrom- und Ausstromraten ($\Delta G/R$ pro s) galt, dass die Verteilung über die Uncaging-Stufen keinem klaren Muster folgte (siehe Abb. 4.14 in D und E sowie im Anhang Tab. 7.3). Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte zwischen den beiden Genotypen nicht festgestellt werden. Durch die relativ kleine Anzahl der Spines mit einer Kalzium-Antwort und die hohe Variabilität der Signale (große SEM und SD) in allen Uncaging-Stufen haben diese Ergebnisse allerdings eine geringe Aussagekraft.

Durch die elektrophysiologischen Ergebnisse konnte gut die schnelle Komponente der synaptischen Transmission, die durch den AMPA-Rezeptor vermittelt wird, aufgelöst werden. Außerdem zeigten die Ergebnisse der Kalzium-Antworten, dass der Kalzium-Einstrom in den Spine während der synaptischen Transmission hauptsächlich durch den NMDA-Rezeptor erfolgte, da unter APV ein Großteil der Kalzium-Signale geblockt werden konnte.

4.3.2.2. Induzierte Einzel-Signale im Current-Clamp-Modus (uEPSPs) unter APV

Wie bereits in den Experimenten unter Normalbedingungen durchgeführt, wurden nach erfolgreicher optischer Glutamat-Freisetzung im VC die elektrophysiologischen Signale und Kalzium-Antworten im CC für die gleichen sechs Leistungs-Stufen bestimmt.

Über die einzelnen Uncaging-Stufen hinweg lag im Durchschnitt aller gemessenen Zellen das RMP für den WT bei -62,7 mV und für den KO bei -62,9 mV (siehe Abb. 4.15 unter D) und unterschied sich damit nicht groß von den gemessenen Werten unter der Normalbedingung (Vergleich unter Tab. 4 im Anhang).

Die durch Uncaging induzierten Potentiale (uEPSPs) zeigten auch unter diesen Messbedingungen eine lineare Zunahme der gemittelten maximalen Amplituden mit zunehmenden Laser-Leistungen vor allem im KO. Im WT kam es ab der vierten Uncaging-Stufe zu einer eher sublinearen Zunahme (siehe Abb. 4.15 – A und Tab. 7.5 im Anhang). Auffällig für die Werte des Wildtyps war, dass in fast allen Leistungs-Stufen die Amplituden im Schnitt rund 0,2 mV bis 0,6 mV unter den Ergebnissen ohne APV lagen. Nur bei dem größten Uncaging-Level von 21,79 mW waren die Werte mit $4,9 \pm 0,6$ mV ($n = 23$) gegenüber 4,7 mV (nur MNI) leicht erhöht. Anders verhielt es sich mit den Messungen im KO, wo alle uEPSPs größere mittlere Amplituden als unter Normalbedingung aufwiesen. So zeigten die Werte

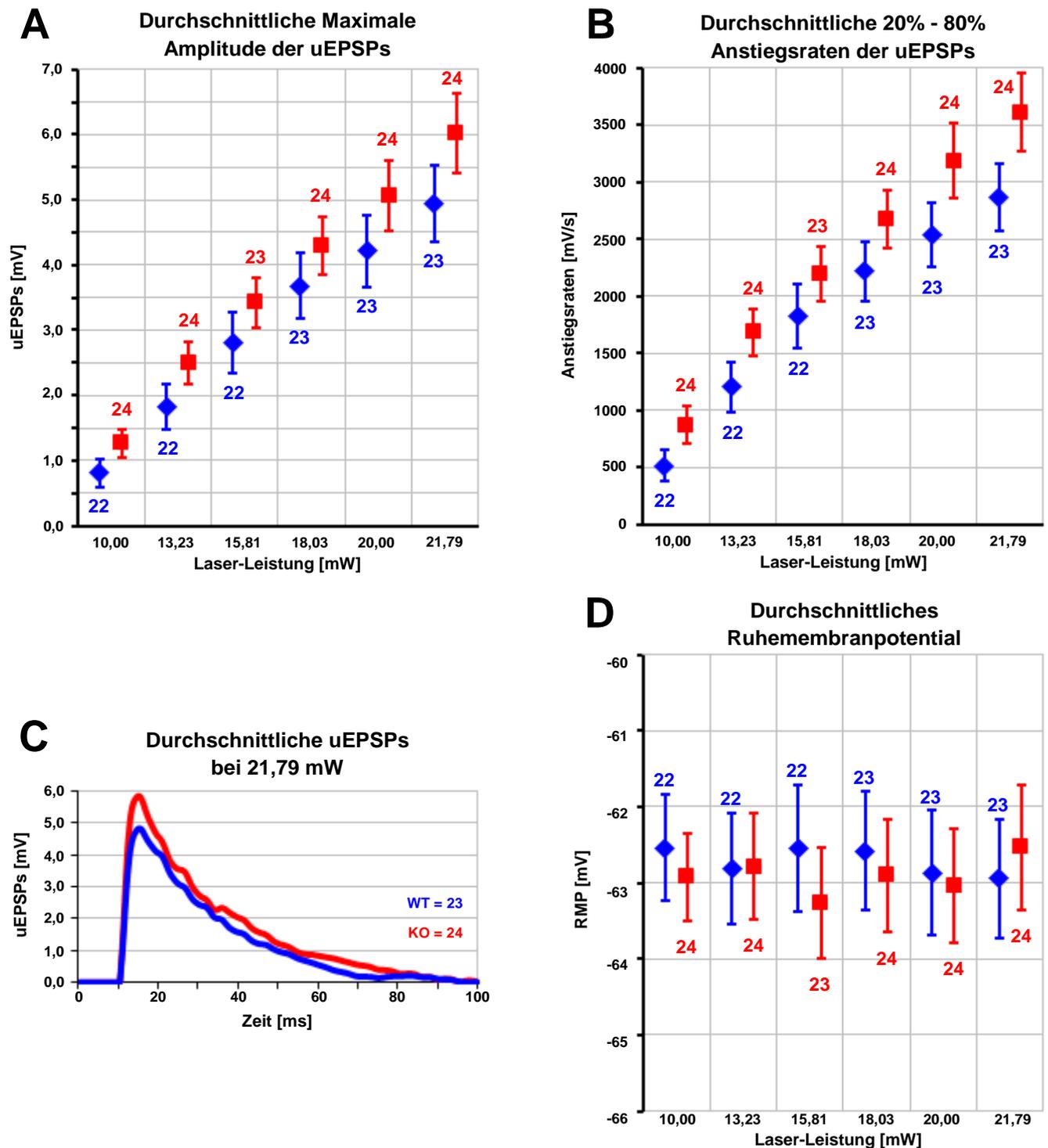


Abb. 4.15: Elektrophysiologische Einzel-Signale gemessen im CC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung; 20 mM MNI-Glutamat und 200 μ M APV (NMDA-Rezeptor Blocker) im ACSF; vergleichende Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von **WT (blaue Raute)** und **KO (rotes Quadrat)**; Zahlenangaben über den Werten entsprechen der Anzahl (n) der erfolgreich gemessenen Spines; **(A)** maximale durchschnittliche Amplitude der mittels Uncaging ausgelösten exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (uEPSPs) in Abhängigkeit von der Laser-Leistung; **(B)** entsprechende 20 % - 80 % Anstiegsraten der unter A gemessenen uEPSPs; **(C)** Darstellung eines durchschnittlichen Stroms beider Genotypen in der höchsten Uncaging-Stufe von 21,79 mW; **(D)** durchschnittliches RMP über alle Uncaging-Stufen hinweg.

vergleichend zur Normalbedingung den kleinsten Unterschied von 0,1 mV (mit APV $1,3 \pm 0,2$ mV, $n = 24$ und mit MNI 1,2 mV) in der ersten Leistungs-Stufe und die maximale Differenz von 1,8 mV (APV mit $6,0 \pm 0,6$ mV, $n = 24$ und MNI mit 4,1 mV) in der größten Stufe. Die gemittelten Potentiale bei 21,79 mW der beiden Genotypen im Vergleich sind in Abb. 4.14 – C dargestellt. Allerdings waren die Standard-Fehler (und auch -Abweichungen) deutlich erhöht im Vergleich zu den Normalbedingungen, bei reduzierter Anzahl der gemessenen Zellen. Zwischen den beiden Genotypen traten in den gesamten Uncaging-Stufen keine signifikante Unterschiede zwischen den maximalen Amplituden auf.

Entsprechend zu den maximalen Amplituden verhielten sich auch die 20 % - 80 % Anstiegsraten der Potentiale in beiden Genotypen, z.B. konnte ebenfalls eine lineare Zunahme der Werte über die Uncaging-Stufen hinweg im KO und ab der vierten Stufe einen sublinearen Anstieg im WT festgestellt werden. Im WT waren außerdem die Raten in den ersten fünf Stufen im Vergleich zu den Versuchen ohne Blocker auch deutlich geringer und nur in der letzten Stufe leicht erhöht (siehe Abb. 4.15 – B und die Messwerte in Tab. 7.5 im Anhang). Die gesamten Anstiegs-Raten im KO hingegen waren im Vergleich zu den Normalbedingungen zu Beginn leicht und am Ende deutlich erhöht, was in Übereinstimmung mit den erhöhten maximalen Amplituden war. Auch in diesen Versuchen konnten größere Standard-Fehler für beide Genotypen festgestellt werden, allerdings fiel auch die Anzahl der gemessenen Spines im Vergleich zu den Experimenten ohne Blocker geringer aus. Zwischen WT und KO gab es bei den Anstiegsraten der uEPSPs keine signifikanten Unterschiede.

Aus der integrierten Tabelle in Abb. 4.16 – B ist zu erkennen, dass der prozentuale Anteil der Spines, die als Reaktion auf einen Uncaging Puls zusätzlich zu einem postsynaptischen erregenden Potential auch einen Kalzium-Transienten zeigten, im Vergleich zu den Versuchen unter Normalbedingungen deutlich reduziert war. So wurden in der höchsten Uncaging-Stufe von 21,79 mW Quoten im WT von nur 57 % und im KO von 67 % erreicht im Gegensatz zu 85 % bzw. 82 % ohne Blocker. Die ermittelten prozentualen Verteilungen beider Genotypen waren dabei in etwa mit denen vergleichbar, die in den vorangegangenen Voltage-Clamp Messungen (uEPSC) gefunden wurden.

Die gemessenen Kalzium-Transienten nahmen ebenfalls für beide Genotypen mit zunehmender Laser-Leistung nur leicht in ihren durchschnittlichen maximalen Amplituden ($\Delta G/R$) zu (siehe Abb. 4.16 – A und Tab. 7.6 / Anhang). So wurden im WT die größten Amplituden von $0,011 \pm 0,003$ ($n = 11$) bei 20,00 mW und im KO $0,012 \pm 0,002$ ($n = 16$) bei 21,79 mW erreicht. Vergleichend mit den Kalzium-Transienten in den Experimenten ohne NMDA-Rezeptor Blocker konnte festgestellt werden, dass die maximal gemessenen mittleren

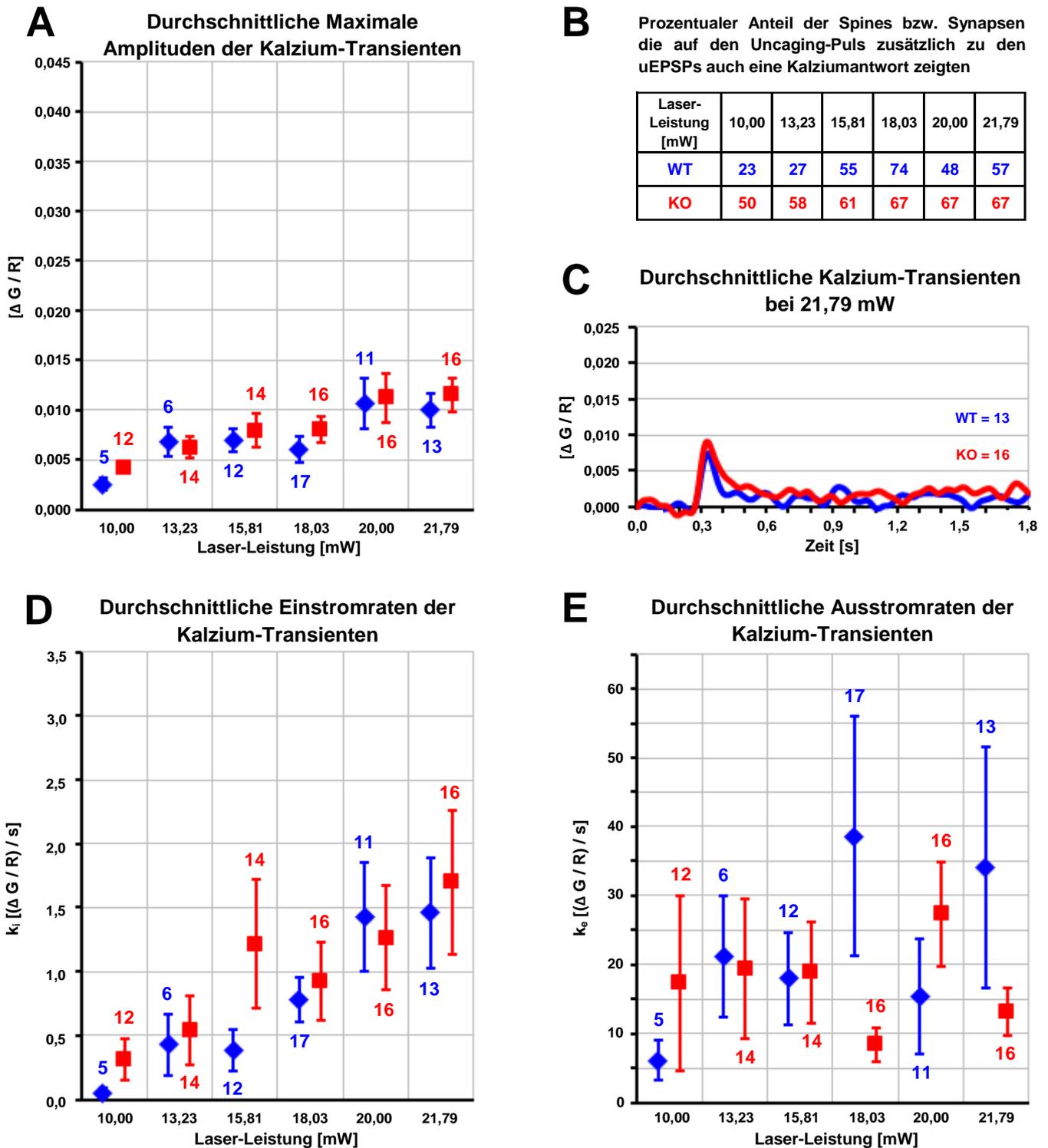


Abb. 4.16: Kalzium-Antworten der Einzel-Signale im CC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung; 20 mM MNI-Glutamat und 200 μ M APV; vergleichende Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von **WT** (blaue Raute) und **KO** (rotes Quadrat); Zahlenangaben über den Werten entsprechen der Anzahl (n) der gemessenen Kalzium-Antworten; **(A)** Durchschnittliche maximale Amplituden ($\Delta G/R$) der gemessenen Kalzium-Transienten; **(B)** Prozentualer Anteil der Spines, die auf einen Uncaging-Puls zusätzlich zu einem Potential eine gleichzeitige Kalzium-Antwort zeigten; **(C)** Darstellung eines durchschnittlichen Kalzium-Transienten beider Genotypen bei 21,79 mW; Werte der Einstrom- k_i **(D)** und Ausstromraten k_e **(E)** für die durchschnittlichen Kalzium-Transienten.

Amplituden beider Genotypen unter dem Niveau der kleinsten Uncaging-Stufe (vergleichend dazu 0,013 im WT und 0,016 im KO mit MNI) lagen. Dies ist auch gut zu erkennen im Vergleich der gemittelten Kalzium-Transienten der jeweiligen Versuche (siehe Abb. 4.16 – C für APV). Es fand sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen WT und KO.

Aufgrund der geringeren Anzahl der gemessenen Spines mit einem Kalzium-Transienten konnten keine klaren Verteilungsmuster bei den Parametern der Kalzium-Einstromraten und -Ausstromraten hergestellt werden (Werte siehe Abb. 4.16 in D und E sowie im Anhang unter Tab. 7.7). Die Raten für den Kalzium-Einstrom beider Genotypen nahmen dabei über die Uncaging-Stufen hinweg zu und lagen zumeist unter den Raten, die unter Normalbedingungen ermittelt wurden. Die Werte für die Ausstromraten dagegen zeigten eine größere Variabilität. Die Standard-Fehler und -Abweichungen der Raten beider Parameter waren zum Teil ebenfalls sehr groß. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen konnte nicht festgestellt werden.

Aus den Ergebnissen im CC-Modus können die gleichen Schlussfolgerungen wie im VC-Modus gezogen werden. Es wurde ebenfalls die schnelle, AMPAR-vermittelte Komponente der synaptischen Transmission aufgelöst und der NMDA-Rezeptor als Hauptquelle des Kalzium-Einstroms in den Spine bestimmt.

4.3.2.3. 24 uEPSPs (25 Hz) kombiniert mit 24 bAPs (25 Hz) unter APV

Das bereits unter Normalbedingungen beschriebene Potenzierungsprotokoll zur Induktion des NMDAR-abhängigen LTPs wurde ebenfalls unter dem Einfluss des NMDA-Rezeptor Blockers APV angewendet.

Eine beispielhafte elektrophysiologische Ableitung mit der Abfolge der durch Uncaging induzierten 24 uEPSPs und ausgelösten bAPs mit einer jeweiligen Frequenz von 25 Hz ist in Abbildung 4.17 – A dargestellt. In der Ausschnitts-Vergrößerung der ersten drei kombinierten Events ist zu erkennen, dass sehr deutliche und große EPSPs ausgelöst werden konnten, die sich klar zu den mit 10 ms Zeitverzögerung erzeugten APs abgrenzten. Der erste Uncaging-Puls induzierte dabei ein uEPSP mit einer durchschnittlichen Amplitude von mehr als 4 mV und im Weiteren wurden Potentiale von rund 2 mV erreicht. Damit unterschied sich die mittlere elektrophysiologische Kurve im Wesentlichen nicht zu der, die bei den Versuchen ohne einen pharmakologischen Blocker ermittelt wurde. Außerdem konnten ähnlich Werte für das RMP

bestimmt werden, mit Potentialen im WT von $-65,4 \pm 1,2$ mV ($n = 15$) und im KO von $-64,5 \pm 0,8$ mV ($n = 18$).

Im Vergleich zu den Normalbedingungen waren für beide Genotypen die maximalen mittleren Amplituden (max. $\Delta G/R$) der Kalzium-Transienten deutlich verringert. Wie aus der Tabelle 7.10 (im Anhang) und der Abbildung 4.17 – B ersichtlich, erreichte der WT nur einen maximalen Wert von $0,152 \pm 0,015$ ($n = 15$) im Gegensatz zu $0,249$ unter MNI und der KO von $0,134 \pm 0,013$ ($n = 18$) vs. $0,186$ ohne Blocker. Zwischen den beiden Genotypen selbst bestand eine nominelle Differenz von $0,018$ (WT zu KO, entspricht $11,83\%$), die allerdings kein statistisches Signifikanzlevel erreichte. Dieser Unterschied fiel damit kleiner aus, als unter den Experimenten ohne Blocker zu beobachten war.

Des Weiteren konnte registriert werden, dass die Raten des Kalzium-Einstroms ($\Delta G/R$ pro s) in beiden Genotypen gegenüber der Normalbedingung eine sehr deutliche Verlangsamung aufwiesen. So lag die Rate im Wildtyp bei $0,441 \pm 0,041$ / s ($n = 15$) gegenüber $1,066$ in den Versuchen ohne Blocker und im Knockout $0,421 \pm 0,035$ / s ($n = 18$) vergleichend zu $0,772$ / s. Der gleiche Sachverhalt, eine klare Reduktion der Raten beider Genotypen im Gegensatz zur Normalbedingung, traf auch für die Kalzium-Ausstromraten zu. Es wurde ein Wert im WT von $2,584 \pm 0,311$ / s ($n = 15$) und im KO von $2,401 \pm 0,398$ / s ($n = 18$) bestimmt gegenüber $3,382$ / s und $3,415$ / s (WT und KO) nur mit MNI-Glutamat als ACSF Zusatz. Die Unterschiede zwischen den beiden Genotypen fielen hingegen für beide Parameter sehr gering aus und erlangten auch keine Signifikanz (p-Werte sind im Anhang in Tab. 7.11 aufgelistet).

Aus diesen Ergebnissen kann der Anteil des Kalzium-Einstroms durch den NMDAR-Kanal abgeschätzt werden. Im Vergleich zu den Versuchen unter Normalbedingung kann der Unterschied in den maximalen Amplituden von $0,093$ im WT und $0,052$ im KO auf die Blockierung des Rezeptors zurückgeführt werden. Die Differenz in diesem Effekt zwischen den Genotypen weist darauf hin, dass im WT zusätzlich zum direkten Einstrom von Kalzium durch den NMDA-Rezeptor eine verstärkte Freisetzung von Kalzium aus dem Spine Apparat erfolgt, die in der KO fehlt.

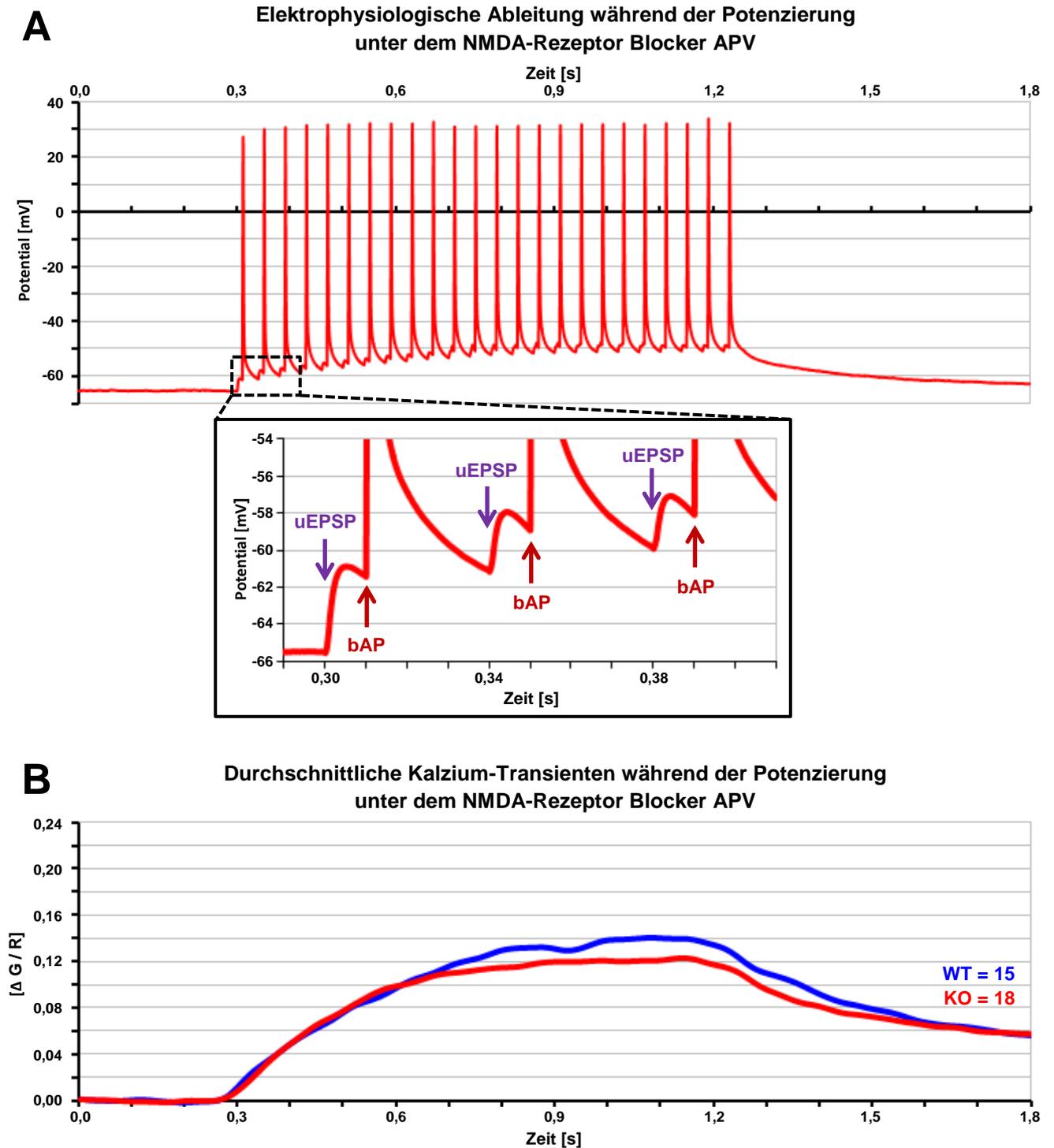


Abb. 4.17: Angewendetes NMDA-Rezeptor-abhängiges Potenzierungsprotokoll; 20 mM MNI-Glutamat und 200 μ M APV im ACSF; Abfolge von 24 uEPSPs (Uncaging bei einer konstanten Laser-Leistung von 20,00 mW und 0,5 ms Pulsdauer) und mit einer Zeitverzögerung von 10 ms folgender bAPs (Strominjektion im Soma im CC-Modus, 1-2 ms, 1,5 pA) mit einer Frequenz von 25 Hz; **(A)** Darstellung der gemittelten elektrophysiologischen Ableitung (Potentiale) der Zellen; vergrößerter Ausschnitt der ersten drei kombinierten Ereignisse; **(B)** Mittlere gemessene Kalzium-Transienten ($\Delta G/R$) in den Spines als Antwort auf das Potenzierungsprotokoll; vergleichende Darstellung der Ergebnisse von **WT (blaue Kurve)** und Synpo **KO (rote Kurve)** mit den jeweiligen Angaben für die Anzahl der gemessenen Spines (n); SEM und SD der Werte ersichtlich aus Tab. 7.10 im Anhang.

4.3.3. Experimente unter dem AMPA-Rezeptor Blocker CNQX

In einer weiteren Serie an Kontrollversuchen wurde außer MNI-Glutamat (20 mM) noch zusätzlich 20 μ M 6-Cyano-7-nitrochinoxalin-2,3-dion (CNQX) dem ACSF beigegeben. Unter diesem kompetitiven AMPA- und Kainat-Rezeptor Antagonist konnten ebenfalls Einzel-Signale im VC- und CC-Modus mittels Glutamat-Uncaging induziert und ein Potenzierungsprotokoll angewendet werden.

4.3.3.1. Induzierte Einzel-Signale im Voltage-Clamp-Modus (uEPSCs) unter CNQX

Während der Blockade der AMPA-Rezeptoren durch CNQX konnten exzitatorische postsynaptische Ströme (uEPSCs) in den jeweiligen Uncaging-Stufen ausgelöst und am Soma aufgezeichnet werden.

Diese Ströme erreichten allerdings nur sehr kleine durchschnittliche maximale Amplituden im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen. So wurde im WT die kleinste Amplitude bei 13,23 mW mit $-5,7 \pm 1,8$ pA ($n = 11$) und ein Maximum von $-12,1 \pm 2,4$ pA ($n = 11$) in der vierten Leistungs-Stufe bestimmt. Vergleichend mit dem WT fielen die mittleren Amplituden im KO in den jeweiligen Stufen im Allgemeinen noch etwas kleiner aus. Die Werte waren dabei am kleinsten bei 10,00 mW mit $-4,2 \pm 1,3$ pA ($n = 12$) und am größten mit durchschnittlich $-8,4 \pm 1,7$ pA ($n = 11$) bei 20,00 mW. Außerdem konnte festgestellt werden, dass im KO mit zunehmender Laser-Leistung die mittleren Amplituden leicht anstiegen, wie in Abb. 4.18 – A und im Anhang in Tab. 7.1 zu erkennen ist. Für den WT zeigten sich dagegen zwischen den einzelnen Stufen einige Schwankungen der maximalen Amplitude. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen beider Genotypen erlangten kein Signifikanzlevel.

Im Vergleich zu den vorangegangenen Messungen unter Normalbedingung oder unter APV Einfluss wurden weit geringere maximale Amplituden bestimmt. Im WT gab es z.B. Unterschiede von rund 104 pA (vergleiche $-8,0$ pA unter CNQX mit $-115,6$ pA ohne jeden pharmakologischen Blocker) und in der KO von 86 pA ($-8,3$ pA gegenüber $-94,3$ pA), die jeweils in der höchsten Stufe erreicht wurden. Gegenüber den Experimenten unter Einwirkung von APV zeigten die Ergebnisse noch größere Unterschiede. So konnten Differenzen (APV gegenüber CNQX) der maximalen Ströme in der höchsten Uncaging-Stufe von rund 123 pA (WT) bzw. 142 pA (KO) gebildet werden. Die Anzahl der gemessenen Zellen bzw. Spines (im

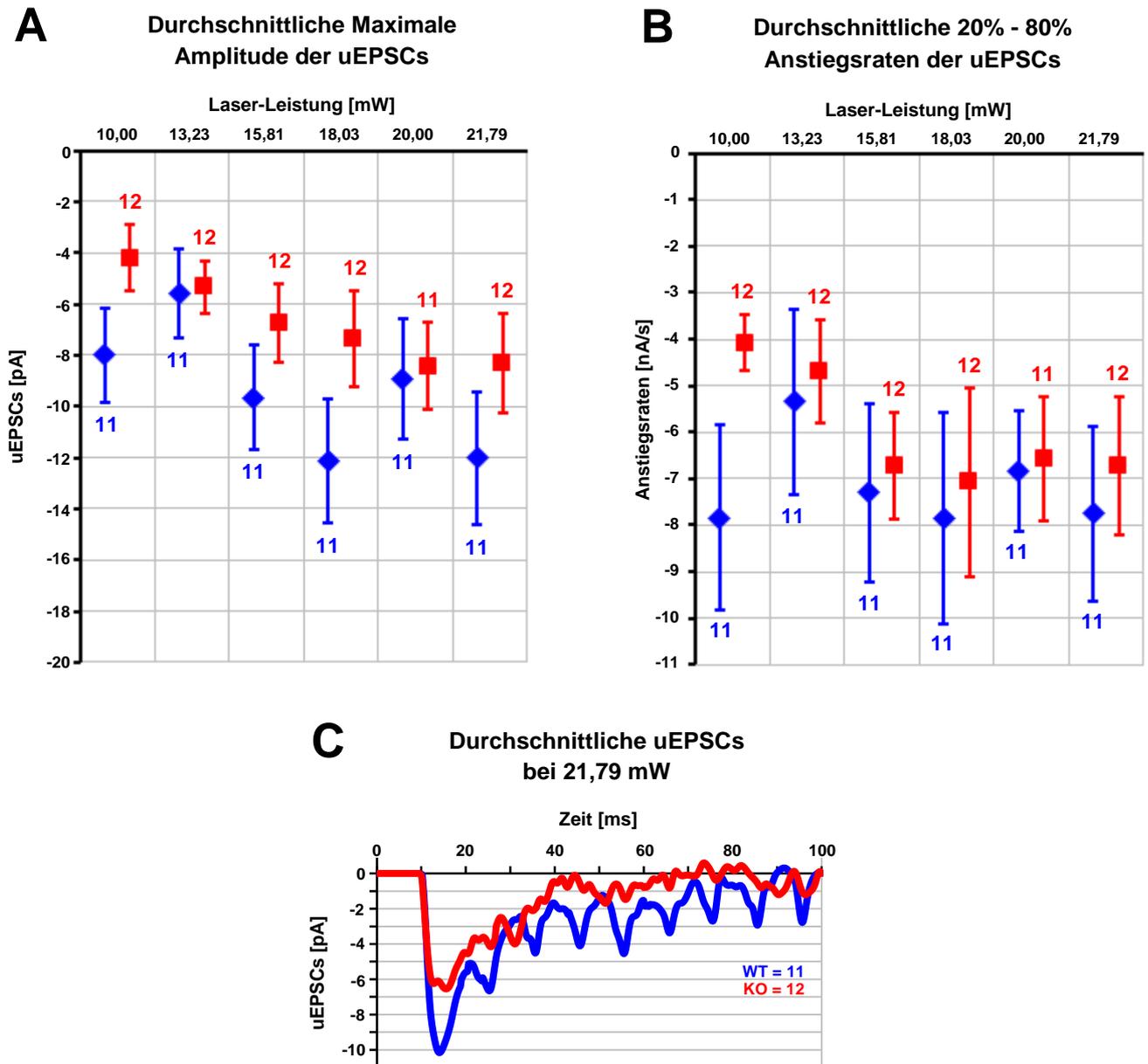


Abb. 4.18: Elektrophysiologische Einzel-Signale gemessen im VC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung; 20 mM MNI-Glutamat und 20 μ M CNQX (AMPA-Rezeptor Blocker) im ACSF enthalten; vergleichende Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von **WT** (blaue Raute) und **KO** (rotes Quadrat); Zahlenangaben über den Werten in der jeweiligen Farbe entsprechen der Anzahl (n) der erfolgreich gemessenen Spines; **(A)** maximale durchschnittliche Amplitude der mittels Uncaging ausgelösten exzitatorischen postsynaptischen Ströme (uEPSCs) in Abhängigkeit von der Laser-Leistung; **(B)** entsprechende 20 % - 80 % Anstiegsraten der unter A gemessenen uEPSCs über alle Uncaging-Stufen; **(C)** Darstellung des durchschnittlichen Stroms beider Genotypen in der höchsten Leistungs-Stufe von 21,79 mW; die Oszillationen kommen durch die kleine Anzahl der hier gemittelten Stromkurven zustande.

Schnitt 10-12) war unter diesen experimentellen Bedingungen allerdings erheblich geringer als in den vorangegangenen Experimenten.

Die 20 % - 80 % Anstiegsraten der uEPSCs waren in beiden Genotypen im Gegensatz zu den Normalbedingungen stark verlangsamt (siehe Abb. 4.18 – B). Im KO nahmen dabei die Raten in den ersten Uncaging-Stufen noch zu und ab der dritten Stufe blieben sie auf einem Niveau von rund 6,7 mV/s. Im WT dagegen konnten zwischen den einzelnen Stufen deutliche Schwankungen in den Raten festgestellt werden (die Messwerte der einzelnen Stufen sind aus Tab. 7.1 im Anhang zu entnehmen). Zum Vergleich wurden unter Normalbedingungen Raten von rund -29 bis -123 nA/s im WT und -31 bis -102 nA/s in der KO bestimmt. Unter Einfluss von APV fielen die Unterschiede mit Raten von circa -31 bis -140 nA/s (WT) und -50 bis -157 nA/s (KO) noch gravierender aus. Bei den Anstiegsraten der uEPSCs gab es wie bereits bei den maximalen Amplituden keine signifikanten Unterschiede.

Die deutlich verringerten Amplituden und langsamen Anstiegsraten sind auch gut in der Gegenüberstellung der gemittelten uEPSCs von WT und KO in der größten Uncaging-Stufe von 21,79 mW Abb. 4.18 – C zu erkennen.

Der prozentuale Anteil der Spines, die zusätzlich zu einem elektrophysiologischen Signal auf einen Uncaging-Puls auch mit einem Kalzium-Transienten reagierten, ist aus der kleinen Tabelle in Abb. 4.19 – B abzulesen. Im Vergleich zu den gefundenen Anteilen unter Normalbedingungen waren die Werte ein wenig reduziert, z.B. in der letzten Stufe im WT erfolgte eine Reduktion von 93 % ohne Blocker zu 73 % unter CNQX Einwirkung und im KO von 90 % zu 75 %. Allerdings wurden in anderen Stufen maximale Anteile von 91 % und sogar 100 % (WT und KO) gefunden. Eine deutliche Erhöhung des Anteils der mit Kalzium antwortenden Spines in allen Uncaging-Stufen konnte allerdings im Vergleich zu den Versuchen mit APV festgestellt werden. So zeigten Spines z.B. bereits in der kleinsten Leistungsstufe von 10,00 mW mit 64 % bzw. 50 % (WT bzw. KO) gegenüber 23 % bzw. 25 % (APV) einen entsprechenden Kalzium-Einstrom. Die Gesamtanzahl der gemessenen Spines unter CNQX war jedoch noch geringer als mit APV.

Auch wenn die Anzahl der erfolgreich gemessenen Spines relativ gering ausfiel, war dennoch ein Anstieg der maximalen durchschnittlichen Amplituden der Kalzium-Transienten ($\Delta G/R$) in beiden Genotypen mit zunehmender Laser-Leistung zu erkennen (siehe Abb. 4.19 – A und Tab. 7.2 / Anhang). Dabei wurde im KO bei den ersten beiden Uncaging-Stufen ein annähernd gleiches Kalzium-Niveau von 0,006 erreicht und ab der zweiten bis fünften Stufe folgte die Zunahme der Amplitude einem linearen Verlauf. Im WT nahm das maximale Kalzium von der ersten bis zur dritten Stufe linear zu und erreichte einen maximalen Wert von $0,028 \pm 0,008$ ($n = 6$) bei 20,00 mW. Vergleichend mit den Experimenten ohne einen Rezeptor

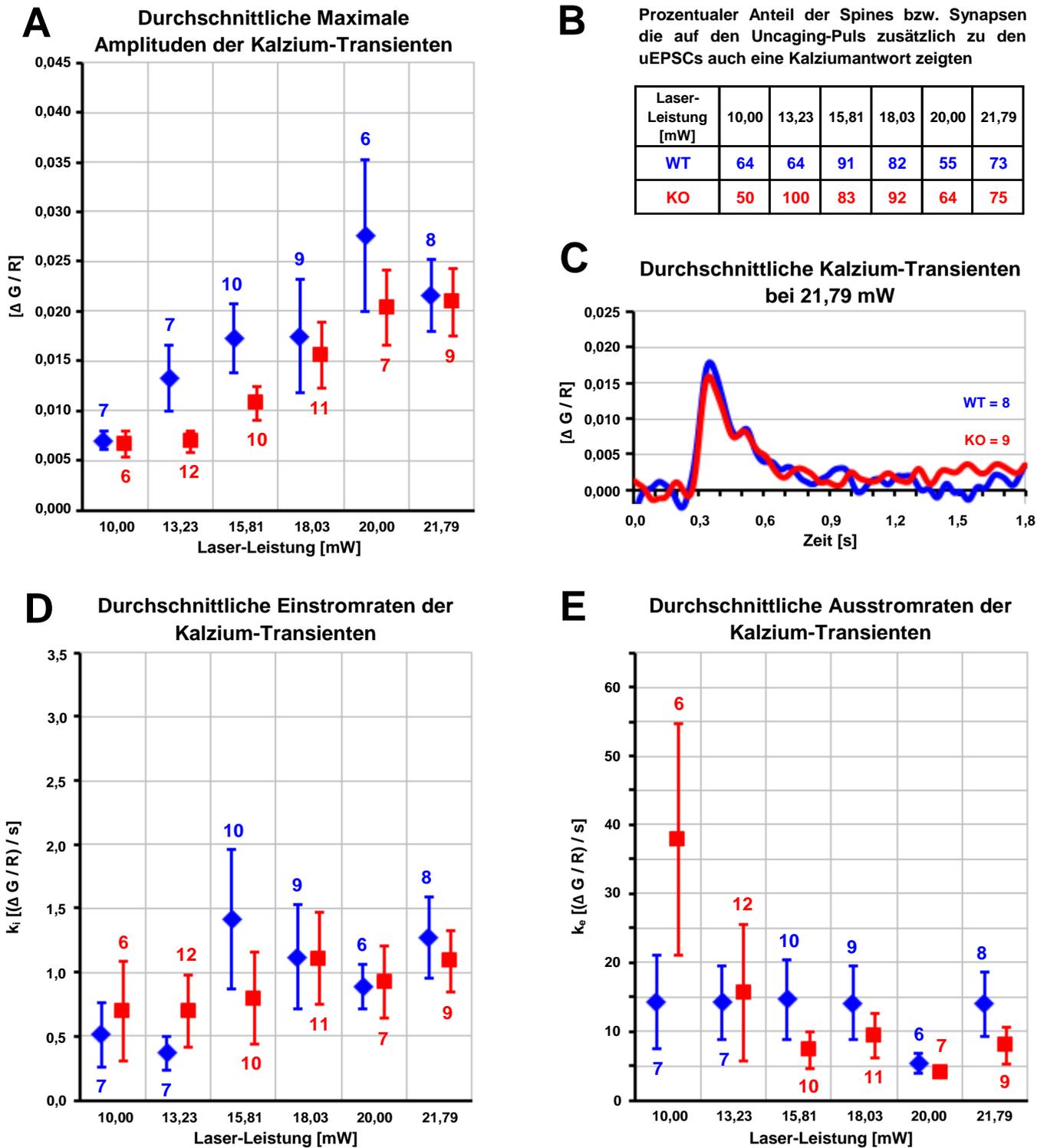


Abb. 4.19: Kalzium-Antworten der Einzel-Signale im VC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung; 20 mM MNI-Glutamat und 20 μ M CNQX im ACSF; vergleichende Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von **WT (blaue Raute)** und **KO (rotes Quadrat)**; Zahlenangaben über den Werten entsprechen der Anzahl (n) der erfolgreich gemessenen Kalzium-Antworten; **(A)** Durchschnittliche maximale Amplituden ($\Delta G/R$) der Kalzium-Transienten; **(B)** Prozentualer Anteil der Spines, die auf einen Uncaging-Puls zusätzlich zu einem Strom eine gleichzeitige Kalzium-Antwort zeigten; **(C)** Darstellung eines gemittelten Kalzium-Transienten beider Genotypen bei 21,79 mW; Werte der Einstrom- k_i **(D)** und Ausstromraten k_e **(E)** für die durchschnittlichen Kalzium-Transienten.

Blocker wurden jedoch in beiden Genotypen allgemein geringere mittlere Amplituden gemessen, was auch gut im Vergleich der gemittelten Kalzium-Transienten bei 21,79 mW zu erkennen ist (siehe Abb. 4.19 – C). Die Werte (Messwerte siehe Tab. 7.2 im Anhang) lagen dabei gerade in der kleinsten Stufe mit $0,007 \pm 0,001$ ($n = 7$) gegenüber 0,012 im WT und mit $0,007 \pm 0,001$ ($n = 6$) vs. 0,014 in der KO deutlich unter den Ergebnissen der Messungen in der Normalbedingung. In einigen höheren Stufen fielen die Unterschiede zwischen den Messwerten nicht mehr so deutlich aus. So wurden z.B. im WT bei 20,00 mW exakt gleiche maximale Amplituden von 0,028 erreicht. Im Vergleich zu den ersten Kontrollversuchen (Blockade der NMDA-Rezeptoren durch APV) konnte allerdings eine deutliche Erhöhung der maximalen mittleren Amplituden der Kalzium-Transienten festgestellt werden. Eine Ausnahme davon konnte in der zweiten Uncaging-Stufe im KO gefunden werden, in der fast identische Werte bestimmt wurden. Auch unter diesen experimentellen Voraussetzungen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen beider Genotypen zu ermitteln.

Trotz der zum Teil geringen Anzahl der gemessenen Spines zeigten die Kalzium-Einstromraten ($\Delta G/R$ pro s) kaum Schwankungen. Sie lagen in einem Bereich von 0,32 / s bis 1,42 / s im WT und 0,70 / s bis 1,11 / s im KO (siehe Abb. 4.19 unter D und E sowie in Tab. 7.3 im Anhang). Für den Parameter der Ausstromraten galt vor allem im WT, dass die Raten, bis auf den einen Wert in der fünften Uncaging-Stufe, auf einem konstanten Niveau von circa 14,2 / s lagen. Im KO waren die Raten über einen größeren Bereich verteilt. Die Standardfehler waren zum Teil erneut sehr hoch und eine Signifikanz zwischen den beiden Gruppen nicht vorhanden.

Aus den elektrophysiologischen Ergebnissen dieser Kontrollversuche konnte gut die langsame Komponente der synaptischen Transmission, die durch den NMDA-Rezeptor vermittelt wird, aufgelöst werden. Außerdem wird der Kalzium-Einstrom in den Spine während der synaptischen Transmission nicht oder nur wenig durch die Blockade der AMPA-Rezeptoren verändert.

4.3.3.2. Induzierte Einzel-Signale im Current-Clamp-Modus (uEPSPs) unter CNQX

Nach erfolgreicher Durchführung der Experimente im VC schlossen sich Messungen am gleichen Spine unter denselben Uncaging-Bedingungen im CC an. Die Anzahl der untersuchten Spines war dabei wie schon im vorangegangenen Messmodus relativ gering, vor allem in Bezug auf die Kalzium-Antworten.

Das RMP, das während der Versuche in den einzelnen Uncaging-Stufen bestimmt wurde, lag im Durchschnitt aller gemessenen Zellen im WT bei -62,8 mV und im KO bei -63,5 mV (siehe Abb. 4.20 unter D) und unterschied sich damit nicht groß von den gemessenen Werten der vorangegangenen Experimente (Vergleich unter Tab. 4 im Anhang).

Die induzierten postsynaptischen Potentiale (uEPSPs) besaßen eine sehr kleine durchschnittliche Amplitude, die über die sechs Leistungsstufen hinweg in beiden Genotypen dennoch leicht zunahm (siehe Abb. 4.20 unter A). Dabei folgte die Zunahme einem annähernd linearen Verlauf. Die Amplituden des WTs waren im Vergleich ein klein wenig größer als die des KOs (siehe im Anhang Tab. 7.5), mit Ausnahme der kleinsten Uncaging-Stufe, in der Potentiale von $0,15 \pm 0,04$ mV ($n = 10$) im WT bzw. $0,18 \pm 0,03$ mV ($n = 11$) im KO bestimmt wurden. In der höchsten Leistungsstufe von 21,79 mW wurden schließlich die maximalen Amplituden von $0,72 \pm 0,17$ mV (WT, $n = 10$) und $0,65 \pm 0,13$ mV (KO, $n = 12$) erreicht. Die Unterschiede zwischen den beiden Genotypen erreichten jedoch in keiner Uncaging-Stufe das Signifikanzlevel.

Vergleichend zu den Normalbedingungen ist die Reduktion der Potentiale in diesen Kontrollversuchen deutlich zu erkennen. Die ermittelten Differenzen (ohne Blocker zu CNQX) lagen bei 0,88 mV (WT) und 1,0 mV (KO) in der kleinsten Stufe und erreichten 4,00 mV bzw. 3,49 mV (WT bzw. KO) in der höchsten Stufe. Die Unterschiede zwischen den maximalen Amplituden fallen noch deutlicher im Vergleich zu den Versuchen unter APV aus, in denen z.B. Differenzen in der höchsten Leistungsstufe von circa 4,2 mV und 5,4 mV (WT und KO) zwischen den beiden Bedingungen bestimmt werden konnten.

Die 20 % - 80 % Anstiegsraten der uEPSPs waren im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen (ohne Blocker und APV) extrem verlangsamt (siehe Abb. 4.20 – B und vergleichend mit den beiden anderen Versuchsbedingungen in Tab. 7.5 im Anhang). So wurden zum Beispiel in der letzten Stufe (21,79 mW) im WT lediglich Raten von $212,1 \pm 57,6$ mV/s ($n = 10$) im Gegensatz zu 2769,1 mV/s unter Normalbedingung oder 2864,3 mV/s unter Einfluss von APV und im KO $175,0 \pm 28,9$ mV/s ($n = 12$) gegenüber 2447,4 mV/s und 3607,4 mV/s erzielt. Wie auch bereits bei den mittleren Amplituden festgestellt wurde, nahmen die Raten ebenfalls in einem annähernd linearen Verhältnis über die Uncaging-Stufen hinweg zu, jedoch im WT kam es ab der vierten Stufe zu einem sublinearen Anstieg. Die Anstiegsraten im WT waren im Allgemeinen in allen Leistungsstufen größer als im KO, allerdings erreichten die Unterschiede zwischen den Genotypen keine statistische Signifikanz.

Die deutliche Reduktion der maximalen Amplituden und verlangsamteten Anstiegsraten sind auch gut in den gemittelten Potentialverläufen der beiden Genotypen bei der größten Uncaging-Stufe in Abb. 4.20 – C zu erkennen.

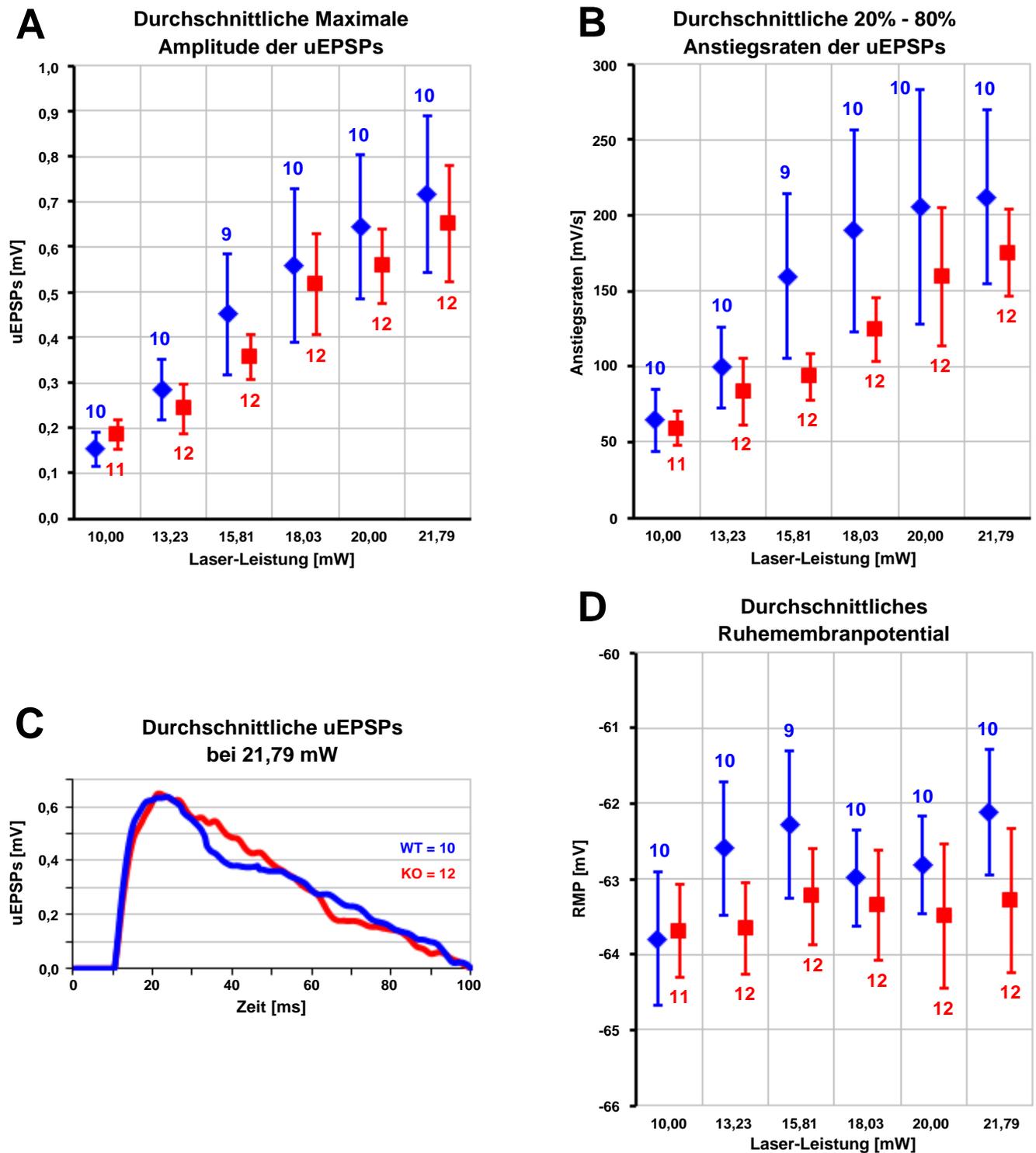


Abb. 4.20: Elektrophysiologische Einzel-Signale gemessen im CC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung; 20 mM MNI-Glutamat und 20 μ M CNQX (AMPA-Rezeptor Blocker) im ACSF; vergleichende Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von **WT (blaue Raute)** und **KO (rotes Quadrat)**; Zahlenangaben über den Werten entsprechen der Anzahl (n) der erfolgreich gemessenen Spines; **(A)** maximale durchschnittliche Amplitude der mittels Uncaging ausgelösten exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (uEPSPs) in Abhängigkeit von der Laser-Leistung; **(B)** entsprechende 20 % - 80 % Anstiegsraten der unter A gemessenen uEPSPs; **(C)** Darstellung eines durchschnittlichen Stroms beider Genotypen in der höchsten Uncaging-Stufe von 21,79 mW; **(D)** durchschnittliches RMP über alle Uncaging-Stufen hinweg.

Zusätzlich zu den elektrophysiologischen Signalen wurden ebenfalls in einigen Spines entsprechende Kalzium-Transienten durch das Uncaging ausgelöst. Die prozentualen Anteile der mit Kalzium antwortenden Spines nahmen im WT von 50 % bis maximal 80 % und im KO von 55 % bis maximal 92 % zu (siehe integrierte Tabelle in Abb. 4.21 – B). Damit wurden im CC-Modus ähnliche Anteile gefunden wie vorher bereits im CC-Modus. Im Vergleich zu den anderen beiden Experimentgruppen (ohne jedweden Blocker und mit APV) war zu erkennen, dass die Verteilung ähnlich ist wie unter Normalbedingung und außerdem in beiden Genotypen höhere Anteile als unter APV-Einfluss erreicht wurden.

Die durchschnittlichen maximalen Amplituden der Kalzium-Transienten ($\Delta G/R$) näherten sich in etwa den ermittelten Werten unter Normalbedingungen an (Messwerte siehe Anhang Tab. 7.6), blieben aber zumeist unter diesen. Bei der kleinsten Stufe von 10,00 mW konnten Transienten ausgelöst werden, die Amplituden von $0,007 \pm 0,004$ ($n = 5$) im WT und $0,015 \pm 0,005$ ($n = 6$) in der KO aufwiesen. Mit ansteigender Laser-Leistung nahmen die maximalen Amplituden für den WT deutlich zu bis maximal $0,032 \pm 0,010$ ($n = 5$) in der höchsten Uncaging-Stufe (siehe Abb. 4.21 – A). Im KO konnte beobachtet werden, dass sich die Amplituden über die ersten vier Uncaging-Stufen hinweg auf einem ähnlichen Niveau von rund 0,016 befanden und danach leicht anstiegen bis maximal $0,022 \pm 0,004$ ($n = 10$) in der höchsten Leistungsstufe. Darüber hinaus konnten zumeist deutlich höhere Amplituden im Vergleich zu den Höchstwerten der Experimente unter APV Einfluss (WT 0,011 und KO 0,012) gemessen werden.

Über allen Stufen hinweg wurde außerdem bei den mittleren Kalzium-Amplituden kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen festgestellt. Ein Beispiel für die gemittelten Kalzium-Transienten beider Genotypen bei der Uncaging-Stufe von 21,79 mW ist in Abb. 4.21 – C zu finden.

Die ermittelten Werte ($\Delta G/R$ pro s) für die beiden Parameter der Kalzium-Einstromraten und -Ausstromraten (siehe Abb. 4.21 unter D und E sowie in Tab. 7.7 / Anhang) bewegten sich in etwa im gleichen Bereich, wie bereits in den anderen beiden Versuchsbedingungen festgestellt. Allerdings waren große Schwankungen bzw. Standardfehler (sehr groß vor allem für den KO) und kein klarer Zusammenhang innerhalb der Raten zu erkennen. Für beide Parameter galt außerdem, dass zwischen den Raten von WT und KO kein signifikanter Unterschied bestand.

Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde, die bereits unter den VC-Messungen gefunden wurden. So konnte die langsame, NMDAR-vermittelte Komponente der synaptischen Signale isoliert werden und durch die Blockade der AMPAR wurde der Kalzium-Einstrom in den Spine während der synaptischen Transmission nur wenig verändert.

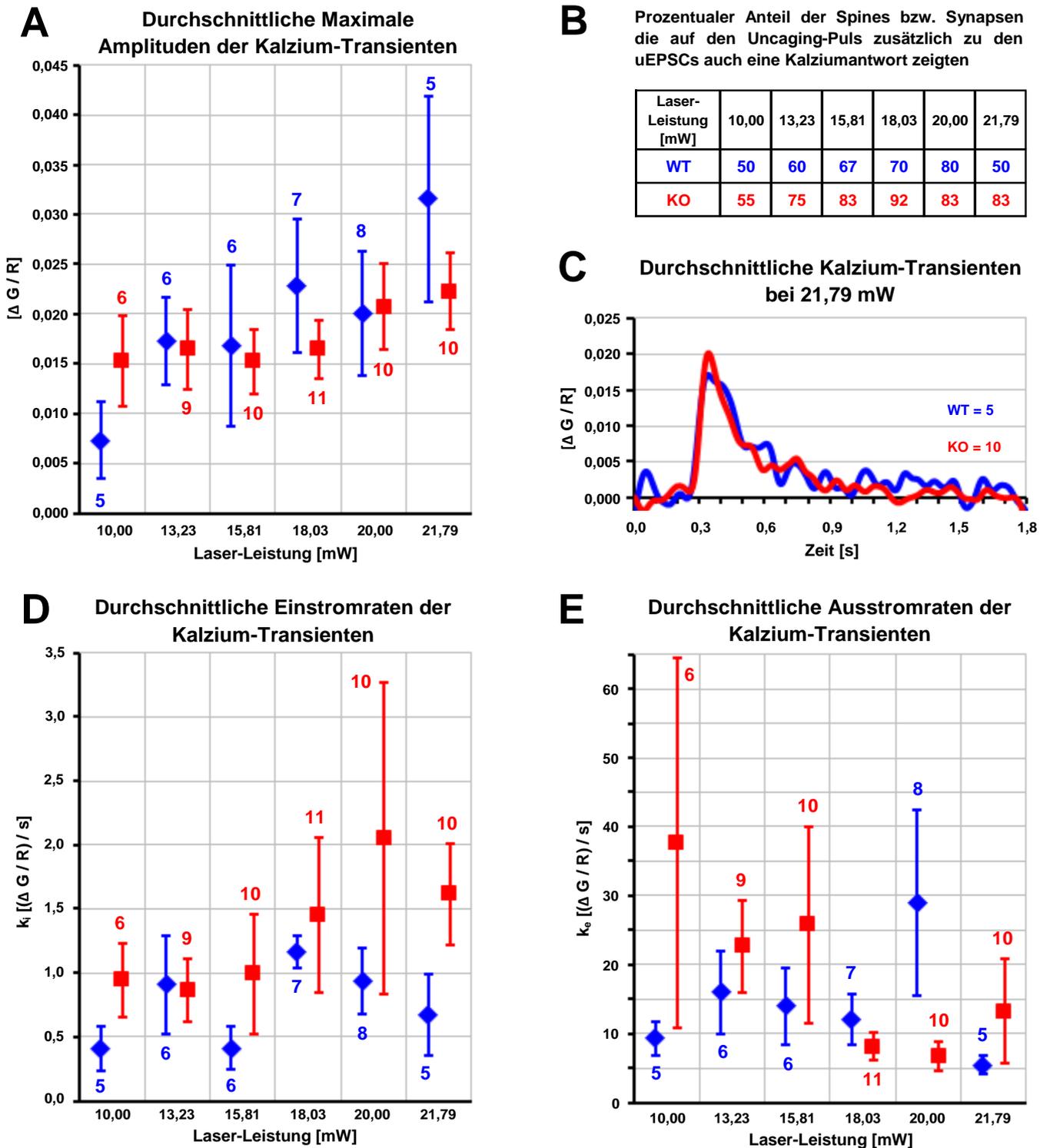


Abb. 4.21: Kalzium-Antworten der Einzel-Signale im CC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung; 20 mM MNI-Glutamat und 20 μ M CNQX; vergleichende Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von **WT** (blaue Raute) und **KO** (rotes Quadrat); Zahlenangaben über den Werten entsprechen der Anzahl (n) der erfolgreich gemessenen Kalzium-Antworten; **(A)** Durchschnittliche maximale Amplituden ($\Delta G/R$) der gemessenen Kalzium-Transienten; **(B)** Prozentualer Anteil der Spines, die auf einen Uncaging-Puls zusätzlich zu einem Potential eine gleichzeitige Kalzium-Antwort zeigten; **(C)** Darstellung eines durchschnittlichen Kalzium-Transienten beider Genotypen bei 21,79 mW; Werte der Einstrom- k_i **(D)** und Ausstromraten k_e **(E)** für die durchschnittlichen Kalzium-Transienten.

4.3.3.3. 24 uEPSPs (25 Hz) kombiniert mit 24 bAPs (25 Hz) unter CNQX

Unter dem Einfluss des AMPA-Rezeptor-Blockers CNQX wurde auch das Potenzierungsprotokoll angewendet, wie bereits in den vorangegangenen Messungen ohne einen Rezeptor-Blocker und anschließend mit APV beschrieben. Hier wurde allerdings nur eine kleine Anzahl von erfolgreichen Versuchen erreicht, was die quantitativen Ergebnisse hier recht unsicher erscheinen lässt.

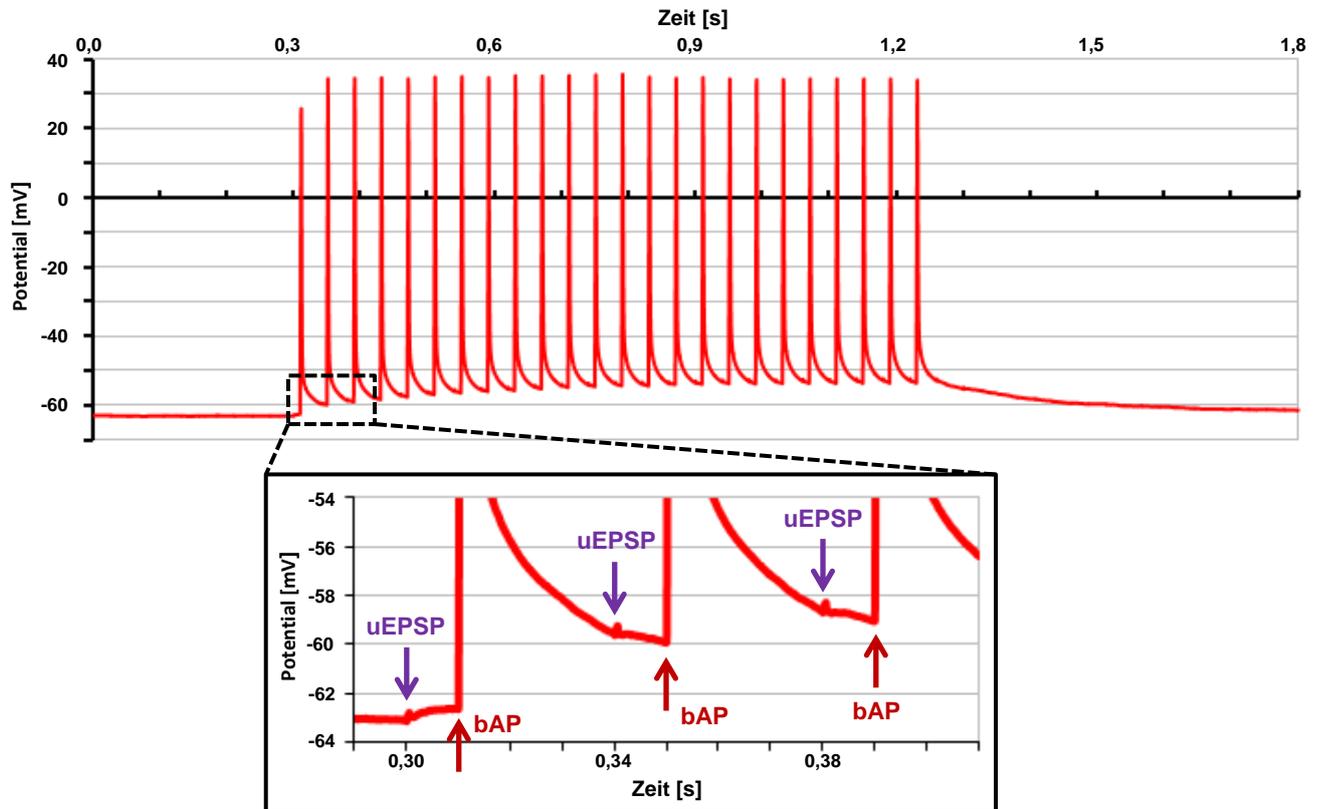
In diesen Kontrollversuchen konnte ein durchschnittliches RMP der Mooszellen von jeweils $-63,1$ mV im WT ($n = 4$) und im KO ($n = 5$) bestimmt werden und unterschied sich damit nicht von den vorangegangenen Messungen.

Eine beispielhafte Darstellung der Abfolge der erfolgreich induzierten 24 uEPSPs (durch kurze Uncaging-Pulse bei $20,00$ mW) und bAPs (kurze Strominjektionen im Soma) mit einer jeweiligen Frequenz von 25 Hz ist in Abbildung 4.22 unter A zu finden. Bei der Betrachtung der ersten drei kombinierten elektrophysiologischen Ereignisse (siehe Ausschnitt in Abb. 4.22), ist zu sehen, dass nur sehr kleine induzierte Potentiale (uEPSPs) 10 ms vor den bAPs entstanden. Passend zu den maximalen Amplituden der Einzel-Signale erreichten diese Potentiale Amplituden von nicht einmal $0,5$ mV beim ersten Uncaging-Puls. Im weiteren Verlauf wurden die uEPSPs noch kleiner und schwer erkennbar. Damit unterschied sich die elektrophysiologische Kurve unter der Einwirkung von CNQX doch erheblich von denen der anderen beiden Versuchsgruppen, in denen eindeutig die induzierten Potentiale erfasst werden konnten.

Trotz der geringen Anzahl der gemessenen Spines (für den WT nur vier und für den KO fünf Zellen) konnten Veränderungen der Kalzium-Transienten besonders im Vergleich des Verlaufs zu den Experimenten unter der Blockade des NMDA-Rezeptors mit APV festgestellt werden (siehe Abb. 4.22 – B und zum Vergleich die Werte in Tab. 7.10 im Anhang). Die gemittelten maximalen Amplituden der Kalzium-Transienten ($\Delta G/R$) erreichten im WT einen Wert von $0,161 \pm 0,027$ und im KO $0,189 \pm 0,038$. Damit liegen die Werte für den WT über denen aus den Versuchen mit APV ($0,152$), allerdings reichten sie bei weitem nicht an die Werte unter Normalbedingungen ($0,249$) heran. Für den KO galt hingegen, dass die gemessenen Amplituden deutlich größer als unter APV ($0,134$) und mit den Werten der Normalbedingung ($0,186$) vergleichbar waren. Auffällig war auch der geringe Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Jedoch ist der Verlauf der Kalziumtransienten mit einem bauchigen Anstieg dem Verlauf unter Normalbedingungen ähnlich, wohingegen unter NMDA-Rezeptor Blockade ein flacher Anstieg zu sehen war.

A

Elektrophysiologische Ableitung während der Potenzierung unter dem AMPA-Rezeptor Blocker CNQX

**B**

Durchschnittliche Kalzium-Transienten während der Potenzierung unter dem AMPA-Rezeptor Blocker CNQX

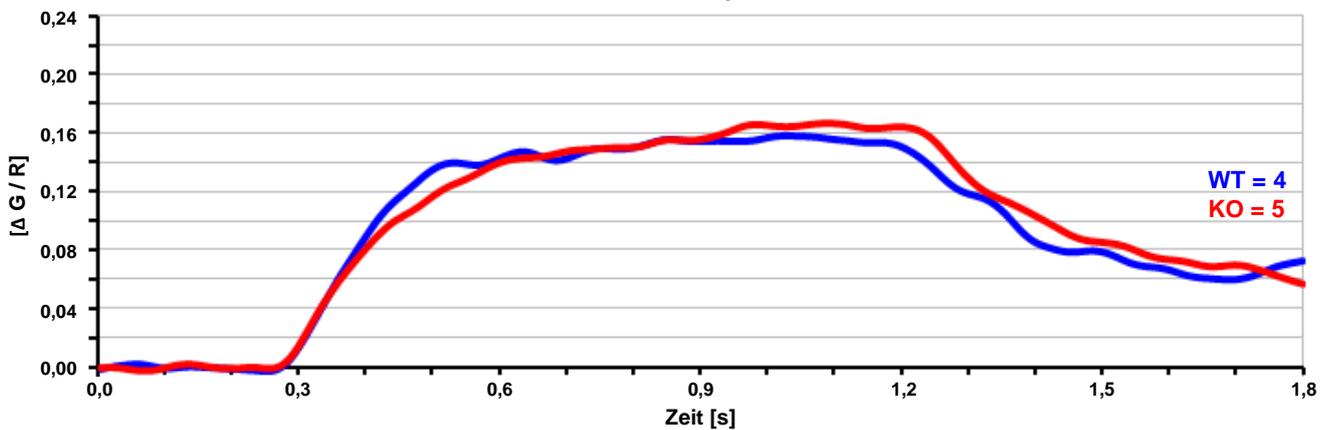


Abb. 4.22: NMDA-Rezeptor-abhängiges Potenzierungsprotokoll; 20 mM MNI-Glutamat und 20 μ M CNQX im ACSF; Abfolge von 24 uEPSPs (Uncaging bei einer konstanten Laserleistung von 20,00 mW und 0,5 ms Pulsdauer) und mit einer Zeitverzögerung von 10 ms folgender bAPs (Strominjektion im Soma im CC-Modus, 1-2 ms, 1,5 pA) mit einer Frequenz von 25 Hz; **(A)** Darstellung der gemittelten elektrophysiologischen Ableitung (Potentiale) der Zellen; vergrößerter Ausschnitt der ersten drei kombinierten Ereignisse; **(B)** Mittlere gemessene Kalzium-Transienten ($\Delta G/R$) in den Spines als Antwort auf das Potenzierungsprotokoll; vergleichende Darstellung der Ergebnisse von **WT (blaue Kurve)** und Synpo **KO (rote Kurve)** mit den jeweiligen Angaben für die Anzahl der gemessenen Spines (n); SEM und SD der Werte ersichtlich aus Tab. 7.10 im Anhang.

In Bezug auf die Kalzium-Einstromraten ($\Delta G/R$ pro s) konnte registriert werden, dass die Raten für beide Genotypen mit den Raten in den Ausgangsexperimenten ohne einen Blocker vergleichbar waren (siehe Tab. 7.11 im Anhang). Entsprechend konnten Raten von $0,975 \pm 0,186 / s$ ($n = 4$) im WT und von $0,797 \pm 0,114 / s$ ($n = 5$) im KO im Vergleich zu $1,066 / s$ und $0,772 / s$ (nur MNI) bestimmt werden. Im Gegensatz dazu waren die Raten gegenüber den Experimenten unter APV Einwirkung (rund $0,4 / s$) wieder deutlich erhöht. Die Kalzium-Ausstromraten zeigten von allen durchgeführten Potenzierungs-Versuchen die größten Werte mit $4,946 \pm 1,340 / s$ (WT, $n = 4$) und $4,415 \pm 0,537 / s$ (KO, $n = 5$). Für beide Parameter konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden.

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, dass durch die Blockade der AMPA-Rezeptoren die synaptischen Signale, die durch das Uncaging induziert wurden, deutlich verändert waren, wie auch in den Experimenten der Einzel-Signale bereits zu sehen war. Allerdings hat diese Blockade nur einen geringen Einfluss auf den Kalzium-Einstrom in den Spine. Durch die sehr kleine Anzahl der gemessenen Spines haben diese Ergebnisse jedoch eine geringe Aussagekraft.

5. DISKUSSION

5.1. Kontrollierte lokale Stimulation eines Spines bzw. einer Synapse

Durch die spezielle Architektur des Gyrus Dentatus ist es schwierig wenn nicht sogar unmöglich direkt einzelne Moosfaser-Synapsen, egal ob an CA3-Pyramidenzellen oder Mooszellen, in einem kompakten Gewebe wie der in dieser Arbeit verwendeten organotypischen Schnittkultur zu untersuchen.

Analysen der synaptischen Transmission erfolgten daher eher indirekt z.B. an isolierten Membran-Patches der Mooszellen (*Livsey et al., 1993*). Durch lokale Verabreichung von Glutamat, um die synaptische Transmission zu simulieren, konnten exzitatorische Signale gemessen werden. Eine erhöhte Glutamat-Konzentration hatte zur Folge, dass auch ein Anstieg der Amplituden zu verzeichnen war. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls in den hier durchgeführten Experimenten beobachtet werden, in denen mit zunehmender Uncaging-Leistung und somit größerer Menge an freigesetztem Glutamat ebenfalls die Amplituden der erregenden synaptischen Signale anstiegen. Dabei unterscheidet sich die spontane synaptische Aktivität mit relativ häufig auftretenden Ereignissen mit großen Amplituden in der Studie nicht wesentlich von der aufgezeichneten Aktivität der Mooszellen in dieser Untersuchung (Vergleiche dazu Abbildung 1 bei *Livsey et al., 1993*).

Eine direkte elektrische Stimulation der Körnerzellen bzw. Moosfasern (MF) über eine Elektrode ist extrem schwierig und zeitaufwendig. In den Versuchen von *Jonas et al. (1993)* wurden zumeist mehrere Minuten und auch viele Versuche benötigt, um ein synaptisch verbundenes Paar aus Körnerzelle und CA3-Pyramidenzelle zu finden, in dem mit einer Elektrode die Körnerzelle extrazellulär am Soma stimuliert wurde. In einigen Fällen gelang dies gar nicht. Außerdem wurden häufig mehrere präsynaptische Fasern stimuliert und die postsynaptischen Signale mit einer Zeitverzögerung von rund vier Millisekunden abgeleitet. Die Methode von *Jonas et al. (1993)* bedeutet somit einen sehr hohen experimentellen Aufwand, um ein synaptisches Paar zu finden. Für eine Mooszelle, die verstreut im Hilus zu finden ist und die von ungefähr 100 Körnerzellen innerviert wird (*Henze und Buzsaki, 2007*), wird eine solche elektrische Stimulation nochmals schwieriger ausfallen. In unserem Labor erwies sich die extrazelluläre lokale elektrische Stimulation von einer Moosfaser bzw. eines MF-Boutons an einem individuellen Spine als fast nicht durchführbar und somit als nicht effektiv.

Des Weiteren kann bei der Suche nach einem synaptisch verbundenen Paar auch eine Kaliumlösung, die zur Aktivierung von Neuronen führt, verwendet werden. Durch die lokale Applikation eines kurzen Kalium-Puffs über eine Pipette an verschiedenen Positionen im Körnerzellband können ebenfalls synaptische Antworten in einer gepatchten CA3-Pyramidenzelle ausgelöst werden. Die Erfolgsrate, mit Hilfe dieser Methode ein monosynaptisch verbundenes Paar (Körnerzelle zu Pyramidenzelle) zu finden, liegt allerdings nur bei höchstens zehn Prozent (*Mori et al., 2004*). Diese Methode wurde ebenfalls in unserer Gruppe probiert, führte aber nicht zum Erfolg und wurde schnell wieder verworfen. Aufgrund der bereits sehr hohen Spontanaktivität der Mooszellen konnte die durch Kalium hervorgerufene erhöhte Aktivität schwer eindeutig zugeordnet werden.

Die Schwierigkeiten und Nachteile der beschriebenen Vorgehensweisen können mittels der Methode der optischen Glutamat-Freisetzung (Uncaging) sehr einfach übergangen werden, weil die präsynaptische Komponente der Transmission außer Acht gelassen werden kann. Durch das Uncaging kann die Glutamat-Freisetzung aus den Vesikeln der Präsynapse simuliert werden und das lokal freigesetzte Glutamat kann direkt an der Postsynapse durch Bindung an die jeweiligen Rezeptoren wirken. Dadurch kommt es zu keinerlei Zeitverzögerung zwischen Stimulation und resultierender Antwort und entspricht damit auch dem tatsächlichen Zeitablauf während der synaptischen Transmission. Durch die enge zeitliche Korrelation können somit auch sehr kleine Signale detektiert werden, wie zum Beispiel während den Experimenten unter dem AMPA-Rezeptor Blocker CNQX, bei denen die abgeleiteten Signale nur zwischen vier und zwölf Pikoampere (pA) bzw. deutlich unter einem Millivolt (mV) lagen.

Diese Art der Stimulation kann außerdem relativ einfach in einer Schnittkultur an intakten Neuronen angewendet werden und zeichnet sich durch eine fast 100 %ige Erfolgsrate aus. Das Zwei-Photonen Glutamat-Uncaging bietet darüber hinaus den Vorteil, zeitlich und vor allem räumlich genau kontrolliert einen einzelnen Spine bzw. eine individuelle Synapse zu stimulieren. In den hier verwendeten Schnittkulturen ist das Neuropil entsprechend der Situation in perfusionsfixiertem Hirngewebe sehr dicht und bietet nicht viel freien extrazellulären Raum, wie in der elektronenmikroskopischen Aufnahme eines Ausschnittes aus dem Hilus in Abb. 4.3 (im Ergebnisteil) zu sehen ist. Die verwendete Lösung mit dem chemisch maskierten und damit inaktivierten Glutamat wird sich innerhalb des Schnittes im diesem engen Extrazellulärraum verteilen und auch in den synaptischen Spalt diffundieren. Es stellte sich letztendlich heraus, dass der für das Uncaging verwendete Laser genau auf die vermutete Synapse bzw. den synaptischen Spalt fokussiert werden musste, da bereits bei kleinen Abweichungen die induzierten elektrischen Signale sehr klein oder gar nicht mehr vorhanden waren. Andere Forschergruppen fanden ebenfalls einen solchen Zusammenhang.

Mit zunehmender Entfernung der Uncaging-Position zum Spine-Kopf reduzierten sich die Amplituden der induzierten Potentiale und Kalzium-Transienten dramatisch (siehe *Araya et al., 2007* unter der Abbildung 3 – A2 und *Sobczyk et al., 2005* im Anhang Abbildung 1A). Nach zwei bis drei Mikrometer Abstand zum Spine konnten letztendlich keine Antworten mehr ausgelöst werden. Dies zeigt, wie exakt lokalisiert ein Spine bzw. eine Synapse durch die Methode des Zwei-Photonen-Uncagings stimuliert werden kann.

Des Weiteren können durch das Uncaging exzitatorische postsynaptische Potentiale (uEPSPs) und Ströme (uEPSCs) an der Moosfaser-Synapse zwischen Mooszelle und Körnerzelle induziert werden, die zum Feuern eines Aktionspotentials (APs) bzw. eines Aktionsstromes führen (siehe Abb. 5.1). Dies wurde vor allem in der größten Laser-Leistungsstufe beobachtet, in der mittels des Uncagings die höchste Konzentration an freiem Glutamat in den durchgeführten Experimenten erzeugt wurde.

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu *Jonas et al. (1993)*, die in ihren Untersuchungen an der Moosfaser-Synapse an CA3-Pyramidenzellen herausfanden, dass ein einzelnes unitäres EPSP nicht ausreichend ist, um die Feuerschwelle der Zelle zu erreichen. Dazu müssten mehrere Synapsen durch die simultane Aktivierung einiger Körnerzellen stimuliert werden. Ein Unterschied der hier untersuchten Mooszellen zu den CA3-Pyramidenzellen besteht in ihrem abweichenden Ruhemembranpotential (RMP) von rund -63 bis -65 mV im Vergleich zu -70 mV. Die Mooszellen können dadurch wahrscheinlich schneller durch große synaptische Ereignisse an ihre Feuerschwelle gebracht werden. Allerdings werden durch die Stimulation der Moosfasern bzw. durch die Induktion eines APs in der Körnerzelle auch gleichzeitig inhibitorische Interneurone mit γ -Aminobuttersäure (GABA) als verwendeter Transmitter aktiviert, die netto zu einer Hemmung in den CA3-Pyramidenzellen führen können (*Mori et al., 2004*). Mooszellen erhalten ebenfalls inhibitorische synaptische Signale, aber diese sind durch die primär exzitatorische synaptische Transmission, hauptsächlich vermittelt durch die Moosfaser-Synapsen der Körnerzellen, überlagert (*Scharfman, 1992*). Des Weiteren können diese abweichenden Ergebnisse auch auf die unterschiedlichen Versuchstiere, nämlich Ratte versus Maus, zurückzuführen sein.

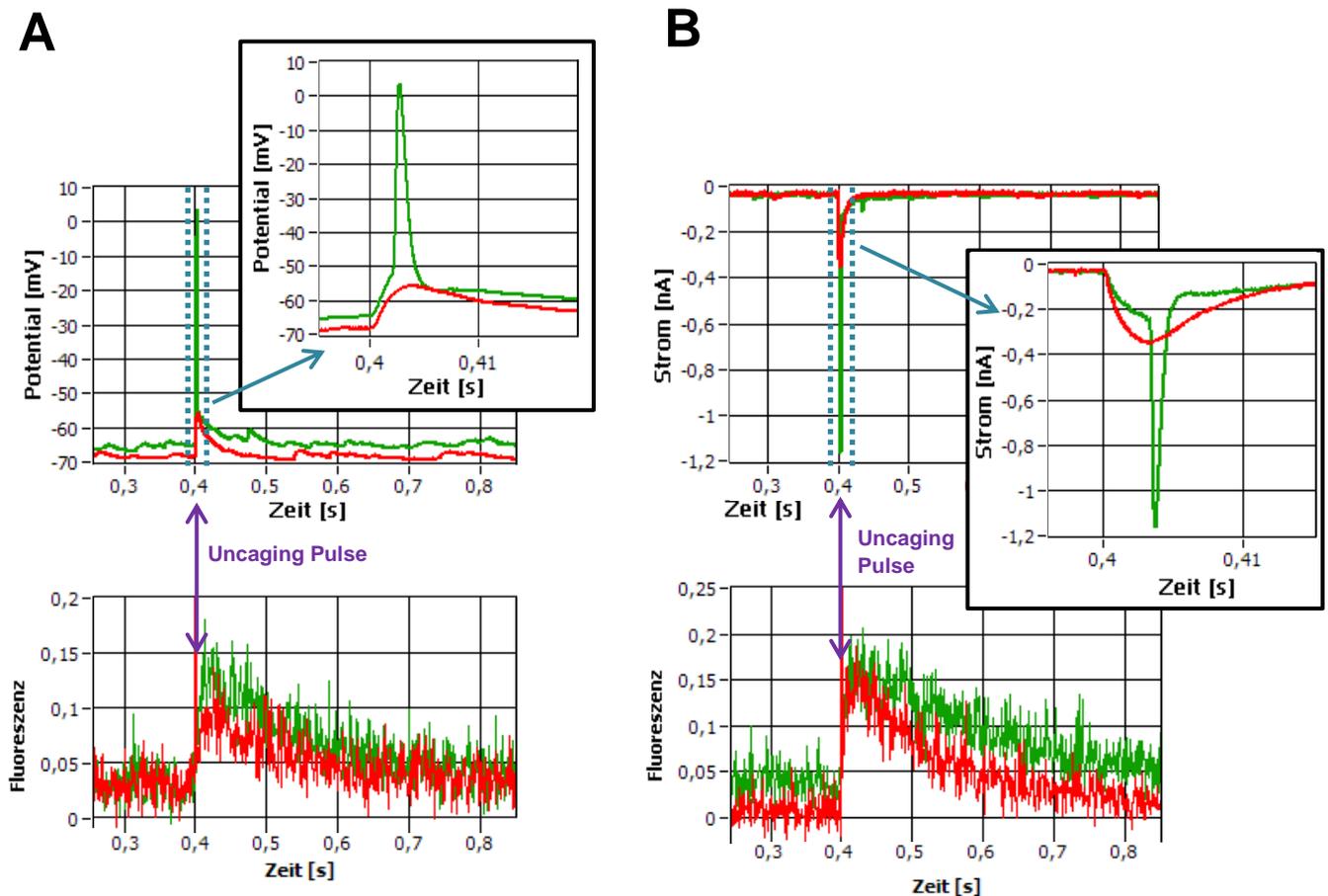


Abb. 5.1: Durch das Glutamat-Uncaging können exzitatorische postsynaptische Potentiale (uEPSPs) und Ströme (uEPSCs) induziert werden, die zum Feuereines Aktionspotentials bzw. eines -stromes führen; **(A)** Experiment-Ausschnitt im CC-Modus; bei 0,4 s wurde ein **uEPSP** durch einen Uncaging-Puls mit 15,81 mW und ein **Aktionspotential** mit 21,79 mW erzeugt (obere Zeile mit Ausschnitts-Vergrößerung) mit einem jeweiligen Kalzium-Transienten (untere Zeile); **(B)** Experiment-Ausschnitt im VC-Modus; Induktion eines **uEPSCs** bei 15,81 mW und eines **Aktionsstromes** bei 18,03 mW (obere Zeile) mit gleichzeitigen Kalzium-Transienten (untere Zeile) bei 0,4 s.

5.2. Mittels Uncaging induzierte exzitatorische postsynaptische Einzel-Signale der Moosfaser-Synapse von Mooszellen

Mittels der Technik der optischen Glutamat-Freisetzung (Uncaging) konnten in den hier durchgeführten Experimenten einzelne exzitatorische postsynaptische Signale an individuellen Spines bzw. Synapsen von Mooszellen kontrolliert ausgelöst und gemessen werden. Dabei wurde eine Reihe von sechs Uncaging-Pulsen mit ansteigender Laser-Leistung verwendet, um

mit jeder Wiederholung die Menge an freigesetztem Glutamat zu erhöhen. Die Amplituden der erzeugten Potentiale und Ströme nahmen in Folge dessen über die Leistungs-Stufen hinweg deutlich zu. Dabei wurden die Laser-Leistungen so gewählt, dass es zu einem linearen Anstieg der freigesetzten Glutamat-Menge kam.

Diese Art der Induktion der Einzel-Signale wurde gewählt, um den gesamten Wirkungsbereich der hier untersuchten Synapsen abzudecken. Bei nur einem individuellen Uncaging-Ereignis mit einer konstanten Laser-Leistung könnten die induzierten Signale bei einem Spine am oberen Rand und bei einem Anderen am unteren Rand dieses Bereiches liegen. Ein Vergleich der Spines bzw. Synapsen miteinander wäre somit schwierig. Jede einzelne Synapse könnte sich in einem unterschiedlichen und nicht vorhersehbaren Aktivitätszustand befinden.

Außerdem traten zwischen den Einzel-Messungen in jeder Uncaging-Stufe eine sichtbare Heterogenität in den Amplituden der gemessenen Ströme und Potentiale auf. Eine solch große Variabilität der elektrophysiologischen Signale wurde bereits für die Moosfaser-Synapse an CA3-Pyramidenzellen gezeigt (*Urban et al., 2001*) und in den aktuellen Versuchen wie bereits erwähnt bestätigt.

Im Vergleich zu anderen Synapsen im Hippocampus, wie z.B. zwischen den Schaffer Kollateralen und den CA1-Pyramidenzellen, können in den Moosfaser-Synapsen deutlich größere Ströme gemessen werden. Im Durchschnitt erlangten die EPSCs Amplituden von circa -70 pA in CA3 und in CA1 hingegen nur rund -7 pA (*Jonas et al., 1993, Urban et al., 2001*). In den hier durchgeführten Experimenten wurde diese durchschnittliche Amplitude von -70 pA annähernd ab der dritten Uncaging-Stufe von 15,81 mW (gemessene Amplituden im WT -74 pA und in der KO -66 pA) erreicht. Dies weist darauf hin, dass der physiologische Übertragungsbereich dieser Synapsen mit den hier gewählten Uncaging-Parametern gut abgedeckt wurde.

Bei der Betrachtung der Messungen der Einzel-Signale fällt auf, dass in den ersten Uncaging-Stufen meist ein annähernd linearer Anstieg der Amplituden zu verzeichnen war und in den beiden höchsten Stufen eine Art Sättigung eintrat. Verantwortlich dafür könnte eine begrenzte Anzahl der vorhandenen Glutamat-Rezeptoren in der Synapse sein. In den niedrigen Uncaging-Stufen ist die Freisetzung des Glutamats nicht ausreichend, um alle Rezeptoren zu aktivieren. Mit jeder weiteren Stufe können mehr Rezeptoren stimuliert werden und die Amplituden der exzitatorischen Signale nehmen in einem linearen Verhältnis zu. Steigt dann die Laser-Leistung und somit die Konzentration an freiem Glutamat bis zu einem Maximum an, werden fast alle Rezeptoren durch Glutamat gebunden und aktiviert. Die Zunahme der Amplituden nimmt dadurch nicht mehr stetig zu und erreicht letztendlich eine Art

Sättigung. Diese Schlussfolgerung ist vor allem für die gemessenen EPSCs naheliegend, da bereits *Jonas und Spruston (1994)* zeigten, dass die Amplitude der Ströme proportional zu der Anzahl der geöffneten postsynaptischen Rezeptorkanäle sein soll. Je größer die Ströme werden, umso mehr Rezeptoren sind geöffnet. Ab einem bestimmten Zeitpunkt können dann keine weiteren Kanäle mehr geöffnet werden und die Amplitude der elektrophysiologischen Signale stagniert.

Allerdings widersprechen die Ergebnisse der Kontroll-Versuche mit dem NMDA-Rezeptor Blocker (APV) der Schlussfolgerung, dass alle Rezeptoren das freigesetzte Glutamat gebunden haben oder keine weiteren „freien“ Rezeptoren vorhanden sind. Es werden im Allgemeinen höhere durchschnittliche Amplituden vor allem der Ströme erreicht, die über die gesamten Uncaging-Stufen eine lineare Zunahme zeigen. Dies spricht eher dafür, dass in der Synapse noch genügend Rezeptoren aktiviert werden können und keine Sättigung dieser erfolgt.

Alternativ könnte alles lokal im synaptischen Spalt verfügbare MNI-Glutamat verbraucht worden sein und somit keine Freisetzung mehr erfolgen. Allerdings ist es aufgrund der hohen Konzentration an MNI-Glutamat von 20 mM und der kurzen Uncaging-Pulse von 0,5 ms sehr unwahrscheinlich. Die Kontroll-Experimente mit APV sprechen auch dafür, dass noch genügend freies Glutamat im synaptischen Spalt vorhanden war. Ebenfalls könnte das freigesetzte Glutamat durch Bindung an die Rezeptoren, durch Diffusion und die Wiederaufnahme in die Zellen über Glutamat-Transporter aus dem synaptischen Spalt entfernt worden sein (*Clements et al., 1992*).

5.3. Die Nachahmung der Präsynapse durch Uncaging

Das Verfahren der optischen Glutamat-Freisetzung ermöglicht dem Wissenschaftler eine einzelne Synapse kontrolliert und lokal zu stimulieren. Dabei ist das Uncaging an sich ein artifizielles System und es stellt sich die Frage, in wie weit es damit den tatsächlichen physiologischen Abläufen während der synaptischen Transmission entspricht. Vor allem in welchem Maße es die Freisetzung des Neurotransmitters an der präsynaptischen Seite nachahmt.

Vergleiche von spontan auftretenden EPSCs mit durch Uncaging induzierten EPSCs, zeigten identische Zeitverläufe und eine gleiche Kinetik der beiden elektrophysiologischen Signale, wie bei *Matsuzaki et al. (2001, siehe Abbildung 1e)* und *Sobczyk et al. (2005, in*

Abbildung 2A des Anhangs). Allerdings wurden diese Untersuchungen unter sehr artifiziiellen Bedingungen durchgeführt. Beide Forscher-Gruppen verwendeten die verschiedensten Rezeptor-Blocker, um einzelne Stromkomponenten der synaptischen Transmission zu isolieren und die Messungen erfolgten außerdem bei Raumtemperatur.

In den hier durchgeführten Versuchen wurde versucht, so nah wie möglich an die physiologischen Bedingungen heran zu gelangen. Daher wurde auf die Zugabe von Rezeptor-Antagonisten zur Modulation der Hintergrundaktivität verzichtet und die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von rund 33 bis 34 °C. Allerdings besitzt das verwendete MNI-Glutamat selbst einen modulatorischen Effekt, in dem es auf die inhibitorische Transmission einen Einfluss hat, der im nachfolgenden Abschnitt ausführlich betrachtet wird.

Während eines einzelnen Experimentes unter Normalbedingungen folgte auf ein induziertes Potential (uEPSP) mit einem dazugehörigen gleichzeitigen Kalzium-Transienten wenige hundert Millisekunden später ein natürliches synaptisches Event, was ebenfalls mit einem Kalzium-Einstrom verbunden war (siehe Abb. 5.2).

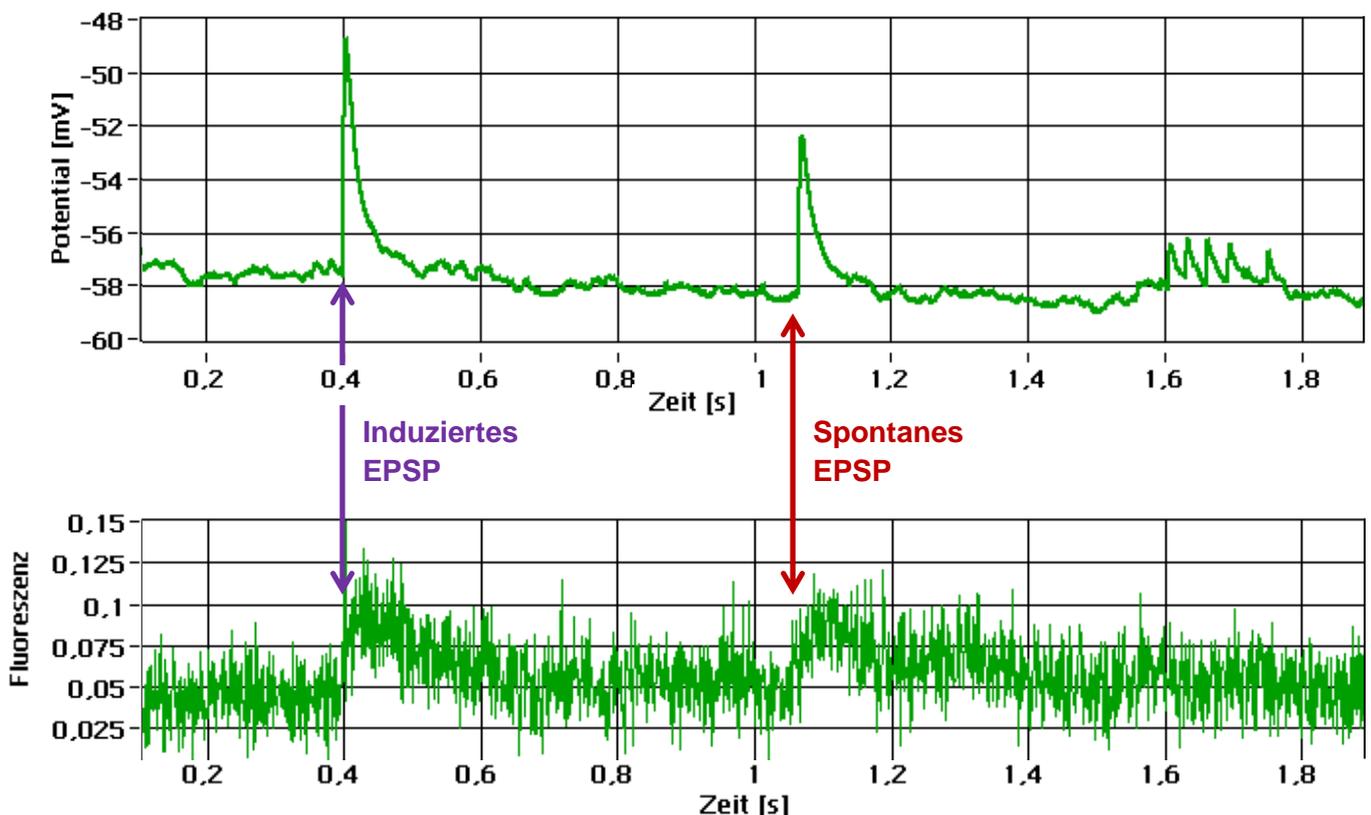


Abb. 5.2: Nachahmung der Präsynapse durch das optische Freisetzen von Glutamat (Uncaging); Ausschnitt aus den Rohdaten eines einzelnen Experimentes; bei 0,4 s wurde ein EPSP durch einen Uncaging-Puls mit einer Laser-Leistung von 18,03 mW erzeugt; Aufzeichnung eines **induzierten EPSPs** (circa 7 mV) mit dem dazugehörigen Kalzium-Transienten; bei ungefähr 1,05 s folgt ein **spontanes EPSP** (Amplitude von rund 6 mV) mit einem gleichzeitigen Kalzium-Einstrom.

Normalerweise können die beobachteten elektrophysiologischen Signale nicht einem Spine bzw. dessen synaptischer Aktivierung zugeordnet werden, da die Ableitung am Soma erfolgt. Durch den gleichzeitigen Kalzium-Einstrom konnte hier das spontan auftretende EPSP dem einzelnen Spine (exakt der Spine aus der Vergrößerung in Abb. 3.3 im Abschnitt Methoden) zugeordnet werden. Bei dem Vergleich der beiden Ereignisse (spontan und induziert) im selben Spine konnten keine gravierenden Unterschiede erkannt werden, weder bei dem zeitlichen Verlauf der Potentiale noch bei den Kalzium-Transienten. Ein komplexer Spine bzw. eine Excrescence wird hauptsächlich von nur einem Moosfaser-Bouton innerviert und die einzelnen Spine-Köpfe von diesem umschlossen (*Hamlyn, 1962*). Außerdem befinden sich typischerweise nicht mehrere isolierte Aktive Zonen auf einem Spine-Kopf (siehe dazu *Rollenhagen et al., 2007*). Durch das hier detektierte Kalziumsignal kann nun dem exzitatorischen postsynaptischen Potential, abgeleitet am Soma, exakt ein Spine bzw. eine Moosfaser-Synapse zugeordnet werden.

Anhand dieses einen Beispiels konnten keine offensichtlichen Unterschiede zwischen induzierten und spontanen synaptischen Ereignissen bei annähernd physiologischen Verhältnissen gefunden werden. Das Glutamat-Uncaging stellt somit eine gute Methode dar, um die tatsächliche synaptische Transmission und somit die Neurotransmitter-Freisetzung aus der Präsynapse annähernd nachzuahmen.

5.4. Block der inhibitorischen Transmission durch MNI-Glutamat

In vielen verschiedenen Studien der letzten Jahre wurde für das Zwei-Photonen-Uncaging das kommerziell erhältliche MNI-Glutamat (Tocris) verwendet. Allerdings zeigte sich, dass bei der Verwendung von hohen Konzentrationen die Substanz als ein sehr effektiver Antagonist der GABAergen Transmission wirkt und es zu „epileptiformen“ Ereignissen kommen kann (*Fino et al., 2009*).

In den hier durchgeführten Experimenten wurde eine verhältnismäßig hohe Konzentration von 20 mM verwendet und somit kann eine Blockade der inhibitorischen Transmission nicht ausgeschlossen werden. Da in den aktuellen Versuchen die exzitatorische Komponente der synaptischen Transmission untersucht und zwei Genotypen unter denselben Versuchsbedingungen verglichen wurden, konnte dieser Effekt des MNI-Glutamats in Kauf genommen bzw. außer Acht gelassen werden. Allerdings wurden in vereinzelt Experimenten im Current- sowie im Voltage-Clamp-Modus außergewöhnliche Depolarisationen

beobachtet, die bis dahin noch nicht in der Literatur beschrieben wurden. Diese Ereignisse waren von einem extremen Einstrom von Kalzium in den Spine sowie in die ganze Zelle begleitet (Beispiele siehe Abb. 5.3). Diese großen Depolarisations-Ereignisse beschränkten sich nicht nur auf die untersuchten Mooszellen, sondern kamen auch in anderen Zelltypen, wie Interneuronen oder Körnerzellen, vor. Diese speziellen Beobachtungen könnten mit den von *Fino et al. (2009)* nicht näher beschriebenen „epileptiformen“ Ereignissen zusammen hängen. Tatsächlich konnte in den hier durchgeführten Experimenten kein Hinweis auf eine ausgedehnte epileptiforme Aktivität (z.B. hochfrequente AP-Folgen) gefunden werden, da diese ansonsten häufig in den elektrophysiologischen Ableitungen der Zellen zu sehen gewesen wären und somit häufig zum Abbruch der Messungen geführt hätten. In den vereinzelt auftretenden Depolarisations-Ereignissen konnte außerdem nur ein einzelnes und nicht mehrere AP zu Beginn detektiert werden. Die Zelle gelangte anschließend sehr schnell in einen nicht erregbaren Zustand und zurück auf ihr ursprüngliches Ruhemembranpotential. Auch die deutlich gestiegene Kalzium-Konzentration im Spine und in der gesamten Zelle ging auf das vorherige Basal-Niveau zurück.

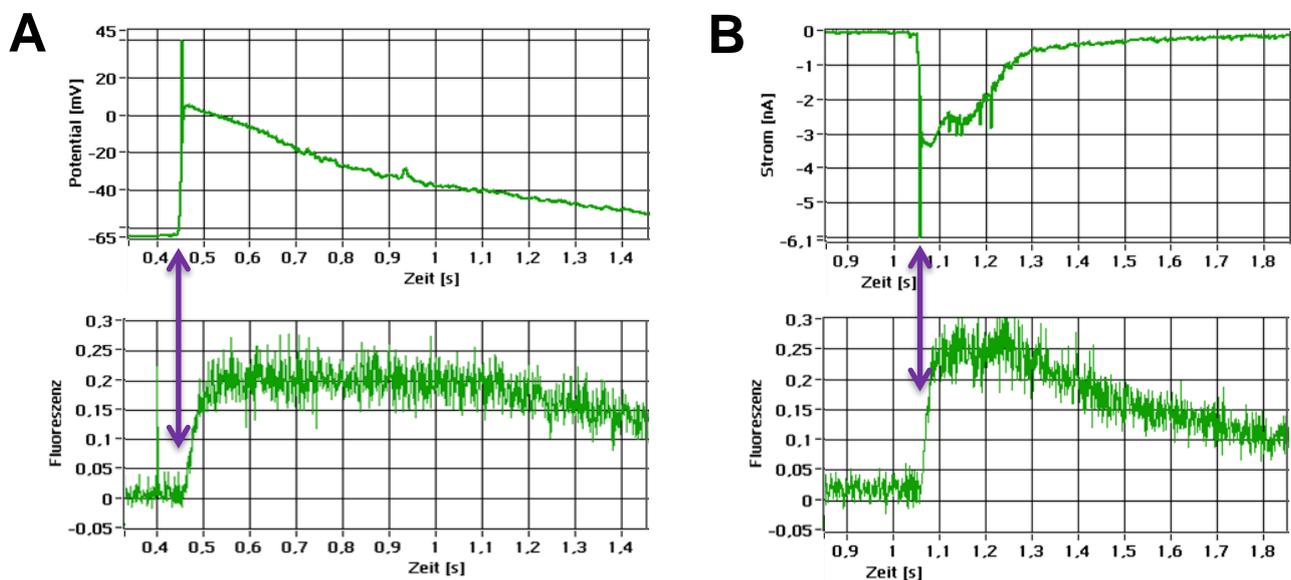


Abb. 5.3: MNI-Glutamat wirkt bei der Verwendung von hohen Konzentrationen (im mM Bereich) als sehr effektiver Antagonist auf die GABAerge Transmission; Ausschnitt aus den Rohdaten für die Elektrophysiologie (obere Zeile) und grüne Fluoreszenz-Signale (untere Zeile) der Experimente mit 20 mM MNI-Glutamat (Normalbedingung) jeweils für die **(A)** Current-Clamp und **(B)** Voltage-Clamp-Konfiguration, Pfeil markiert jeweils den Beginn des starken depolarisierenden Ereignisses mit massiven Kalzium-Einstrom in Spine und kompletter Zelle.

Eine Möglichkeit diesen antagonistischen Effekt des MNI-Glutamats zu verringern oder ganz zu vermeiden, wäre die Verwendung eines anderen chemisch maskierten Glutamats, wie z.B. des sogenannten RuBi-Glutamats (Ruthenium-Bipyridin Komplex). Dieses zeigt zwar auch eine antagonistische Wirkung auf die inhibitorische Transmission, allerdings fällt diese im Vergleich zu MNI deutlich geringer aus (*Fino et al., 2009*). Nachteil dieses maskierten Glutamats ist jedoch, dass die optische Freisetzung bei einer Laser-Wellenlänge von 800 nm erfolgt. Für die Anregung der in diesen Untersuchungen verwendeten Farbstoffe wurde eine Wellenlänge von 805 nm verwendet. Bei dem Gebrauch von RuBi-Glutamat treten bei dieser Kombination erhebliche Komplikationen zwischen Fluoreszenz-Aufnahme und Uncaging auf. Die Versuche müssten dadurch neu konzipiert werden mit Farbstoffen anderer Anregungs-Wellenlänge. Außerdem ist die generelle Handhabung schwieriger, da es bei der Substanz zu einer spontanen Photolyse bei normalen Lichtverhältnissen kommt. Ein weiterer Nachteil des RuBi-Glutamats liegt in der Verwendung eines Ruthenium-Bipyridin Komplexes als Schutzgruppe. Das Ruthenium-Rot (ebenfalls ein Ruthenium Komplex) ist als ein potenter Inhibitor der Kalzium-abhängigen Kalzium-Freisetzung (CICR) aus intrazellulären Kalzium-Speichern, welche durch die Ryanodin-Rezeptoren vermittelt wird, bekannt. Gerade für die Fragestellung, ob der Spine Apparat (SA) die Funktion eines Kalzium-Speichers besitzt, sind deshalb Ruthenium-basierte Substanzen nicht geeignet. In der Studie von *Fino et al., 2009* wurden auch nur elektrophysiologische Analysen und kein Kalzium-Imaging durchgeführt.

Eine weitere Möglichkeit das MNI-Glutamat zu ersetzen besteht durch die Verwendung des neu entwickelten 4-Carboxymethoxy-5,7-Dinitroindoliny-(CDNI)-Glutamates. Diese Substanz besitzt eine signifikant höhere Effizienz als MNI und kann dadurch in geringen Konzentrationen verwendet oder zum Freisetzen kann die Laser-Leistung reduziert werden (*Ellis-Davies et al., 2007*). Durch die Verwendung von CDNI-Glutamat wird im Vergleich zu MNI der antagonistische Effekt auf die GABA Rezeptoren reduziert bzw. völlig minimiert (*Ellis-Davies, 2011*). Diese Form des chemisch maskierten Glutamats hätte außerdem im Vergleich zu RuBi-Glutamat den Vorteil, dass es unter den gleichen experimentellen Bedingungen verwendet werden könnte, da das Uncaging ebenfalls bei einer Wellenlänge von 720 nm erfolgt. Allerdings ist diese Substanz nicht kommerziell erhältlich. Zudem besteht wenig experimentelle Erfahrung mit dieser Form des inaktivierten Glutamats bzw. der verwendeten Schutzgruppe, sodass über mögliche andere unerwünschte Nebenwirkungen noch nichts bekannt ist.

In den hier durchgeführten Experimenten wurde eine solch hohe Konzentration (20 mM) an MNI-Glutamat gewählt, um das Uncaging mit einer besonders geringen Laser-Leistung durchführen zu können. Dabei sollte genug Glutamat in einem möglichst kurzen Zeitraum

freigesetzt werden, um die Photo-Toxizität durch den Laser-Puls zu reduzieren und eine möglichst hohe Anzahl an Einzel-Versuchen zu ermöglichen. Diese Strategie war insofern erfolgreich, als der Vergleich des spontanen synaptischen Ereignisses mit dem Uncaging-assoziierten Ereignis von Abb. 5.2 eine sehr ähnliche Kinetik derselben zeigt.

Über die meisten Studien hinweg, die Uncaging vor allem von MNI-Glutamat verwenden, kann keine einheitliche Konzentration oder Uncaging-Dauer oder Laser-Leistung beobachtet werden. So wurden hohe Konzentrationen von 5-12 mM oder 10 mM mit Laser-Pulsen von 2 ms bzw. 5 ms verwendet (*Matsuzaki et al., 2001* und *Noguchi et al., 2005*), um Ströme zu induzieren, die vergleichbar waren mit spontan auftretenden Signalen. Allerdings wurde das chemisch maskierte Glutamat in beiden Versuchen über eine Glas-Pipette lokal direkt am Spine verabreicht, sodass die tatsächliche Konzentration des MNI-Glutamats im synaptischen Spalt nicht bekannt war. In anderen Studien wurde wiederum für das Uncaging ein Ultraviolett-(UV)-Laser benutzt (*Ellis-Davies et al., 2007* oder *Vlachos et al., 2009*). Vorteile des Zwei-Photonen-Uncaging gegenüber dem UV-Uncaging liegen in einem verringerten Streulicht, einer besseren Eindringtiefe in ein Gewebe und der fokalen Anregung bzw. Freisetzung des Glutamats (siehe *Ellis-Davies, 2011*). Bei der Verwendung einer niedrigeren Konzentration von 2,5 mM hingegen wird meist eine höhere Laserleistung verwendet, wie die Uncaging-Experimente mit 67 mW und allerdings nur 0,25 ms Pulsdauer bei *Sobczyk et al. (2005)*. Oder aber die Uncaging-Pulse werden sehr lang gewählt (4-10 ms bei *Araya et al., 2007*). Dabei haben Modelrechnungen über die Transmitter-Freisetzung an der Präsynapse und der Verteilung des Glutamats im synaptischen Spalt gezeigt, dass innerhalb von 50 μ s der Transmitter über die ganze Synapse verteilt ist (*Clements, 1996*). Daher ist es erstrebenswert mit möglichst kurzen Uncaging-Pulsen auszukommen, um möglichst nah an die physiologische Situation während der Transmitter-Freisetzung zu gelangen.

In Folge dessen muss ein Kompromiss zwischen Laser-Leistung und Konzentration des MNI-Glutamats gefunden werden. In den hier durchgeführten Studien wurde eine im Vergleich zur Literatur eher geringe Laser-Leistung zum Glutamat Uncaging verwendet. Da hier die exzitatorische synaptische Transmission untersucht werden sollte, musste dafür die Konzentration der gebundenen Substanz hoch gesetzt werden, obwohl es eine Wirkung auf die hemmende Transmission, wie bereits diskutiert, gab.

5.5. Induzierte elektrophysiologische Signale unterscheiden sich nicht zwischen Wildtyp und Synaptopodin Knock-out Mäusen

Bei der Untersuchung der basalen synaptischen Transmission konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen Mooszellen aus Wildtyp (WT) oder Synaptopodin Knock-out (Synpo KO) Schnittkulturen gefunden werden.

Im Vergleich der induzierten Einzel-Signale beider Genotypen konnte festgestellt werden, dass unter Normalbedingungen (nur MNI-Glutamat im ACSF) in der VC-Konfiguration wie auch im CC Modus bei den Mittelwerten der uEPSCs bzw. der EPSPs keine signifikanten Unterschiede auftraten. Die Mittelwerte zeigten tendenziell im WT allgemein leicht erhöhte Amplituden im Vergleich zum KO, allerdings sind unter dem Einfluss des NMDA-Rezeptor Blockers APV die Werte für die Amplituden bei den höchsten Leistungsstufen umgekehrt, d.h. in der KO Gruppe nicht signifikant größer als im WT. Jedoch zeigt die Relation von Laserleistung zur Amplitude der exzitatorischen postsynaptischen Ereignisse (EPSE) eine Sättigung bei dem in Frage stehenden stärksten Uncaging-Puls, sodass hier möglicherweise der physiologische Bereich der MF-Synapse verlassen wurde. Außerdem zeigten sich in den Kontrollversuchen mit APV und CNQX zumeist auch keine signifikanten Unterschiede, die auf einen unterschiedlichen Besatz an Rezeptoren hindeuten würden.

In einer Studie in CA1-Pyramidenzellen wurde allerdings gezeigt, dass in Spines mit endoplasmatischem Retikulum (ER) größere EPSCs durch Uncaging von MNI-Glutamat erzeugt wurden gegenüber Spines ohne ER (*Holbro et al., 2009*). In den CA1-Pyramidenzellen besitzen allerdings nur circa 15 bis 20 % der Spines einen ausgebildeten Spine Apparat, der ein Derivat des glatten ER ist. Üblicherweise ist diese spezielle Organelle mit größeren Spines assoziiert, die als voll entwickelt gelten (*Vlachos et al., 2009*). Daher wurde auch eine positive Korrelation zwischen der Amplitude der induzierten EPSCs mit dem Spine-Volumen in den Experimenten von *Holbro et al. (2009, siehe Abbildung 1D und E)* gefunden, da die untersuchten ER-positiven Spines circa doppelt so groß waren wie die ohne ER. In Bezug auf das mit dem Spine Apparat assoziierte Protein Synaptopodin konnten in gleich großen Spines an ein und demselben Dendriten (primäre, hippocampale Zellkulturen von der Ratte) deutlich größere, durch Uncaging induzierte Ströme in Synpo-positiven Spines im Vergleich zu Spines ohne Synpo gemessen werden (*Vlachos et al., 2009*).

In den aktuellen Experimenten wurden immer Excrescenzen der proximalen Dendriten der Mooszellen in beiden Genotypen untersucht. Im WT enthalten diese Strukturen regelmäßig einen SA, wohingegen in der Synpo KO diese Organelle nicht zu finden ist. Dabei

treten aber keine Unterschiede in der Dichte und Größe der Excrescenzen auf (*Deller et al., 2003*), was sie zwischen den beiden Genotypen gut vergleichbar macht. Außerdem konnte in dieser Studie ebenfalls keine Veränderung der basalen Transmission in CA1-Pyramidenzellen in der Synpo-KO gegenüber dem WT festgestellt werden.

Die hier durchgeführten Untersuchungen mit den beiden verschiedenen Glutamat-Rezeptor-Antagonisten legen nahe, dass die Synapsen der Spines beider Genotypen mit gleichen Verteilungen der Rezeptoren ausgestattet sind. Die Potentiale und Ströme werden im Wildtyp und im Knock-out durch dieselben Rezeptoren vermittelt und werden im Folgenden zusammen betrachtet.

5.6. Heterogenität der induzierten elektrophysiologischen Einzel-Signale

Es trat, wie bereits erwähnt, innerhalb der einzelnen Uncaging-Stufen eine hohe Heterogenität zwischen den gemessenen elektrophysiologischen Signalen auf, was für beide hier untersuchten Genotypen zutraf.

In der Zusammenfassung von *Conti und Weinberg (1999)* wurde gezeigt, dass eine Variation in der Freisetzung eines Transmitters zu einer signifikanten Variabilität in der postsynaptischen Antwort führen kann. In der normalen synaptischen Transmission wird der Glutamat-Transient im synaptischen Spalt von der Freisetzung-Geschwindigkeit aus der Präsynapse, dem Diffusions-Koeffizienten und der Geometrie sowie der Breite des Spalts bestimmt. Ebenfalls kann die räumliche Beziehung zwischen der Aktiven Zone und der Rezeptor-Dichte das postsynaptische Signal beeinflussen (*Conti und Weinberg, 1999*).

Durch das Zwei-Photonen-Uncaging mittels eines kurzen Laser-Pulses wird das Glutamat allerdings gleichmäßig im ganzen Spalt freigesetzt, da die Punktspreizfunktion (PSF) des Punktscans diesen ganzen Bereich abdeckt. Dadurch können Faktoren, welche die Kinetik der Transmitter-Freisetzung aus der Präsynapse betreffen, vernachlässigt werden. Die hier gefundene Heterogenität der induzierten Signale könnte aber durchaus auf eine unterschiedliche Geometrie des synaptischen Spalts zurückzuführen sein. Durch unterschiedliche Spalt-Breiten kann mehr oder weniger Glutamat bei gleicher Laser-Leistung freigesetzt werden. Außerdem kann die Lage des synaptischen Spaltes relativ zur inhomogenen PSF von Spine zu Spine variieren. Die exakte Laser-Intensität am Spalt ist darüber hinaus nicht genau bekannt und somit auch nicht die tatsächliche Menge an freigesetztem Glutamat.

Eine wahrscheinlichere Erklärung für die Variabilität der Signale ist eine unterschiedliche Größe der Aktiven Zone und die Anzahl und Dichte der postsynaptischen Rezeptoren, die heterogen verteilt sein können, was schlussendlich auch zu unterschiedlichen Antworten in der Postsynapse führen kann.

Für andere Synapsen-Typen ist gezeigt, dass die beiden Rezeptor-Typen (AMPA und NMDA) unterschiedlich exprimiert werden. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von *Racca et al. (2000)* an CA1-Pyramidenzellen von Ratten belegten zum Beispiel, dass die meisten Synapsen NMDA-Rezeptoren enthalten und zu 85 - 90 % mit AMPA-Rezeptoren kolokalisiert sind. Dabei zeigt sich bei der Verteilung bzw. bei dem Gehalt der Rezeptoren eine geringere Variabilität als bei den AMPA-Rezeptoren. Eine unterschiedliche Expression der beiden Rezeptoren kann durchaus auch in den Moosfaser-Synapsen auftreten und zur gefundenen Heterogenität der Signale beitragen. In dieser Untersuchung zeigten einzelne Spines bei starker Stimulation zwar große elektrische Antworten jedoch keinen oder nur einen sehr geringen Kalziumeinstrom und andererseits waren große Kalziumtransienten bei mäßigen elektrischen Amplituden zu sehen. Diese Befunde sprechen für eine sehr unterschiedliche Ausstattung mit NMDA-Rezeptoren (siehe dazu Abschnitt 5.8).

Eine weitere mögliche Erklärung für die Heterogenität der elektrophysiologischen und auch der korrespondierenden Kalzium-Signale könnten verschiedene Typen von NMDARs sein, die sich aus unterschiedlichen Rezeptor-Untereinheiten zusammensetzen. So erklären die Autoren um *Sobczyk et al. (2005)* die in ihren Untersuchungen gefundene hohe Heterogenität der postsynaptischen Ströme zwischen einzelnen Spines, die ebenfalls durch Uncaging von MNI-Glutamat in CA1 Pyramiden-Zellen induziert wurden. Eine solche andersartige Rezeptor-Zusammensetzung kann für die Synapse zwischen Körnerzelle und Mooszelle nicht ausgeschlossen werden und müsste erst genauer in weiterführenden EM-Untersuchungen analysiert werden. Für CA1-Pyramidenzellen (Spines im Stratum radiatum) konnte bereits im EM gezeigt werden, dass es keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Untereinheiten des NMDA-Rezeptors zwischen Synpo-KO und Wildtyp-Mäusen gibt (unveröffentlichte Daten von *Pichler*). Allerdings konnten in dieser Arbeit keine Aussagen über die Anzahl funktionsfähiger Rezeptoren getroffen werden.

5.7. Basale synaptische Transmission wird hauptsächlich durch AMPA-Rezeptoren vermittelt

Die exzitatorischen postsynaptische Ströme und Potentiale werden durch zwei verschiedene Rezeptor-Typen vermittelt und zwar durch die AMPA- und die NMDA-Rezeptoren. Diese beiden beteiligten Rezeptor-Komponenten zeichnen sich dabei durch unterschiedliche Kinetiken aus, die durch pharmakologische Experimente sichtbar gemacht werden können. So setzt sich ein elektrophysiologisches Signal aus einer schnellen AMPA-vermittelten und einer langsamen NMDA-abhängigen Komponente zusammen (*Jonas und Spruston, 1994*). Für eine typische glutamaterge Synapse wie z.B. zwischen CA3 und CA1 wurde eine Anzahl der AMPAR von rund 0-150 Kanälen und für den NMDAR von circa 5-30 Kanälen geschätzt (siehe *Conti und Weinberg, 1999*). Diese Ungleichheit spiegelt sich dementsprechend auch in den unterschiedlichen Beiträgen an den elektrophysiologischen Signalen wieder.

In der Moosfaser-Synapse an CA3-Pyramidenzellen werden während der normalen synaptischen Transmission die EPSCs und EPSPs überwiegend durch AMPA-Rezeptoren vermittelt (*Jonas et al., 1993, Min et al., 1998*). Die durch das Uncaging induzierten Ströme und Potentiale in dieser Untersuchung unterscheiden sich in ihrer Amplitude nicht erheblich von den in CA3 Pyramidenzellen gemessenen Signalen. Daher ist anzunehmen, dass sie ebenfalls hauptsächlich durch die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren getragen werden. Aus diesem Grund wurden zwei pharmakologische Kontroll-Versuche durchgeführt, um die AMPA- und NMDA-Komponenten der exzitatorischen Signale bestimmen zu können. Werden die NMDA-Rezeptoren mit dem spezifischen Antagonist APV geblockt, können im Vergleich zu normalen Experiment-Bedingungen schnellere Anstiegsraten der induzierten Signale bestimmt werden. So nimmt zum Beispiel die 20-80% Anstiegsrate der EPSCs (EPSPs) im Wildtyp in der höchsten Uncaging-Stufe von rund -123 nA/s (2769 mV/s) auf circa -140 nA/s (2864 mV/s) zu. Dies passt zu der schnellen Komponente der AMPA-vermittelter Transmission. Werden hingegen die AMPA-Rezeptoren mit dem spezifischen Antagonisten CNQX blockiert, wird die langsame NMDA-abhängige Komponente deutlich sichtbar. So sinken die Raten auf circa -8 nA/s bzw. 212 mV/s ab. Die Ströme sowie Potentiale, die durch die AMPA-Rezeptoren gebildet werden (Blockade von NMDA durch APV), sind im Vergleich zu den NMDA-Signalen (Blockade der AMPAR durch CNQX) um ein Vielfaches größer. Dabei kann das Verhältnis zwischen den AMPAR- und NMDAR-vermittelten synaptischen Strömen, welches abhängig ist von der Entwicklung und der jeweiligen Hirnregion bzw. des Zelltyps, über einen weiten Bereich variieren (*Traynelis et al., 2010*).

Die hier durchgeführten Experimente legen die Schlussfolgerung nahe, dass die an der Moosfaser-Synapse zwischen Körnerzelle und Mooszelle erzeugten erregenden postsynaptischen Signale hauptsächlich durch AMPA-Rezeptoren vermittelt werden, mit einem kleineren Anteil der NMDA-Rezeptoren. In einer früheren Studie über die Charakterisierung der Mooszelle durch *Scharfman (1993)* wurde gefunden, dass die spontanen als auch induzierten EPSPs der Mooszelle größtenteils durch die Aktivierung von AMPA/Kainat Rezeptoren erzeugt werden. Die Verabreichung von CNQX blockierte in diesen Untersuchungen komplett die spontane Aktivität der Zellen, d.h. in den elektrophysiologischen Ableitungen waren keinerlei APs oder EPSPs mehr zu erkennen (siehe dazu Abbildung 5 bei *Scharfman, 1993*). In den hier durchgeführten Uncaging-Versuchen konnten hingegen die NMDAR-vermittelten Depolarisierungen beobachtet und analysiert werden. Außerdem ist die Aktivierung des NMDAR vor allem am gleichzeitig mit den EPSEs gemessenen Kalzium-Einstrom ersichtlich.

5.8. Induzierte postsynaptische Signale sind nicht immer mit einem Kalzium-Einstrom verbunden

Die durch das Uncaging induzierten Ströme und Potentiale sind nicht immer mit einem gleichzeitigen Kalzium-Einstrom in den Spine verbunden. In den Experimenten ist zu beobachten, dass die Anzahl der mit Kalzium-antwortenden Spines und die Amplituden der Kalzium-Transienten über die sechs Uncaging-Stufen hinweg zunehmen. Damit folgt das Kalzium-Signal in etwa der Zunahme der Amplituden der elektrophysiologischen Signale. Das heißt je höher die Amplituden der Potenziale bzw. Ströme ausfallen, umso häufiger treten auch gleichzeitig Kalzium-Transienten mit größerer Amplitude auf.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass mit zunehmender Freisetzung von Glutamat mehr Kalzium-permeable NMDA-Rezeptoren aktiviert werden. Außerdem können durch die erhöhte Depolarisierung der Membran, vermittelt durch die AMPA-Rezeptoren, spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (VGCC) stimuliert werden.

Des Weiteren führt die stärkere Depolarisation mit höherer Wahrscheinlichkeit zum Entfernen des Magnesium-Blocks des NMDA-Rezeptors und so kann mehr Kalzium durch den Kanal in den Spine einströmen. Im Allgemeinen sind die NMDA-Rezeptoren während des Ruhemembranpotentials (bei Mooszellen rund -60 mV) größtenteils durch extrazelluläre Magnesium-Ionen blockiert. Dieser Block kann allerdings durch eine zunehmende

Depolarisation der Membran allmählich aufgehoben werden (*Kampa et al., 2004*), wobei bereits bei mäßiger Depolarisation eine Leitfähigkeit in dieser Studie zu sehen war. Gerade in den hier durchgeführten Kontroll-Experimenten, in denen die AMPA-Rezeptoren durch CNQX gehemmt wurden, konnten kleine Ströme und Potentiale und vor allem auch gleichzeitige Kalzium-Transienten gemessen werden. Diese sind nur durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren erklärbar. Also ist nicht bei allen Rezeptoren der Block durch Mg^{2+} bei dem normalen Ruhemembranpotential vollständig. Dies zeigten auch bereits die Autoren in der Studie von *Kovalchuk et al. (2000)*, die in CA1 Pyramidenzellen ebenfalls kleine EPSP Amplituden beim RMP messen konnten, wenn die AMPA-Komponente der synaptischen Signale durch CNQX geblockt wurde. Da aber auch unter der NMDAR-Blockade mit APV die Anzahl und die Amplitude der wenigen detektierten Transienten ansteigt, ist offensichtlich eine vermehrte Aktivierung der VGCCs durch erhöhte Depolarisation durch den AMPA-Rezeptor zusätzlich an den Kalzium-Signalen beteiligt. Eine weitere ausführliche Betrachtung der Hauptwege des Kalzium-Einstroms in den Spine während der basalen synaptischen Transmission erfolgt im nächsten Kapitel.

In einer Studie von *Reid und Kollegen (2001)* wurden bereits Moosfaser-Synapsen einzeln elektrisch stimuliert und die resultierenden Signale analysiert. Dabei wurden auch EPSPs beobachtet, die nicht einen gleichzeitigen Kalzium-Einstrom nach sich zogen. Die Schlussfolgerung der Autoren war letztendlich, dass ein Ausbleiben eines Kalzium-Transienten durch das Fehlen der Transmitter-Freisetzung aus der Präsynapse her resultiert. In den hier durchgeführten Versuchen wurde hingegen die Präsynapse bzw. die Freisetzung des Transmitters durch das Uncaging simuliert und die einzelne Synapse direkt durch das freiwerdende Glutamat aktiviert. Somit kann das Ausbleiben der Kalzium-Transienten in den aktuellen Versuchen nicht durch ein Versagen der Präsynapse erklärt werden, sondern ist auf postsynaptische Prozesse oder unterschiedliche Rezeptor-Verteilungen zurückzuführen.

5.9. Kalzium-Einstrom während der normalen synaptischen Transmission erfolgt hauptsächlich durch NMDA-Rezeptor Kanäle

Für den Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration in der Zelle sowie im Spine sind drei Hauptwege denkbar: der Einstrom aus dem Extrazellularraum durch ionotrope Glutamat-Rezeptoren und spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (VGCC) und Freisetzung aus internen

Kalzium-Speichern. Die mögliche Freisetzung von Kalzium aus einem intrazellulären Speicher wie dem Spine Apparat wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

Viele Studien fanden einen Einstrom von Kalzium durch NMDA-Rezeptor Kanäle und/oder spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (VGCC) während der basalen synaptischen Transmission. So wurde bereits in den Untersuchungen der Moosfaser-Synapse an den Excrescencen der CA3 Pyramidenzellen (Schnittkulturen von Ratten) durch *Reid et al. (2001)* der Frage nach der Hauptquelle des Kalzium-Einstroms nachgegangen. Durch eine elektrische Stimulation erzeugten sie ebenfalls einzelne synaptische Ereignisse mit einem detektierbaren Kalzium-Transienten. Diese sind allerdings hauptsächlich durch Einstrom von Kalzium durch VGCC (vor allem vom N, P, Q-Typ), die durch die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren gesteuert werden, vermittelt. Bei der Verabreichung des AMPAR-Blockers CNQX verschwanden die elektrophysiologischen Signale sowie auch die Kalzium-Antworten. Außerdem untersuchten die Autoren die Beteiligung der NMDA-Rezeptoren, in dem sie diese durch APV blockten. Dabei konnte nur eine Reduktion der Kalzium-Antworten auf rund 53 % erreicht werden. Somit zeigten die Autoren, dass ungefähr die Hälfte des Kalzium-Einstroms durch den NMDA-Rezeptor erfolgt. Einen Einstrom durch Kalzium-permeable AMPARs schlossen die Autoren ebenfalls für die Moosfaser-Synapse aus.

Vergleichend dazu werden in den hier durchgeführten Uncaging-Experimenten etwas andere Ergebnisse gefunden. Die Hauptquelle des Kalzium-Einstroms bei den einzelnen induzierten synaptischen Ereignissen ist hier der NMDAR-Kanal. Durch die Verabreichung des spezifischen Antagonisten APV konnte ein Großteil der Kalzium-Transienten unterbunden werden, was an dem geringeren prozentualen Anteil der antwortenden Spines im Gegensatz zu den Versuchen unter Normalbedingungen zu erkennen ist. Darüber hinaus ist die maximale Amplitude der Transienten unter APV deutlich reduziert (WT ca. 67 % und KO ca. 62 %).

Des Weiteren konnten unter Hemmung der AMPA-Rezeptoren durch CNQX Kalzium-Transienten gemessen werden, die in der durchschnittlichen Amplitude wieder fast an die unter Normalbedingungen heranreichen. Die prozentualen Anteile der mit Kalzium antwortenden Spines sind in den beiden Versuchsbedingungen annähernd gleich. Dadurch kann eigentlich eine bedeutende Beteiligung der VGCC, die durch die AMPA-Rezeptoren gesteuert werden, ausgeschlossen werden. Um die Frage nach der Quelle des unter NMDAR-Blockade verbleibenden Kalzium-Einstroms zu klären, müssten weitere Versuche mit den jeweiligen Blockern für die verschiedenen VGCC-Typen durchgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit des Kalzium-Einstroms wäre noch die Beteiligung Kalzium-permeabler AMPA-Rezeptoren, die ein weiteres Set an Experimenten notwendig machen würde. Ein Vorhandensein solcher Rezeptoren in der MF-Synapse an CA3-Pyramidenzellen

wurde durch *Reid et al. (2001)* experimentell nicht bestätigt, allerdings könnte die MF-Synapse der Mooszellen in dieser Hinsicht einen unterschiedlichen Rezeptor-Besatz aufweisen. Im Stratum radiatum der CA1-Pyramidenzellen wurde eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Untereinheiten GluR1 und GluR2 der AMPA-Rezeptoren in Synpo-KO und WT Mäusen durchgeführt. Dieses zeigte, dass die Anzahl der GluR2-positiven Synapsen im KO gegenüber dem WT signifikant geringer ausfiel (unveröffentlichte Daten von *Pichler*). Dabei weisen GluR2-negative AMPA-Rezeptoren eine erhöhte Kalzium-Leitfähigkeit und -Permeabilität auf (siehe dazu Review *Isaac et al., 2007*). Dies könnte eine Kompensation zum Fehlen des Spine Apparates darstellen, allerdings konnte in der genannten Arbeit kein direkter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines SAs und der GluR2 Untereinheit hergestellt werden. Außerdem konnte keine Aussage über die Anzahl funktionsfähiger Rezeptoren getroffen werden. Um die Beteiligung Kalzium-permeabler AMPA-Rezeptoren nachzuweisen, müssten Versuche mit einem spezifischen Blocker für diese Rezeptoren durchgeführt werden und die Kalzium-Signale gemessen werden.

In ausnahmslos allen hier untersuchten Excrescenzen waren funktionsfähige Spannungs-gesteuerte Kalzium-Kanäle vorhanden. Dies zeigten die Experimente mit den Serien von 15 oder auch 24 bAPs mit jeweils unterschiedlicher Frequenz. In Folge der durch kurze Strominjektionen im Soma ausgelösten APs, die in die Dendriten und Spines propagieren, konnte immer ein deutlicher Kalzium-Transient im Spine-Zytoplasma gemessen werden, der nur durch die VGCC vermittelt werden konnte, da zu diesem Zeitpunkt keine synaptische Aktivierung durch Glutamat-Uncaging vorhanden war. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist im Gegensatz zu den Einzel-Signalen jedoch reduziert (z.B. im WT 78 Zellen mit Uncaging vs. 51 Zellen mit bAPs), da nicht komplett von Beginn an die bAP-Serien in die Experimente integriert waren und/oder die gemessenen Zellen aus anderen Gründen aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Zum Beispiel führte eine Verschlechterung des RMPs oder ein Anstieg des Serienwiderstands zum Versuchs-Abbruch. In einigen Fällen konnten auch keine APs ausgelöst werden oder während der Abfolge der induzierten APs traten natürliche APs auf. Bei den induzierten Einzel-Signalen konnten in allen Experimenten kein Unterschied zwischen Wildtyp und Synaptopodin Knock-out beobachtet werden und daraus lässt sich schließen, dass die MF-Synapsen beider Genotypen wahrscheinlich mit einem gleichen Besatz an VGCCs ausgestattet sind. Um dies vollständig und eindeutig zu klären, müssten zusätzliche Experimente mit spezifischen Blockern für die verschiedenen Typen der VGCC durchgeführt werden.

5.10. Der Spine Apparat ist während der basalen synaptischen Transmission nicht als Kalzium-Quelle beteiligt

Die Frage, ob während der synaptischen Transmission auch die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern an den Kalzium-Veränderungen in Spines beteiligt ist, stellten sich schon einige Forschergruppen und gelangten zu den unterschiedlichsten Ergebnissen (siehe Überblick über Kalzium in dendritischen Spines von *Higley und Sabatini, 2012*). Bis zum heutigen Tage ist diese Frage nicht eindeutig geklärt.

So fanden *Reid et al. (2001)* keinen Einfluss einer Kalzium-abhängigen Kalzium-Freisetzung (CICR) aus vorhandenen und funktionsfähigen internen Speichern in komplexen Spines von CA3-Pyramidenzellen der Ratte bei einzelnen synaptischen Ereignissen. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten auch *Kovalchuk et al. (2000)*, die in CA1-Pyramidenzellen nur einen geringen Einfluss von pharmakologischen Substanzen fanden, die eine direkte Wirkung auf die Speicher hatten. Ein Kalzium-Speicher ist während einer niederfrequenten synaptischen Transmission gemäß den Autoren nicht wichtig, kann aber dazu dienen, freies Kalzium aufzunehmen und damit die Kalzium-Konzentration im Spine zu regulieren.

Zu einem gegenteiligen Ergebnis kamen hingegen *Emptage et al. (1999)* in CA1- und CA3-Pyramidenzellen der Ratte. Ihre Resultate lassen sie schlussfolgern, dass der Anstieg der Kalzium-Konzentration im Spine als Antwort auf einen einzelnen synaptischen Stimulus im Wesentlichen auf CICR beruht. Dieser wird dabei durch den Einstrom von Kalzium durch die NMDAR-Kanäle ausgelöst.

Allerdings sind diese Versuche und Ergebnisse nur indirekte Hinweise auf einen funktionsfähigen Kalzium-Speicher im Spine, da in der Regel meist pharmakologische Substanzen verwendet werden, die in der gesamten Zelle am kompletten endoplasmatischen Retikulum wirksam werden und Nebeneffekte auslösen können. Durch die Verwendung der Synpo Knock-out Maus, die keinen Spine Apparat ausbildet, kann in direktem Vergleich zum Wildtyp dessen Funktion und Einfluss auf die Kalzium-Signale untersucht werden. Die gemessenen Kalzium-Transienten beider Genotypen unterschieden sich weder in der Häufigkeit des Auftretens noch in der mittleren Amplitude einzelner durch Uncaging induzierter postsynaptischer Signale. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass während der basalen synaptischen Transmission der Spine Apparat keine Rolle spielt und nicht an den intrazellulären Kalzium-Veränderungen im Spine beteiligt ist.

Dies ist damit der erste direkte Nachweis, dass während der normalen synaptischen Transmission an der Moosfaser-Synapse der Spine Apparat für die Kalzium Kinetik keine wesentliche Rolle spielt. Als Hauptquelle dient dabei der Kalzium-Einstrom durch die NMDA-Rezeptoren und zu einem geringeren Anteil durch die VGCC.

5.11. Beteiligung des Spine Apparats als zusätzliche Kalzium-Quelle während starker synaptischer Stimulation

5.11.1. Grundlagen für die Induktion von Langzeitpotenzierung

Im Allgemeinen anerkannt ist die Tatsache, dass Kalzium eine essentielle Funktion bei der Langzeitveränderung der synaptischen Transmission besitzt. Dabei spielt vor allem der Kalzium-Einstrom durch NMDA-Rezeptoren für die Induktion der Potenzierung oder auch Depression synaptischer Signale eine wichtige Rolle (*Segal, 2005*). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass in diese Prozesse auch interne Kalzium-Speicher wie z.B. der Spine Apparat involviert sind.

An der hier untersuchten Moosfaser-Synapse ist vor allem eine präsynaptische Form der Plastizität bekannt. Bei der Langzeitpotenzierung (LTP) kommt es dabei auf der präsynaptischen Seite zu einer vermehrten Freisetzung von Glutamat aus den synaptischen Vesikeln. In den letzten Jahren wurde aber auch eine postsynaptische Form der LTP gefunden, die durch die NMDA-Rezeptoren vermittelt wird und die NMDAR-vermittelte synaptische Transmission selektiv verstärkt (*Kwon und Castillo, 2008; Rebola et al., 2011*). Für die Induktion dieser speziellen Form des LTPs wird außerdem auch eine signifikante Akkumulation von postsynaptischem Kalzium benötigt, wobei der Einstrom durch den NMDA Kanal die Hauptquelle des Kalziums darstellt (*Kwon und Castillo, 2008*). Der auffälligste Unterschied besteht im Stimulations-Protokoll zur Induktion dieser Art der Potenzierung, da eine niederfrequente Stimulation (nur ein Zyklus von circa einer Sekunde bei 25 Hz) verwendet wird im Gegensatz zur traditionellen hochfrequenten Stimulation (zumeist eine Serie von mehreren Stimulationszyklen mit einer Frequenz von 100 Hz).

Aus diesem Grund wurde in den hier durchgeführten Experimenten das Stimulations-Protokoll von *Kwon und Castillo (2008)* in einer abgewandelten Form angewendet. Es wurden dafür 24 synaptische Ereignisse (durch Uncaging induziert) mit 24 Aktionspotentialen (eine

Serie von kurzen Strominjektionen am Soma) mit einer Frequenz von 25 Hz kombiniert. Es zeigte sich, dass eine Abfolge von induzierten EPSPs allein nur gelegentlich und dabei nur sehr kleine Kalzium-Transienten hervorrief. Die Kombination mit bAPs sollte einen möglichst großen Einstrom von Kalzium in den Spine sicherstellen. Die Depolarisation durch die Aktionspotentiale diene vor allem dazu, den Magnesium-Block eines möglicherweise gegenwärtigen NMDA-Rezeptors zu lösen und dadurch einen vermehrten Kalzium-Einstrom durch den Kanal zu ermöglichen. Dass im Vergleich zu den Kalzium-Transienten der induzierten Einzel-Signale erheblich mehr Kalzium in den Spine während der Stimulation einströmt, zeigt die Abb. 5.4 – A.

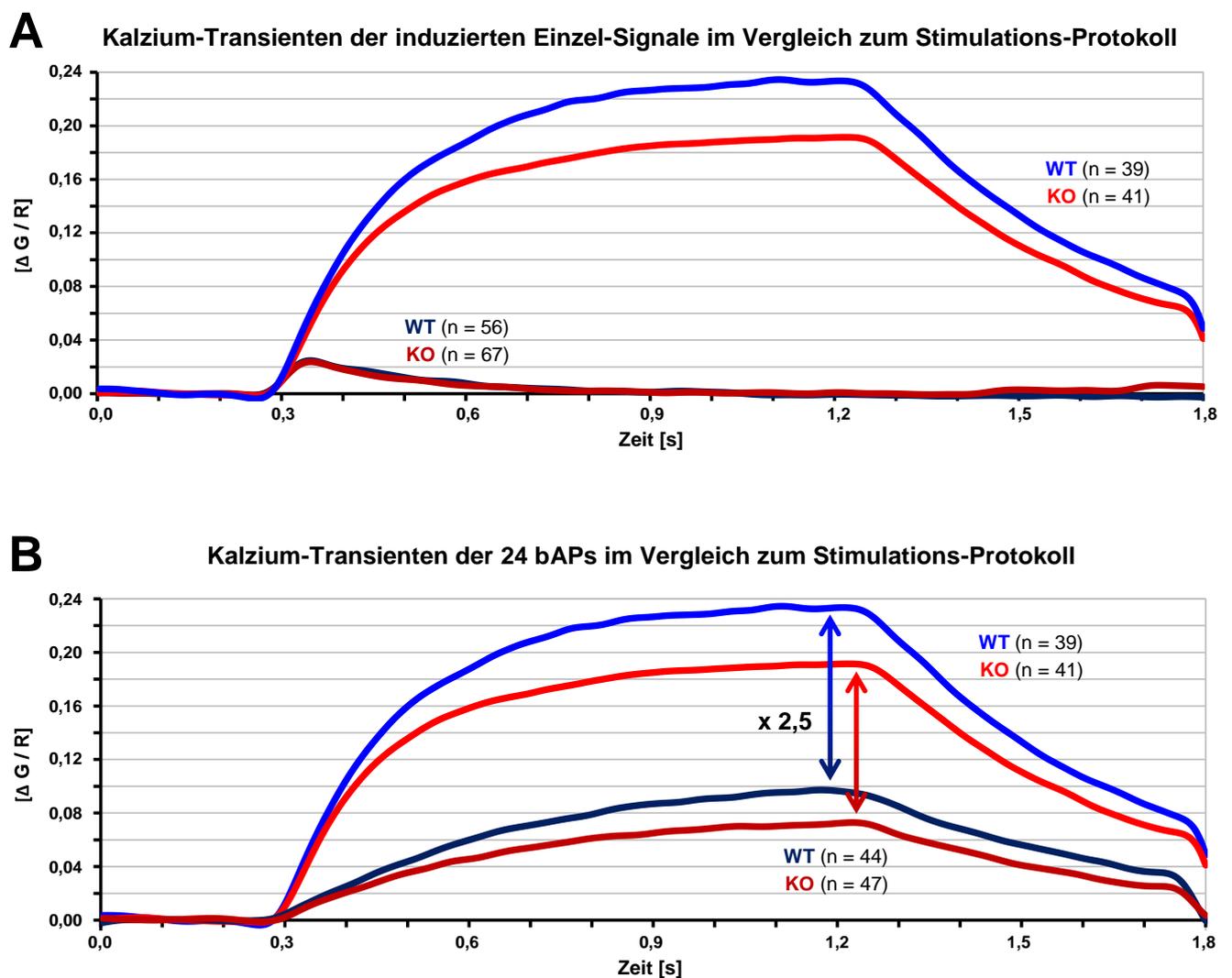


Abb. 5.4: Deutlich erhöhtes Kalzium während des Stimulations-Protokolls zur Induktion des NMDA-Rezeptor abhängigen LTPs; Vergleich der Kalzium-Transienten von **WT** und **KO** während des Stimulations-Protokolls **(A)** mit den Transienten der mittels Uncaging induzierten Einzel-Signale bei 21,79 mW (**WT** und **KO**) oder **(B)** mit den Transienten der 24 bAPs ebenfalls für **WT** und **KO**; für die starke synaptische Stimulation wurden 24 durch Uncaging induzierte EPSPs (bei konstant 20 mW) mit 24 bAPs mit einer Frequenz von 25 Hz kombiniert;

Dabei gilt im Allgemeinen die Annahme, dass große und schnelle Kalzium-Transienten eine Potenzierung induzieren, wohingegen kleinere und langsamere Transienten eine Depression verursachen (*Abbott und Nelson, 2000*). Außerdem zeigten bereits *Nevian und Sakmann (2006)* in ihrer Studie, dass die jeweilige Stimulation mit prä- oder postsynaptischen Impulsen ohne assoziierte APs für sich allein keine Veränderung in der synaptischen Transmission erzielte.

Bereits *Carter und Sabatini (2004)* benutzen dieses Paradigma der Impuls- und zeitabhängigen Plastizität (sogenannte Spike-timing-dependent plasticity, STDP) und kombinierten ebenfalls bAPs und durch Uncaging induzierte synaptische Aktivität (ebenfalls MNI-Glutamat). Dabei erzeugte diese Verknüpfung eine deutliche Verstärkung des Kalzium-Signals vermittelt durch den NMDA-Rezeptor gegenüber den jeweiligen Einzel-Messungen allein (siehe dazu die Abbildung 6 bei *Carter und Sabatini, 2004*). Im Vergleich zur Abfolge der 24 bAPs bei 25 Hz kann eine solche Verstärkung bzw. der Anteil des Kalziums, der durch den NMDA-Rezeptor Kanal in den Spine einströmte, während des Potenzierungs-Protokolls bestimmt werden. Die durchschnittlichen Amplituden der Kalzium-Transienten sind um circa das 2,5fache erhöht, wie in der Gegenüberstellung in Abbildung 5.4 unter B zu erkennen ist. Da der Hauptweg des Kalziums während der Serie der Aktionspotentiale durch die VGCCs besteht, ist dieser Unterschied durch einen zusätzlichen Einstrom durch aktivierte NMDA-Rezeptoren zu erklären.

Außerdem ist unter dem Einfluss des NMDAR-Blockers APV eine deutliche Reduktion, allerdings nicht auf das Niveau der individuellen 24 bAP-Serie, der Kalzium-Transienten zu erkennen. Dieser restliche Kalzium-Einstrom ist möglicherweise auf eine stärkere Rekrutierung von VGCCs zurückzuführen, da die Zellmembran nun zusätzlich durch aktivierte AMPA-Rezeptoren depolarisiert wurde. Werden hingegen die AMPA-Rezeptoren, nicht aber die NMDA-Rezeptoren, geblockt, so erreichen die Kalzium-Amplituden wieder höhere Werte bzw. fast gleiche Amplituden wie unter Normalbedingungen (vor allem zutreffend für den Synpo-KO). Auch wenn die Anzahl der gemessenen Spines unter diesen Bedingungen sehr gering ist, lässt sich trotzdem schlussfolgern, dass die Differenz in den Kalzium-Amplituden zwischen APV und CNQX wirklich auf die NMDA-Rezeptoren zurückzuführen ist. Des Weiteren ist auffällig, dass der Kalzium-Einstrom (die relative Änderung der ermittelten Fluoreszenzen bzw. Kalzium-Konzentrationen über die Zeit) bei der starken Stimulation relativ schnell erfolgt im Gegensatz zu der langsamen Zunahme bei der 24 bAP-Serie. So liegen die Kalzium-Einstromraten $[(\Delta G/R)/s]$ im WT z.B. bei rund 1,07 bei der starken Stimulation vergleichend mit rund 0,28 bei den reinen b-AP-Serien. Bei der Hemmung des NMDARs unter APV Einfluss sinken die Einstrom-Raten des Kalzium-Transienten bei dem Stimulations-

Protokoll auf ein merklich geringeres Niveau (für den WT auf einen Wert von rund 0,44) ab, was nur leicht über dem der reinen bAP-Serie ohne Blocker liegt. Unter der Einwirkung von CNQX (in Abwesenheit von APV) werden hingegen wieder fast identische Werte für die Einstromraten ermittelt, was dafür spricht, dass die schnelle NMDAR-vermittelte Komponente des Kalzium-Transienten wieder vorhanden ist.

Letztendlich kann zu dem Schluss gekommen werden, dass der vor allem schnelle und verstärkte Kalzium-Einstrom tatsächlich durch die synaptische Aktivierung des NMDAR-Kanals vermittelt wird.

Während der Induktion der Impuls- und zeitabhängigen Plastizität (STDP) ist das Resultat abhängig von der zeitlichen Abfolge der prä- und postsynaptischen Signale. Durch unterschiedliche Kombinationen kann entweder eine Verstärkung oder eine Hemmung der synaptischen Aktivität ausgelöst werden. Nach *Markram et al. (1997)* müssen dabei auch die Signale innerhalb von 100 ms zusammentreffen, um überhaupt irgendeine Veränderung nach sich zu ziehen. In den verschiedensten Studien wurde außerdem festgestellt, dass die Verbindung von präsynaptischer Aktivität (EPSP) gefolgt von einem postsynaptischen Signal (bAP) mit einer Zeitverzögerung von 10 ms stets eine Langzeitpotenzierung induziert wird (*Markram et al., 1997, Nevian und Sakmann, 2006*). Für die Moosfaser-Synapse an CA3-Pyramidenzellen zeigten bereits *Astori et al. (2010)*, dass ein Zeitintervall von 10 ms zwischen der synaptischen Aktivität und den Aktionspotentialen eine Potenzierung zur Folge hat. Deshalb wurde auch in den hier durchgeführten Experimenten dieses spezielle Zeitintervall von 10 ms zwischen den durch Uncaging induzierten EPSPs und den bAPs gewählt, da eine NMDA-Rezeptor abhängige Potenzierung an der MF-Synapse der Mooszellen ausgelöst werden sollte. Außerdem hat das langsame Lösen des Magnesium-Blocks einen großen Einfluss auf das Zeitfenster für die NMDA-Rezeptor Aktivierung während der STDP Induktion. Die größten NMDAR-Ströme werden erzielt, wenn eine Depolarisierung (also das rückpropagierende AP) auch 10 ms nach der Applikation des Glutamats erfolgt (siehe dazu die Versuche und Modelrechnungen von *Kampa et al., 2004*). Bei einem solchen Abstand ist der NMDA-Rezeptor somit am stärksten aktiviert und auch für Kalzium durchlässig. Das Resultat daraus sind die sehr hohen Kalzium-Transienten während der Potenzierung in den hier durchgeführten Experimenten.

5.11.2. Die Rolle des Spine Apparates

In den Untersuchungen von *Deller et al. (2003)* wurden Hinweise gefunden, dass Synaptopodin und der mit dem Protein assoziierte Spine Apparat eine Rolle bei den Prozessen der synaptischen Plastizität und des Lernens spielen. In der Studie war das extrazellulär gemessene LTP in CA1-Pyramidenzellen in den Synpo Knock-out Mäusen reduziert. In dieser Untersuchung konnte jedoch der Mechanismus, über den der Spine Apparat an diesen Vorgängen beteiligt ist, nicht geklärt werden, da z.B. kein gleichzeitiges Kalzium-Imaging durchgeführt wurde. Die hier durchgeführten Experimente sind damit ein Beitrag zum schließen dieser Lücke.

Unter der Hypothese, dass der SA als Kalzium-Speicher dient, wurden die Kalzium-Kinetik in einzelnen Spines von Mooszellen von WT und Synpo-KO Mäusen untersucht. Dabei lag der Fokus auf der Moosfasersynapse, weil die Excrescenzen der Mooszellen fast immer einen SA im Wildtyp ausbilden, auch in den hier verwendeten organotypischen Schnittkulturen (siehe Immunfärbung gegen Synpo Abb. 3.2 und EM-Aufnahme Abb. 3.3). Im Gegensatz dazu prägen hingegen die Spines der oft untersuchten CA1-Pyramidenzellen nur zu ca. 15 bis 20 % einen vollentwickelten Spine Apparat (*Holbro et al., 2009*) aus. In den Spines der Synpo-KO wird der SA nicht ausgebildet, bei ansonsten normaler Morphologie der Neuronen bzw. Spines (*Deller et al., 2003*). Dadurch ist diese Knock-out Maus sehr gut für die genaue Untersuchung der Funktion des Spine Apparats geeignet, da durch den Vergleich der gemessenen Kalzium-Transienten in Excrescenzen vom Wildtyp („littermates“) die mögliche Rolle als intrazellulärer Kalzium-Speicher direkt gezeigt werden kann.

Während der normalen synaptischen Transmission konnte in dieser Studie, wie bereits erwähnt, keine Beteiligung des SAs an der Kalzium-Kinetik im Spine beobachtet werden. Allerdings wurde während der kombinierten, starken Stimulation mit uEPSPs und bAPs zwischen den beiden Genotypen ein Unterschied in den Kalzium-Transienten gefunden. So waren die mittleren Kalzium-Transienten im KO um etwa 25 % in ihrer Amplitude im Vergleich zum WT reduziert und zeigten außerdem deutlich langsamere Kalzium-Einstromraten (1,07 im WT vs. 0,77 im KO). Dieser Unterschied ist auf das Fehlen des Spine Apparates in der KO zurückzuführen und spricht für eine Funktion des SAs als interner Kalzium-Speicher in Spines. Bei erhöhten Kalzium-Konzentrationen im Zytoplasma kommt es zu einem Kalzium-induzierten Kalzium-Ausstrom („calcium-induced calcium-release“, CICR) aus dem vorhandenen Speicher im Wildtyp, wohingegen dieser Mechanismus im Knock-out fehlt. Im WT wird durch diese zusätzliche Quelle das Kalzium-Signal im Spine verstärkt und steigt deshalb

auch mit einer schnelleren Rate an. Das Fehlen des Spine Apparates kann in seiner Funktion als Kalzium-Speicher offensichtlich nicht durch einzelne ER-Zisternen, die in den KO-Spines auftreten (*Deller et al., 2003*), kompensiert werden.

Die gleiche Beziehung zwischen WT und KO zeigten auch die Ergebnisse der beiden hier verwendeten reinen bAP-Serien (15 und 24 bAPs), in denen die Kalzium-Konzentration im Vergleich zu den einzelnen Glutamat-Uncaging Ereignissen ebenfalls deutlich erhöht war. Hier unterschieden sich die maximalen Kalzium-Amplituden der beiden Genotypen im Vergleich zueinander um rund 24 % (15 bAPs) bzw. 29 % (24 bAPs). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass für den Prozess des CICR aus dem SA nur die Höhe der auslösenden Kalzium-Konzentration wesentlich ist, nicht jedoch der Ort des Kalzium-Einstroms entweder über die NMDAR oder die VGCCs. Dies steht im Gegensatz zu *Emptage et al. (1999)*, die eine selektive Assoziation zwischen dem Kalzium-Speicher und dem NMDA-Rezeptor schlussfolgerten, da die Autoren keinen CICR durch reine bAPs (ausschließlich Aktivierung der VGCCs) beobachteten.

Die hier durchgeführten Versuche liefern somit einen ersten direkten experimentellen Nachweis, dass der Spine Apparat eine zusätzliche Kalzium-Quelle in dendritischen Spines bei stärkerer Stimulation, die zur Induktion von synaptischer Plastizität führen kann, darstellt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der SA während der normalen synaptischen Transmission in Bezug auf die Kalzium-Kinetik im Spine keine Rolle spielt.

5.12. Synaptische Plastizität?

Es stellt sich natürlich die Frage, ob der Spine Apparat auch einen Einfluss auf die synaptische Aktivität nach erfolgter Durchführung eines typischerweise zu STDP führenden Stimulations-Protokolls hat und ob eine NMDA-Rezeptor abhängige Langzeitpotenzierung an der MF-Synapse induziert werden kann. Hat das Vorhandensein des SAs und damit verbunden eine höhere Kalzium-Konzentration im Spine-Zytoplasma des Wildtyps im Vergleich zur Synaptopodin Knock-out zur Folge, dass zwischen den beiden Genotypen eine unterschiedliche Potenzierung zu finden ist? Eine klare Antwort darauf können die aktuellen Untersuchungen nicht liefern. Dafür müssten in weiterführenden Versuchen die gleichen Testpulse vor und nach dem Potenzierungs-Stimulus gemessen und gegeneinander verglichen werden.

Des Weiteren muss eine große Anzahl an Messungen vorgenommen werden, da die individuellen Spines bzw. Synapsen sich in einem unterschiedlichen Aktivitätszustand befinden können. Sie können bereits aufgrund der spontanen synaptischen Aktivität in der Schnittkultur vor Beginn des Experiments in sehr unterschiedlichem Maße potenziert sein. Je nach dem in welchem Ausgangs-Zustand sich die Synapse befindet, werden vermutlich auch die Antworten auf das Potenzierungs-Protokoll unterschiedlich ausfallen. Dass bei einem identischen Stimulations-Protokoll verschiedene Resultate (Potenzierung, Depression oder keinerlei Plastizität) erzielt wurden, zeigte z.B. die Studie von *Clark und Normann (2008)* in CA1-Pyramidenzellen in akuten Schnitten der Ratte. Ein Hinweis, dass die Spines oder Synapsen in den hier untersuchten Mooszellen unterschiedliche Aktivitäts-Zustände ausbilden, könnte in der sehr hohen Heterogenität der gemessenen Antworten gefunden werden. So konnten z.B. kleine (oder auch große) elektrophysiologische Antworten durch Uncaging induziert werden, die ein gleichzeitiges Kalzium-Signal nach sich zogen oder aber keinerlei Kalzium-Einstrom zeigten.

Dass der Spine Apparat bzw. das mit ihm assoziierte Protein Synaptopodin eine Rolle bei der Langzeitpotenzierung spielt, wurde bereits durch mehrere Studien mit den verschiedensten Techniken gezeigt (siehe dazu *Segal et al., 2010; Deller et al., 2007* oder *Jedlicka et al., 2008*). So wurde durch extrazelluläre Ableitungen eine Reduktion der LTP in CA1-Pyramidenzellen in der Synpo KO-Maus gegenüber dem WT gefunden (*Deller et al., 2003*). In einer anderen Studie konnte nach der Induktion von LTP in Körnerzellen ein gestiegenes Niveau der Synpo mRNA und des Proteins nachgewiesen werden und eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Potenzierung geschlussfolgert werden (*Yamazaki et al., 2001* und *Fukazawa et al., 2003*). Des Weiteren wurde in dissoziierten Hippocampus-Kulturen der Ratte ebenfalls ein schneller Anstieg von Synpo nach LTP-Induktion in Spines festgestellt (*Vlachos et al., 2009*).

Im Gegensatz zu den erwähnten Studien konnte in den hier durchgeführten Experimenten eine direkte Korrelation zwischen den elektrophysiologischen Ereignissen und den Kalzium-Veränderungen im Zytoplasma eines einzelnen Spines bzw. einer individuellen Synapse hergestellt werden. Durch den Vergleich zwischen Synaptopodin Knock-out und Wildtyp konnte dann auch direkt auf eine Beteiligung des Spine Apparates an den Kalzium-Transienten geschlossen werden. Außerdem konnte dadurch auch auf pharmakologische Modulatoren, die mögliche Nebeneffekte nach sich ziehen, verzichtet werden. In den meisten Studien wurde außerdem die Schaffer-Kollateral-Synapse an CA1-Pyramidenzellen untersucht. Allerdings konnte in nur 15 bis 20 % der Zellen ein vollentwickelter Spine Apparat gefunden werden (*Holbro et al., 2009*), wohingegen die Excrescenzen der Mooszellen oder

auch CA3-Pyramidenzellen fast immer einen SA enthalten (*Spacek und Harris, 1997*). Daher sind diese beiden Prinzipalzellen für die Untersuchung der Funktion des SAs viel besser geeignet. Letztendlich konnte durch diese Arbeit ein erster direkter Hinweis, dass der Spine Apparat die Rolle eines intrazellulären Kalzium-Speichers und Regulators der Kalziumkonzentration im Spine innehat, gegeben werden.

In weiterführenden Versuchen muss nun die Auswirkung des hier angewendeten Stimulations-Protokolls auf die synaptische Plastizität gezeigt werden. An der Moosfaser-Synapse ist nach traditionaler Sicht die synaptische Plastizität präsynaptisch exprimiert und erst in den letzten Jahren konnte auch eine postsynaptische Ausprägung der Plastizität gezeigt werden. Mit den nachfolgenden Experimenten könnte diese Veränderung nun an einer individuellen Synapse gezeigt werden und auch direkt mit Kalzium und intrazellulären Speichern wie dem Spine Apparat in Verbindung gebracht werden. Haben die unterschiedlichen Kalzium-Signale zwischen Synpo-KO und WT einen verschiedenen Effekt auf die synaptische Plastizität und somit auf die Prozesse von Lernen und Gedächtnis?

5.13. Involvierte Mechanismen für die Funktion des Spine Apparates als Kalzium-Speicher

Die Freisetzung von Kalzium aus internen Speichern bzw. dem glatten ER erfolgt im Allgemeinen durch die Aktivierung von zwei größtenteils homologen Rezeptor-Typen in der ER-Membran, den Ryanodin-(Rya) und/oder Inositol-1,4,5-trisphosphat-(IP3)-Rezeptoren (siehe Review *Bardo et al., 2006*). Das Kalzium kann dann wiederum schnell über die Kalziumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums (SERCA) in den Speicher aufgenommen werden (*Berridge, 1998*).

Die Rya-Rezeptoren haben mehrere Bindungsstellen für Kalzium-Ionen und sind dadurch für das Auslösen des Prozesses des CICR verantwortlich. Die IP3-Rezeptoren dagegen werden durch IP3, welches das metabolische Produkt der Phospholipase C Aktivität ist, aktiviert und bilden damit das Bindeglied zur Stimulation metabotroper Glutamat-Rezeptoren in exzitatorischen Synapsen.

Durch immunhistochemische Untersuchungen in der Ratte wurde gezeigt (*Sharp et al., 1993*), dass IP3-Rezeptoren vor allem in den Somata und Dendriten der Purkinjezellen des Kleinhirns (auch in Spines) und CA1 Pyramidenzellen angereichert sind und nur im geringen Maß im DG und CA3-Pyramidenzellen (hier allerdings nicht in Spines). Für die Ryanodine-

Rezeptoren wurde eine gegenteilige Verteilung gefunden, d.h. in den Purkinje-Zellen und CA1-Zellen fanden die Autoren nur geringe Level und im DG und CA3 eine deutliche Anreicherung der Rezeptoren. Für beide Rezeptor-Typen wurden jeweils drei Isoformen (Rya-R1 bis -R3 und IP3-1 bis -3) gefunden, die unterschiedlich im Gehirn exprimiert werden. So werden Rya-R1 hauptsächlich im Cerebellum detektiert und IP3-2 ausschließlich in Gliazellen (siehe *Bardo et al., 2006*). So zeigten *Shimizu et al. (2008)* im Hippocampus von adulten Mäusen, dass vor allem Rya-R2 präsynaptisch in Moosfaser-Axonon und einigen Terminalen exprimiert werden, wohingegen Rya-R1 in postsynaptischen Neuronen nachgewiesen wurden.

Welche Isoform der Rya-Rezeptoren mit dem Spine Apparat assoziiert ist, konnte bis jetzt nicht gezeigt werden, da die bisher verwendeten, für die einzelnen Unterformen spezifischen Antikörper vor allem für die elektronenmikroskopische Anwendung nicht gut geeignet sind. Dass funktionsfähige Rya-Rezeptoren in den Spines der CA1- und CA3-Pyramidenzellen vorhanden sind, zeigten *Emptage et al. (1999)* in ihren Untersuchungen, die durch die spezifische Blockade der Rya-Rezeptoren mit Ryanodin eine starke Reduktion der ausgelösten Kalzium-Transienten erhielten. Auch *Vlachos et al. (2009)* fanden deutliche Hinweise für eine Beteiligung von Rya-Rezeptoren in ihren Experimenten. Die Experimente von *Holbro et al. (2009)* lassen außerdem auf eine lokale Aktivierung der IP3-Rezeptoren und (jedoch langsame und verzögerte) Kalzium-Freisetzung in Spines von CA1-Pyramidenzellen schließen und damit eine Rolle in der synaptischen Depression. In den Purkinje-Zellen werden wie bereits erwähnt, hauptsächlich auch IP3-Rezeptoren exprimiert und dort wurde in Untersuchungen zur synaptischen Plastizität ebenfalls eine Depression (LTD) festgestellt (Review dazu siehe *Bardo et al., 2006* oder *Rose und Konnerth, 2001*). In weiterführenden Experimenten könnte durch pharmakologische Manipulation der beteiligten Kalzium-Kanäle und Kalzium-Pumpen deren jeweilige Rolle bei der Funktion des Spine Apparats als Kalzium-Speicher geklärt werden.

5.14. Weitere Funktionen des Spine Apparates

In der hier durchgeführten Arbeit lag der Fokus auf der Funktion des Spine Apparates als interner Kalzium-Speicher und dessen Rolle während der synaptischen Transmission und bei Prozessen der synaptischen Plastizität.

Da allerdings der SA ein Abkömmling des glatten ERs ist, sind weitere Funktionen und Beteiligungen an intrazellulären Prozessen wie Transport und Synthese von postsynaptischen

Proteinen und Rezeptoren denkbar. Eine Auflistung solch möglicher Funktionen des SAs liefert *Spacek (1985)*. In einer weiteren Veröffentlichung aus demselben Jahr konnte *Spacek (1985)* eine direkte Verbindung des SAs, genauer des elektronendichten Materials, mit Punktdesmosomen (Punctum adhaerens) zeigen. Durch Transformation der Punktdesmosomen können aktive Zonen expandieren und der SA könnte als mögliche Quelle von spezifischen Proteinen zu diesem Prozess mit beitragen.

Hinweise, dass der SA auch an der Regulation der Glutamat-Rezeptoren und -Kanäle in der Synapse beteiligt sein könnte, liefern zwei verschiedene elektronenmikroskopischen Untersuchungen. *Racca et al. (2000)* konnten eine regelmäßig starke Markierung von NMDA-Rezeptoren im SA feststellen und *Nusser et al. (1998)* detektierten AMPA-Rezeptoren in SA. Allerdings konnten in den hier durchgeführten Untersuchungen keine Hinweise auf eine unterschiedliche Verteilung der Glutamat-Rezeptoren in der Synapse zwischen Wildtyp- und Synaptopodin-Knock-out Mäusen (ohne einen SA) gefunden werden.

Obwohl die erste Beschreibung des Spine Apparates bereits 1959 durch *Gray* erfolgte, bleibt die genaue Funktion dieser speziellen Organelle bis heute rätselhaft und wird weiterhin diskutiert werden. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Arbeit sind ein kleiner Beitrag zur Lösung dieser Frage, vor allem in Hinsicht auf die Rolle als interner Kalzium-Speicher und der Beteiligung an der Kalzium-Kinetik im Spine während verschiedener synaptischer Prozesse.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbott, L. F. & Nelson, S. B. (2000), „Synaptic plasticity: taming the beast.“, *Nat Neurosci* **3**, 1178-1183.
- Acsády, L.; Kamondi, A.; Sík, A.; Freund, T. & Buzsáki, G. (1998), „GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus.“, *J Neurosci* **18**(9), 3386-3403.
- Amaral, D. G. (1978), „A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat.“, *J Comp Neurol* **182**(4), 851-914.
- Amaral, D. G. & Witter, M. P. (1989), „The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data.“, *Neuroscience* **31**(3), 571-591.
- Amaral, D. G.; Scharfman, H. E. & Lavenex, P. (2007), „The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies).“, *Prog Brain Res* **163**, 3-22.
- Andersen, P., Bliss, T.V.P. & Skrede, K.K. (1971), „Lamellar Organization of Hippocampal Excitatory Pathways.“, *Exp. Brain Res.* **13**, 222-238.
- Araya, R., Nikolenko, V., Eisenthal, K. B. & Yuste, R. (2007), „Sodium channels amplify spine potentials.“, *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 12347-12352.
- Astori, S.; Pawlak, V. & Köhr, G. (2010), „Spike-timing-dependent plasticity in hippocampal CA3 neurons.“, *J Physiol* **588**(22), 4475-4488.
- Bardo, S.; Cavazzini, M. G. & Emptage, N. (2006), „The role of the endoplasmic reticulum Ca²⁺ store in the plasticity of central neurons.“, *Trends Pharmacol Sci* **27**(2), 78-84.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995), “Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.”, *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**(1), 289-300.

- Benjamini, Y. & Yekutieli, D. (2001), "The Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing under Dependency.", *The Annals of Statistics* **29**(4), 1165-1188.
- Berridge, M. J. (1998), „Neuronal calcium signaling.“, *Neuron* **21**(1), 13-26.
- Buckmaster, P. S.; Wenzel, H. J.; Kunkel, D. D. & Schwartzkroin, P. A. (1996), „Axon arbors and synaptic connections of hippocampal mossy cells in the rat in vivo.“, *J Comp Neurol* **366**(2), 271-292.
- Carter, A. G. & Sabatini, B. L. (2004), „State-Dependent Calcium Signaling in Dendritic Spines of Striatal Medium Spiny Neurons.“, *Neuron* **44**, 483-493.
- Chicurel, M. E. & Harris, K. M. (1992), „Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus.“, *J Comp Neurol* **325**(2), 169-182.
- Clark, K. & Normann, C. (2008), „Induction mechanisms and modulation of bidirectional burst stimulation-induced synaptic plasticity in the hippocampus.“, *Eur J Neurosci* **28**(2), 279-287.
- Clements, J. D.; Lester, R. A.; Tong, G.; Jahr, C. E. & Westbrook, G. L. (1992), „The time course of glutamate in the synaptic cleft.“, *Science* **258**(5087), 1498-1501.
- Clements, J. D. (1996), „Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function.“, *Trends Neurosci* **19**(5), 163-171.
- Conti, F. & Weinberg, R. J. (1999), „Shaping excitation at glutamatergic synapses.“, *Trends Neurosci* **22**(10), 451-458.
- Czarnecki, K.; Haas, C. A.; Orth, C. B.; Deller, T. & Frotscher, M. (2005), „Postnatal development of synaptopodin expression in the rodent hippocampus.“, *J Comp Neurol* **490**(2), 133-144.
- Deller, T.; Katona, I.; Cozzari, C.; Frotscher, M. & Freund, T. F. (1999), „Cholinergic innervation of mossy cells in the rat fascia dentata.“, *Hippocampus* **9**(3), 314-320.

- Deller, T.; Merten, T.; Roth, S. U.; Mundel, P. & Frotscher, M. (2000), „Actin-associated protein synaptopodin in the rat hippocampal formation: localization in the spine neck and close association with the spine apparatus of principal neurons.“, *J Comp Neurol* **418**(2), 164-181.
- Deller, T.; Korte, M.; Chabanis, S.; Drakew, A.; Schwegler, H.; Stefani, G. G.; Zuniga, A.; Schwarz, K.; Bonhoeffer, T.; Zeller, R.; Frotscher, M. & Mundel, P. (2003), „Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity.“, *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(18), 10494-10499.
- Deller, T.; Orth, C. B.; Turco, D. D.; Vlachos, A.; Burbach, G. J.; Drakew, A.; Chabanis, S.; Korte, M.; Schwegler, H.; Haas, C. A. & Frotscher, M. (2007), „A role for synaptopodin and the spine apparatus in hippocampal synaptic plasticity.“, *Ann Anat* **189**(1), 5-16.
- Denk, W.; Strickler, J. H. & Webb, W. W. (1990), „Two-photon laser scanning fluorescence microscopy.“, *Science* **248**(4951), 73-76.
- Denk, W.; Delaney, K. R.; Gelperin, A.; Kleinfeld, D.; Strowbridge, B. W.; Tank, D. W. & Yuste, R. (1994), „Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy.“, *J Neurosci Methods* **54**(2), 151-162.
- Dieni, S.; Matsumoto, T.; Dekkers, M.; Rauskolb, S.; Ionescu, M. S.; Deogracias, R.; Gundelfinger, E. D.; Kojima, M.; Nestel, S.; Frotscher, M. & Barde, Y.-A. (2012), „BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons.“, *J Cell Biol* **196**(6), 775-788.
- Dodt, H. U. & Ziegglänsberger, W. (1994), „Infrared videomicroscopy: a new look at neuronal structure and function.“, *Trends Neurosci* **17**(11), 453-458.
- Ellis-Davies, G. C. R.; Matsuzaki, M.; Paukert, M.; Kasai, H. & Bergles, D. E. (2007), „4-Carboxymethoxy-5,7-dinitroindoliny-Glu: an improved caged glutamate for expeditious ultraviolet and two-photon photolysis in brain slices.“, *J Neurosci* **27**(25), 6601-6604.
- Ellis-Davies, G. C. R. (2007), „Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology.“, *Nat Methods* **4**(8), 619-628.

- Ellis-Davies, G. C. R. (2011), „A practical guide to the synthesis of dinitroindolyl-caged neurotransmitters.“, *Nat Protoc* **6**(3), 314-326.
- Ellis-Davies, G. C. R. (2011), „Two-photon microscopy for chemical neuroscience.“, *ACS Chem Neurosci* **2**(4), 185-197.
- Emptage, N.; Bliss, T. V. & Fine, A. (1999), „Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines.“, *Neuron* **22**(1), 115-124.
- Fino, E.; Araya, R.; Peterka, D. S.; Salierno, M.; Etchenique, R. & Yuste, R. (2009), „RuBi-Glutamate: Two-Photon and Visible-Light Photoactivation of Neurons and Dendritic spines.“, *Front Neural Circuits* **3**(2), 1-9.
- Freund, T. & Buzsáki, G. (1996), „Interneurons of the Hippocampus.“, *Hippocampus* **6**, 347-470.
- Frotscher, M.; Seress, L.; Schwerdtfeger, W. K. & Buhl, E. (1991), „The mossy cells of the fascia dentata: a comparative study of their fine structure and synaptic connections in rodents and primates.“, *J Comp Neurol* **312**(1), 145-163.
- Fukazawa, Y.; Saitoh, Y.; Ozawa, F.; Ohta, Y.; Mizuno, K. & Inokuchi, K. (2003), „Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo.“, *Neuron* **38**(3), 447-460.
- Gray, E. G. (1959), „Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study.“, *J Anat* **93**, 420-433.
- Hamlyn, L. H. (1962), „The fine structure of the mossy fibre endings in the hippocampus of the rabbit.“, *J Anat* **96**, 112-120.
- Harris, K. M.; Jensen, F. E. & Tsao, B. (1992), „Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation.“, *J Neurosci* **12**(7), 2685-2705.

- Helmchen, F. & Denk, W. (2005), „Deep tissue two-photon microscopy.“, *Nat Methods* **2**(12), 932-940.
- Henze, D. A.; Urban, N. N. & Barrionuevo, G. (2000), „The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review.“, *Neuroscience* **98**(3), 407-427.
- Henze, D. A. & Buzsáki, G. (2007), „Hilar mossy cells: functional identification and activity in vivo.“, *Prog Brain Res* **163**, 199-216.
- Higley, M. J. & Sabatini, B. L. (2012), „Calcium signaling in dendritic spines.“, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(4), 1-18.
- Holbro, N.; Grunditz, A. & Oertner, T. G. (2009), „Differential distribution of endoplasmic reticulum controls metabotropic signaling and plasticity at hippocampal synapses.“, *Proc Natl Acad Sci USA* **106**(35), 15055-15060.
- Isaac, J. T. R.; Ashby, M. C. & McBain, C. J. (2007), „The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity.“, *Neuron* **54**(6), 859-871.
- Jedlicka, P.; Vlachos, A.; Schwarzacher, S. W. & Deller, T. (2008), „A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning.“, *Behav Brain Res* **192**(1), 12-19.
- Jonas, P.; Major, G. & Sakmann, B. (1993), „Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus.“, *J Physiol* **472**, 615-663.
- Jonas, P. & Spruston, N. (1994), „Mechanisms shaping glutamate-mediated excitatory postsynaptic currents in the CNS.“, *Curr Opin Neurobiol* **4**(3), 366-372.
- Judkewitz, B.; Roth, A. & Häusser, M. (2006), „Dendritic enlightenment: using patterned two-photon uncaging to reveal the secrets of the brain's smallest dendrites.“, *Neuron* **50**(2), 180-183.

- Kampa, B. M.; Clements, J.; Jonas, P. & Stuart, G. J. (2004), „Kinetics of Mg²⁺ unblock of NMDA receptors: implications for spike-timing dependent synaptic plasticity.“, *J Physiol* **556**(Pt 2), 337-345.
- Kerr, A. M. & Jonas, P. (2008), „The two sides of hippocampal mossy fiber plasticity.“, *Neuron* **57**(1), 5-7.
- Kobayashi, K. (2010), „Hippocampal mossy fiber synaptic transmission and its modulation.“, *Vitam Horm* **82**, 65-85.
- Koester, H. J. & Sakmann, B. (1998), „Calcium dynamics in single spines during coincident pre- and postsynaptic activity depend on relative timing of back-propagating action potentials and subthreshold excitatory postsynaptic potentials.“, *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(16), 9596-9601.
- Kovalchuk, Y.; Eilers, J.; Lisman, J. & Konnerth, A. (2000), „NMDA receptor-mediated subthreshold Ca²⁺ signals in spines of hippocampal neurons.“, *J Neurosci* **20**(5), 1791-1799.
- Kwon, H.-B. & Castillo, P. E. (2008), „Long-term potentiation selectively expressed by NMDA receptors at hippocampal mossy fiber synapses.“, *Neuron* **57**(1), 108-120.
- Lee, K.F.H.; Soares, C. & Béïque, J.-C. (2012), „Examining form and function of dendritic spines.“, *Neural Plast* **2012**, 1-9.
- Livsey, C.T.; Costa, E. & Vicini, S. (1993), „Glutamate-activated currents in outside-out patches from spiny versus aspiny hilar neurons of rat hippocampal slices.“, *J Neurosci* **13**(12), 5324-5333.
- Livsey, C.T. & Vicini, S. (1992), „Slower spontaneous excitatory postsynaptic currents in spiny versus aspiny hilar neurons.“, *Neuron* **8**(4), 745-755.
- Lysetskiy, M., Földy, C. & Soltesz, I. (2005), „Long- and Short-Term Plasticity at Mossy Fiber Synapses on Mossy Cells in the Rat Dentate Gyrus“, *Hippocampus* **15**, 691-696.

- Markram, H.; Lübke, J.; Frotscher, M. & Sakmann, B. (1997), „Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs.“, *Science* **275**(5297), 213-215.
- Matsuzaki, M.; Ellis-Davies, G. C.; Nemoto, T.; Miyashita, Y.; Iino, M. & Kasai, H. (2001), „Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons.“, *Nat Neurosci* **4**(11), 1086-1092.
- Min, M. Y.; Rusakov, D. A. & Kullmann, D. M. (1998), „Activation of AMPA, kainate, and metabotropic receptors at hippocampal mossy fiber synapses: role of glutamate diffusion.“, *Neuron* **21**(3), 561-570.
- Mori, M.; Abegg, M. H.; Gähwiler, B. H. & Gerber, U. (2004), „A frequency-dependent switch from inhibition to excitation in a hippocampal unitary circuit.“, *Nature* **431**(7007), 453-456.
- Muller, D.; Nikonenko, I.; Jourdain, P. & Alberi, S. (2002), „LTP, memory and structural plasticity.“, *Curr Mol Med* **2**(7), 605-611.
- Mundel, P.; Heid, H. W.; Mundel, T. M.; Krüger, M.; Reiser, J. & Kriz, W. (1997), „Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes.“, *J Cell Biol* **139**(1), 193-204.
- Neuhäuser, M. & Ruxton, G. D. (2009), „Distribution-free two-sample comparisons in the case of heterogeneous variances.“, *Behav Ecol Sociobiol* **63**, 617-623.
- Nevian, T. & Sakmann, B. (2006), „Spine Ca²⁺ signaling in spike-timing-dependent plasticity.“, *J Neurosci* **26**(43), 11001-11013.
- Nicoll, R. A. & Schmitz, D. (2005), „Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses.“, *Nat Rev Neurosci* **6**(11), 863-876.
- Noguchi, J.; Matsuzaki, M.; Ellis-Davies, G. C. R. & Kasai, H. (2005), „Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca²⁺ signaling in dendrites.“, *Neuron* **46**(4), 609-622.

- Nusser, Z.; Lujan, R.; Laube, G.; Roberts, J. D.; Molnar, E. & Somogyi, P. (1998), „Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus.“, *Neuron* **21**(3), 545-559.
- Orth, C. B.; Vlachos, A.; Turco, D. D.; Burbach, G. J.; Haas, C. A.; Mundel, P.; Feng, G.; Frotscher, M. & Deller, T. (2005), „Lamina-specific distribution of Synaptopodin, an actin-associated molecule essential for the spine apparatus, in identified principal cell dendrites of the mouse hippocampus.“, *J Comp Neurol* **487**(3), 227-239.
- Papez, J. W. (1995), „A proposed mechanism of emotion. 1937.“, *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **7**(1), 103-112.
- Racca, C.; Stephenson, F. A.; Streit, P.; Roberts, J. D. & Somogyi, P. (2000), „NMDA receptor content of synapses in stratum radiatum of the hippocampal CA1 area.“, *J Neurosci* **20**(7), 2512-2522.
- Rebola, N.; Carta, M.; Lanore, F.; Blanchet, C. & Mulle, C. (2011), „NMDA receptor-dependent metaplasticity at hippocampal mossy fiber synapses.“, *Nat Neurosci* **14**(6), 691-693.
- Rebola, N.; Lujan, R.; Cunha, R. A. & Mulle, C. (2008), „Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses.“, *Neuron* **57**(1), 121-134.
- Reid, C. A.; Fabian-Fine, R. & Fine, A. (2001), „Postsynaptic calcium transients evoked by activation of individual hippocampal mossy fiber synapses.“, *J Neurosci* **21**(7), 2206-2214.
- Ribak, C. E.; Seress, L. & Amaral, D. G. (1985), „The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus.“, *J Neurocytol* **14**(5), 835-857.
- Rollenhagen, A.; Sätzler, K.; Rodríguez, E. P.; Jonas, P.; Frotscher, M. & Lübke, J. H. R. (2007), „Structural determinants of transmission at large hippocampal mossy fiber synapses.“, *J Neurosci* **27**(39), 10434-10444.

- Rose, C. R. & Konnerth, A. (2001), „Stores not just for storage. Intracellular calcium release and synaptic plasticity.“, *Neuron* **31**(4), 519-522.
- Sabatini, B. L.; Maravall, M. & Svoboda, K. (2001), „Ca(2+) signaling in dendritic spines.“, *Curr Opin Neurobiol* **11**(3), 349-356.
- Sako, Y.; Sekihata, A.; Yanagisawa, Y.; Yamamoto, M.; Shimada, Y.; Ozaki, K. & Kusumi, A. (1997), „Comparison of two-photon excitation laser scanning microscopy with UV-confocal laser scanning microscopy in three-dimensional calcium imaging using the fluorescence indicator Indo-1.“, *J Microsc* **185**(1), 9-20.
- Scharfman, H. E. & Schwartzkroin, P. A. (1988), „Electrophysiology of morphologically identified mossy cells of the dentate hilus recorded in guinea pig hippocampal slices.“, *J Neurosci* **8**(10), 3812-3821.
- Scharfman, H. E. (1992), „Blockade of excitation reveals inhibition of dentate spiny hilar neurons recorded in rat hippocampal slices.“, *J Neurophysiol* **68**(3), 978-984.
- Scharfman, H. E. (1993), „Characteristics of spontaneous and evoked EPSPs recorded from dentate spiny hilar cells in rat hippocampal slices.“, *J Neurophysiol* **70**(2), 742-757.
- Scharfman, H. E. (2007), „The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus.“, *Prog Brain Res* **163**, 627-637.
- Scharfman, H. & Myers, C. (2013), „Hilar Mossy Cells: A Historical Perspective.“, *Frontiers in Neural Circuits* **6**, 106.
- Scheipl, F. & Kneib, T. (2009), „Locally adaptive Bayesian P-splines with a Normal-Exponential-Gamma prior.“, *Computational Statistics & Data Analysis* **53**(10), 3533-3552.
- Segal, M. (2005), „Dendritic spines and long-term plasticity.“, *Nat Rev Neurosci* **6**(4), 277-284.
- Segal, M.; Vlachos, A. & Korkotian, E. (2010), „The spine apparatus, synaptopodin, and dendritic spine plasticity.“, *Neuroscientist* **16**(2), 125-131.

- Sharp, A. H.; McPherson, P. S.; Dawson, T. M.; Aoki, C.; Campbell, K. P. & Snyder, S. H. (1993), „Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channels in rat brain.“, *J Neurosci* **13**(7), 3051-3063.
- Shimizu, H.; Fukaya, M.; Yamasaki, M.; Watanabe, M.; Manabe, T. & Kamiya, H. (2008), „Use-dependent amplification of presynaptic Ca²⁺ signaling by axonal ryanodine receptors at the hippocampal mossy fiber synapse.“, *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(33), 11998-12003.
- Sloviter, R. S. & Lømo, T. (2012), „Updating the lamellar hypothesis of hippocampal organization.“, *Front Neural Circuits* **6**(102), 11-6.
- Sobczyk, A.; Scheuss, V. & Svoboda, K. (2005), „NMDA receptor subunit-dependent [Ca²⁺] signaling in individual hippocampal dendritic spines.“, *J Neurosci* **25**(26), 6037-6046.
- Soltész, I. & Mody, I. (1994), „Patch-clamp recordings reveal powerful GABAergic inhibition in dentate hilar neurons.“, *J Neurosci* **14**(4), 2365-2376.
- Spacek, J. (1985), „Three-dimensional analysis of dendritic spines. II. Spine apparatus and other cytoplasmic components.“, *Anat Embryol (Berl)* **171**(2), 235-243.
- Spacek, J. (1985), „Relationships between synaptic junctions, puncta adhaerentia and the spine apparatus at neocortical axo-spinous synapses. A serial section study.“, *Anat Embryol (Berl)* **173**(1), 129-135.
- Spacek, J. & Harris, K. M. (1997), „Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat.“, *J Neurosci* **17**(1), 190-203.
- Stoppini, L.; Buchs, P. A. & Müller, D. (1991), „A simple method for organotypic cultures of nervous tissue.“, *J Neurosci Methods* **37**(2), 173-182.
- van Strien, N. M.; Cappaert, N. L. M. & Witter, M. P. (2009), „The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network.“, *Nat Rev Neurosci* **10**(4), 272-282.

- Svoboda, K. & Mainen, Z. F. (1999), „Synaptic [Ca²⁺]: intracellular stores spill their guts.“, *Neuron* **22**(3), 427-430.
- Svoboda, K. & Yasuda, R. (2006), „Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience.“, *Neuron* **50**(6), 823-839.
- Tarrant, S. B. & Routtenberg, A. (1979), „Postsynaptic membrane and spine apparatus: proximity in dendritic spines.“, *Neurosci Lett* **11**(3), 289-294.
- Traynelis, S. F.; Wollmuth, L. P.; McBain, C. J.; Menniti, F. S.; Vance, K. M.; Ogden, K. K.; Hansen, K. B.; Yuan, H.; Myers, S. J. & Dingledine, R. (2010), „Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function.“, *Pharmacol Rev* **62**(3), 405-496.
- Treves, A. & Rolls, E. T. (1994), „Computational Analysis of the Role of the Hippocampus in Memory“, *Hippocampus* **4**(3), 374-391.
- Urban, N. N.; Henze, D. A. & Barrionuevo, G. (2001), „Revisiting the role of the hippocampal mossy fiber synapse.“, *Hippocampus* **11**(4), 408-417.
- Vlachos, A.; Korkotian, E.; Schonfeld, E.; Copanaki, E.; Deller, T. & Segal, M. (2009), „Synaptopodin regulates plasticity of dendritic spines in hippocampal neurons.“, *J Neurosci* **29**(4), 1017-1033.
- Wenzel, H. J.; Buckmaster, P. S.; Anderson, N. L.; Wenzel, M. E. & Schwartzkroin, P. A. (1997), „Ultrastructural localization of neurotransmitter immunoreactivity in mossy cell axons and their synaptic targets in the rat dentate gyrus.“, *Hippocampus* **7**(5), 559-570.
- West, J. R.; Nornes, H. O.; Barnes, C. L. & Bronfenbrenner, M. (1979), „The cells of origin of the commissural afferents to the area dentata in the mouse.“, *Brain Res* **160**(2), 203-215.
- Woodruff, M. L.; Sampath, A. P.; Matthews, H. R.; Krasnoperova, N. V.; Lem, J. & Fain, G. L. (2002), „Measurement of cytoplasmic calcium concentration in the rods of wild-type and transducin knock-out mice.“, *J Physiol* **542**(3), 843-854.

- Yamazaki, M.; Matsuo, R.; Fukazawa, Y.; Ozawa, F. & Inokuchi, K. (2001), „Regulated expression of an actin-associated protein, synaptopodin, during long-term potentiation.“, *J Neurochem* **79**(1), 192-199.
- Yasuda, R.; Nimchinsky, E. A.; Scheuss, V.; Pologruto, T. A.; Oertner, T. G.; Sabatini, B. L. & Svoboda, K. (2004), „Imaging calcium concentration dynamics in small neuronal compartments.“, *Sci STKE* **2004**(219), 1-20.
- Zipfel, W. R.; Williams, R. M. & Webb, W. W. (2003), „Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences.“, *Nat Biotechnol* **21**(11), 1369-1377.
- Zucker, R. S. & Regehr, W. G. (2002), „Short-term synaptic plasticity.“, *Annu Rev Physiol* **64**, 355-405.

Weitere Quellen:

- Per Andersen, Richard Morris, David Amaral, Tim Bliss and John O'Keefe *“The Hippocampus Book”*; 2007; published by Oxford University Press, Inc.
- Bernd Ramm und Gerd Hofmann *“Biomathematik”*, 3.Auflage 1987, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart
- Vorlesungs- von Prof. Dr. Manfred Sernetz und Mitarbeiter, Manuskript für die Vorlesung am Fachbereich Biomedizintechnik der FH Gießen mit dem Titel *„Pharmakokinetik und Wachstumskinetik“*, Ausgabe 2000
- Roman Pichler, Doktorarbeit: *„Elektronenmikroskopische immunozytochemische Analyse von Glutamatrezeptoren in Synaptopodin-Knockout-Mäusen“*, 2011

7. ANHANG

7.1. Bezugsquellen Material

7.1.1. Gewebekultur

7.1.1.1. Chemikalien

Aqua ad injectabilia	B. Braun AG, Melsungen
Basal Medium Eagle (BME), 1x, liquid	GIBCO, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Glucose 20% Braun Mini-Plasco	B. Braun AG, Melsungen
GlutaMax™-I Supplement, 200 mM	GIBCO, Life Technologies GmbH, Darmstadt
2-Propanol (Isopropanol), wasserfrei, 99.5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Minimum Essential Medium (MEM), 10x	GIBCO, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Natronlauge 1 mol/l (1 N) TitriPUR® volumetrische Lösung	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt
Normal Horse Serum (NHS), Heat-Inactivated	GIBCO, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Salzsäure 1 mol/l (1 N) TitriPUR® volumetrische Lösung	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt

7.1.1.2. Verbrauchsmaterial

Einmalkanüle gelb, 20G x 1½, 0,9 mm x 40 mm	Neopoint, WISMA GmbH Freiburg
Einmalspritzen, 10 ml, 3teilig, mit Lueransatz	mediware, WISMA GmbH Freiburg

Falcon™ Multiwell-Zellkulturplatten, 6-well, steril	BD Biosciences, Omniolab, Bremen
Falcon™ Serologische Pipetten	BD Biosciences, Omniolab, Bremen
Gillette Super Silver, Platinveredelt	Procter & Gamble Germany GmbH & Co., Schwalbach/Ts.
Kulturmembranen Millicell-CM Low Height Culture Plate Inserts	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.
Laborflaschen, Klarglas, Duran, graduiert	VWR International GmbH, Darmstadt
Pasteur-Pipetten, Glas, mit Wattestopfen 2 ml, Länge 150 mm	VWR International GmbH, Darmstadt
Petrischalen mit Nocken 35 mm x 10 mm, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard	Eppendorf, VWR International GmbH, Darmstadt
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Rotilab®-Spritzenfilter, steril, Ø 25 mm, CA-Membran, Poren-Ø 0,2 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Skalpelli-Klingen, steril, Figur 11 und 15	Aesculap, B. Braun AG, Melsungen

7.1.1.3. Geräte

Gewebeschneider, Mcllwain Tissue-Chopper	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Kaltlichtquelle KL 1500 electronic	Schott Instruments, Mainz
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Pipettierhilfe PIPETUS®-Standard	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten-Satz, Eppendorf Reference	Abimed, Langenfelden
Präparationsbesteck (Pinzetten, Scheren, Spatel, Skalpellhalter)	Aesculap, B. Braun AG, Melsungen
Sicherheitsbrenner GASI	Schütt-biotec GmbH, Göttingen
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Carl Zeiss AG, Göttingen

Sterilarbeitsbank Heraeus Lamin Air HP 72	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
Thermo Heraeus BBD 6220 CO ₂ -Inkubator	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe

7.1.2. Patch-Clamp Experimente

7.1.2.1. Chemikalien

Adenosin-5'-triphosphat-Magnesiumsalz $\geq 95\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D-(-)-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (D-AP5 bzw. APV)	ascent scientific, Bristol UK
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ * 2H ₂ O)	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt
6-Cyano-7-Nitrochinoxalin-2,3-dion (CNQX)	ascent scientific, Bristol UK
Dextran, Alexa Fluor® 488; 10,000 MW, anionic, fixable	Molecular Probes, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dextran, Alexa Fluor® 594; 10,000 MW, anionic, fixable	Molecular Probes, Life Technologies GmbH, Darmstadt
D-Gluconsäure Kaliumsalz (C ₆ H ₁₁ KO ₇)	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt
D(+)-Glucose Monohydrat	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt
Fluo-5F, pentapotassium salt *cell impermeant*	Molecular Probes, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Guanosin-5'-Triphosphat-Natriumsalz-Hydrat $\geq 95\%$ (HPLC), Pulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S) $\geq 99,5\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kalilauge 1 mol/l (1 N) TitriPUR® volumetrische Lösung	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ * 6H ₂ O)	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt
4-Methoxy-7-nitroindolinyI-(MNI)-caged-glutamate	TOCRIS, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Natriumchlorid (NaCl)	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt
Phosphokreatin Dinatriumsalz- Hydrat $\geq 97\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D(+)-Saccharose	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt

7.1.2.2. Verbrauchsmaterial

Borosilikat-Glaskapillaren, Enden abgeflammt, Länge 75 mm, \varnothing -Innen 1,0 mm, \varnothing -Außen 2,0 mm	hilgenberg GmbH, Malsfeld
Combi-Stopper rot, steril einzeln verpackt	B. Braun AG, Melsungen
Einmalspritzen, 2 ml, Injekt	B. Braun AG, Melsungen
Pipettenspitzen, Microloader 0,5 – 20 μl	Eppendorf, VWR International GmbH, Darmstadt
Pumpenschläuche, Tygon® R 3607, \varnothing -Innen 0,38 mm x 0,90 mm, mit Stoppfern orange/grün	Verneret, VWR International GmbH, Darmstadt
Rotilabo®-FEP-Schläuche	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotilabo®-Schlauchverbinder (Luer/Lock)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotilabo®-Spritzenfilter, steril, \varnothing 25 mm, CA- Membran, Poren- \varnothing 0,2 μm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Safe-Lock Reaktionsgefäße 0,5 ml, PCR-clean	Eppendorf, VWR International GmbH, Darmstadt
Ultrafree-MC Centrifugal Filter Units with Microporous Membrane, GV 0.22 μm	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.

7.1.2.3. Geräte

3-Axis Motion Controller/Driver ESP 300	Newport Spectra-Physics GmbH, Darmstadt (Irvine CA USA)
---	--

CCD-Kamera (SensiCam)	PCO AG, Kelheim
Computersteckkarte NI PCI-6251, Hoch- Geschwindigkeits-M-Serie für Multifunktions-Datenerfassung	National Instruments Germany GmbH, München
Computersteckkarte NI PCI-6132, Hoch- Geschwindigkeits-S-Serie für Simultane Datenerfassung	National Instruments Germany GmbH, München
DC Power Supply E30-1B 30V	Farnell Instrument Inc., Oberhaching
Dichromatische Spiegel (680 DCXXR, 560 DCXR)	AHF analysentechnik AG, Tübingen
Digitale Peristaltische Pumpe Rainin RP-1	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Digital-Vakuum-/Barometer GDH 12 AN	Greisinger electronic GmbH, Regenstauf
Diode-Pumped Laser with 5 W Verdi V5	Coherent Inc., Santa Clara CA USA
Diode-Pumped Laser with 10 W Verdi V10	Coherent Inc., Santa Clara CA USA
ELV-Power-Supply PS 9031 M	ELV Elektronik AG, Leer
Electro-Optic-Modulation System Model 302 RM	Conoptics Inc., Danburg CT USA
Filter, Glas (BG39)	Schott AG, Mainz
Filter, diverse (HQ 510/80, HQ 610/75, HC-2P Emitter 680/SP)	AHF analysentechnik AG, Tübingen
FluoView FV 300 confocal Scanner	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
GigaJet 20c femtosecond oscillator	Gigaoptics femtosecond technologies, Konstanz
Haake C10-Thermostat Typ 003-2702	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
HP-Aglient 54603B Oscilloscope	Agilent Technologie Deutschland GmbH, Böblingen
Laboratory Power Supply EA-PS 2016-100	EA-Elektro-Automatik GmbH, Viersen
LabView- graphische Programmierungsumgebung	National Instruments Germany GmbH, München
Makro-Zoom-Fluoreszenzmikroskop MVX 10 Macro View	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Micromanipulator for life science MM3A-LS	Kleindiek Nanotechnik GmbH, Reutlingen
Micropipette Puller P-97	Sutter Instrument Co., Novato CA USA

Mikroskopsystem BX50 WI	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Mikrozentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
MIRA Optima 900 F	Coherent Inc., Santa Clara CA USA
Neslab Chiller Refrigerated RTE 111	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
Ölimmersions-Kondensator (BX-UCDB-2)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Osmometer OM 802 Vogel	Vogel Medizinische Technik und Elektronik, Gießen
Photomultiplier Tube (PMT) Type R3896	Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching
Precision Handheld Reference Thermometers P600 Series	Dostmann electronic GmbH, Wertheim-Reicholzheim
Pressure Systems Typ Ionophor Nr. 95-1031	Science Products GmbH, Hofheim
Schwingungsgedämpfter Tisch	Newport Spectra-Physics GmbH, Darmstadt
Shutter Uniblitz LS2 ZM2 und VCM-D1 Single Channel CE/UL/CSA Shutter Driver	Uniblitz Vincent Associates, Rochester NY USA, BFi optilas GmbH, Puchheim
Software FluoView (V. 4.2, Olympus)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
System-Mikroskop CH 30	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Two Channel Digital Storage Oscilloscope TDS 1012	Tektronix Inc., Beaverton OR USA
Universal Amplifier ELC-03XS	npi electronic GmbH, Tamm
Wasserimmersions-Objektiv (100x, NA 1.0, LUMPFL)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg

7.1.3. Färbungen

7.1.3.1. Chemikalien

Agar, Pulver für Mikrobiologie	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit IgG (H+L) *2 mg/mL*	Molecular Probes, Life Technologies GmbH, Darmstadt

Anti-Synaptopodin (SE-19) antibody produced in rabbit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
4',6-Diamidino-2phenylindol dihydrochlorid (DAPI)	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt
Durcupan™ AcM Fluka	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol (EtOH), unvergäht	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fluorescence Mounting Medium	DakoCytomation GMBH, Hamburg
1,4 nm Gold-konjugiert Goat-anti-Rabbit	Nanoprobes, Bio Trend Chemikalien GmbH, Köln
Glutaraldehyd 25% in Wasser für Elektronenmikroskopie, hochrein	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glycerin Rotipuran®, 99,5 %, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Histoacryl Gewebekleber	B. Braun AG, Melsungen
HQ Silver™ Enhancement Kit	Nanoprobes, Bio Trend Chemikalien GmbH, Köln
Natriumazid (NaN ₃)	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O)	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei (Na ₂ HPO ₄)	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt
Normal Goat Serum (NGS)	Vector Laboratories, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Osmiumtetroxidlösung (OsO ₄) 4% für Elektronenmikroskopie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Paraformaldehyd reinst ((CH ₂ O) _n) (±)-Propylene oxide, puriss, 99,5%	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton® X-100	MERCK, VWR International GmbH, Darmstadt
Uranyl Acetate 98%, ACS Reagent	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim

7.1.3.2. Verbrauchsmaterial

Deckglas, 24 mm x 50 mm, Stärke/ Nr. 1	VWR International GmbH, Darmstadt
--	-----------------------------------

Falcon™ Multiwell-Zellkulturplatten, 24-well	BD Biosciences, Omniolab, Bremen
Objektträger geschnitten mit Mattrand, 76 mm x 26 mm x 1 mm	VWR International GmbH, Darmstadt

7.1.3.3. Geräte

Analysenwaage Sartorius BP 210 S	Precision Weighing Balances, Bradford MA USA
Plattformschüttler taumelnd Polymax 2040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG Schwabach
LSM 510 confocal microscope with Plan- Neofluar objective 40x, NA 1.3	Carl Zeiss AG, Göttingen
Vibratome Series 1000	Vibratome, St. Louis MO USA

7.2. Medien und diverse Lösungen

Präparations-Medium (100 ml):

50 ml Basalmedium (Minimum Essential Medium, MEM, zweifach konzentriert,
steril filtriert)

49 ml Aqua ad injectabilia

1 ml GlutaMax™-I Supplement, 200 mM

Das Präparations-Medium wurde unter sterilen Bedingungen angesetzt und der pH-Wert von $7,34 \pm 0,02$ mit steriler 1 M Natronlauge oder Salzsäure direkt vor dem Gebrauch eingestellt. Das Medium konnte für circa vier Wochen im Kühlschrank bei 4° C gelagert werden.

Inkubations-Medium (100 ml):

25 ml Basalmedium (Minimum Essential Medium, MEM, zweifach
konzentriert, steril filtriert)

21 ml Aqua ad injectabilia

25 ml Basalmedium (Basal Medium Eagle, BME)

25 ml Normales Pferdeserum (Normal Horse Serum, NHS)

3,125 ml Glucose 20% Braun Mini-Plasco

1 ml GlutaMax™-I Supplement, 200 mM

Das Inkubations-Medium wurde unter sterilen Bedingungen angesetzt und ein pH-Wert zwischen 7,20 und 7,30 mit steriler 1 M Natronlauge oder Salzsäure direkt vor dem Gebrauch eingestellt. Das Medium konnte für circa zwei Wochen im Kühlschrank bei 4° C gelagert werden.

Natriumphosphatpuffer (PB):

Lösung I 28,40 g di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei
 1000 ml Aqua bidest

Lösung II 8,28 g Natriumhydrogenphosphat Monohydrat
 300 ml Aqua bidest

Es wurden die Substanzen in den jeweils angegebenen Massen in Aqua bidest (frisches Millipore-gefiltertes Wasser) gelöst. Die Lösung I wurde anschließend mit der Lösung II auf einen pH von rund 7,30 eingestellt und hatte eine Endkonzentration von 0,2 M und diente als Vorrats-Lösung für weitere Verdünnungen. Lagerung erfolgte bei 4° C im Kühlschrank.

0,1 M PB 500 ml 0,2 M PB
 500 ml Aqua bidest

Paraformaldehyd 4 % (100 ml):

4 g Paraformaldehyd
50 ml Aqua bidest
50 ml PB 0,2 M, pH 7,3

Das abgewogene PFA-Pulver wurde mit dem Aqua bidest (frisches Millipore-gefiltertes Wasser) auf 65° bis 70° C erhitzt und mit 1 M NaOH (ca. 700 µl) geklärt. Nach dem Abkühlen und Filtrieren wurde wieder auf 50 ml mit Aqua bidest aufgefüllt, um eventuelles Verdunsten auszugleichen. Nach Zugabe von 50 ml PB (0,2 M Vorrats-Lösung) wurde eine Endkonzentration von 4 % PFA in 0,1 M PB erreicht. Der richtige Bereich des pH-Wertes wurde mittels pH-Indikatorstreifen kontrolliert.

Fixativ für EM-Immunzytochemie (100 ml):

- 4 g Paraformaldehyd (4 %)
- 15 ml Pikrinsäure (15 %)
- 0,4 ml Glutaraldehyd 25 % in Wasser (0,1 %)
- 35 ml Aqua bidest
- 50 ml PB 0,2 M, pH 7,3

Die PFA-Lösung (PFA in 50 ml Aqua bidest) wurde wie bereits beschrieben hergestellt. Anschließend wurden die filtrierte Pikrinsäure (gesättigte Lösung) und das 0,2 M PB dazugegeben. Erst kurz vor Gebrauch des Fixativs erfolgte die Zugabe der Glutaraldehyd-Lösung.

Künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF):

- 120 mM Natriumchlorid (NaCl)
- 2,5 mM Kaliumchlorid (KCl)
- 1,25 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)
- 1,0 mM Magnesiumchlorid (MgCl_2)
- 2,0 mM Calciumchlorid (CaCl_2)
- 10 mM Glukose
- 25 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3).

Die Zusammensetzung des hier verwendeten ACSFs wurde so modifiziert, dass nach dem Lösen des MNI-Glutamats in einer Konzentration von 20 mM immer noch eine für die Schnittkulturen optimale Osmolarität vorherrschte. Die Substanzen wurden in Aqua bidest (frisches Millipore-gefiltertes Wasser) gelöst und die Lösung musste zur pH-Einstellung mit Carbogen (5 % CO_2 und 95 % O_2) begast werden.

Intrazelluläre Lösung:

133 mM D-Gluconsäure-Kaliumsalz
12 mM Kaliumchlorid (KCl)
10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)
7 mM Natrium-2-Phosphocreatin
0,3 mM Guanosin-5-triphosphat-Natriumsalz
9 mM Saccharose
4 mM Adenosin-5-triphosphat-Magnesiumsalz

Die Substanzen wurden eingewogen und mit kaltem Aqua ad injectabilia unter Rühren auf Eis gelöst. Der pH-Wert von 7,25 bis 7,30 wurde mit steriler 1 M Kalilauge (KOH) eingestellt und die Lösung anschließend auf 2 ml Einmalspritzen aufgezogen und portionsweise bei -20° C eingefroren und gelagert. Vor dem Gebrauch wurde die intrazelluläre Lösung nach dem Auftauen mit einem Spritzenfilter filtriert und über den Tag auf Eis gelagert.

Patch-Clamp-Farbstoff-Ansatz:

5 mg Dextran, Alexa Fluor® 594
1 mg Fluo-5F, pentapotassium salt (2 x 500 µg)
intrazelluläre Lösung

Der grüne Kalzium-Farbstoff Fluo-5F wurde mit einer Konzentration von 2 mM mit intrazellulärer Lösung gelöst. Mit dieser Lösung wiederum wurde der rote Fluoreszenz-Farbstoff Alexa 594 Dextran in einer Konzentration von 1 mM gelöst. Aus diesem Ansatz konnten nun Vorrats-Portionen von 5 µl hergestellt und bei -20° C gelagert werden. Für jeden Experiment-Tag wurde schließlich eine solche Dosis mit 45 µl frischer intrazellulärer Lösung auf eine Endkonzentration von 100 µM Alexa 594 Dextran und 200 µM Fluo-5F verdünnt. Es erfolgte noch ein Filtrations-Schritt (mit Ultrafree-MC Centrifugal Filter Units) und die anschließende Lagerung über den Tag hinweg auf Eis.

7.3. Messwert-Tabellen

7.3.1. Messwerte für die induzierten Einzel-Signale im Voltage-Clamp (VC)

Experi- mente	Laser- leistung [mW]	maximale Amplitude der uEPSCs [pA]								20% - 80% Anstiegsraten der uEPSCs [nA/s]											
		WT				KO				p-Wert		WT				KO				p-Wert	
		Ampli- tude	SD	SEM	N	Ampli- tude	SD	SEM	N			Rate	SD	SEM	N	Rate	SD	SEM	N		
MNI	10,00	-25,971	30,544	3,551	74	-29,323	40,039	4,449	81	0,747634	ns	-28,824	32,242	3,748	74	-31,364	38,782	4,309	81	0,956746	ns
+ APV		-26,787	27,038	5,764	22	-45,296	51,105	10,432	24	0,089593	ns	-30,910	33,290	7,097	22	-49,903	54,598	11,145	24	0,082244	ns
+ CNQX		-7,994	6,093	1,837	11	-4,192	4,580	1,322	12	0,059370	ns	-7,832	6,598	1,989	11	-4,087	2,094	0,605	12	0,090080	ns
MNI	13,23	-50,684	44,025	5,050	76	-51,670	50,783	5,444	87	0,640498	ns	-55,859	46,330	5,314	76	-56,608	52,608	5,640	87	0,720112	ns
+ APV		-52,398	40,238	8,390	23	-71,659	56,209	11,474	24	0,180646	ns	-56,736	44,881	9,358	23	-78,148	53,541	10,929	24	0,119088	ns
+ CNQX		-5,568	5,807	1,751	11	-5,333	3,601	1,040	12	0,959760	ns	-5,343	6,587	1,986	11	-4,695	3,825	1,104	12	0,814940	ns
MNI	15,81	-74,495	63,112	7,192	77	-66,308	55,853	6,023	86	0,459982	ns	-81,952	64,762	7,380	77	-72,182	56,492	6,092	86	0,428558	ns
+ APV		-71,399	54,349	11,333	23	-94,261	62,592	13,345	22	0,166981	ns	-77,875	60,302	12,574	23	-105,697	77,472	16,517	22	0,128490	ns
+ CNQX		-9,655	6,776	2,043	11	-6,713	5,311	1,533	12	0,216100	ns	-7,295	6,371	1,921	11	-6,723	3,993	1,153	12	1,000000	ns
MNI	18,03	-86,727	63,018	7,277	75	-82,369	59,371	6,478	84	0,868618	ns	-94,047	65,301	7,540	75	-91,133	63,540	6,933	84	0,841708	ns
+ APV		-98,570	73,001	15,222	23	-111,174	67,201	13,717	24	0,414326	ns	-104,511	78,543	16,377	23	-121,702	71,157	14,525	24	0,403738	ns
+ CNQX		-12,113	8,001	2,413	11	-7,368	6,563	1,895	12	0,159410	ns	-7,851	7,564	2,280	11	-7,078	7,055	2,037	12	0,368880	ns
MNI	20,00	-108,467	81,964	9,464	75	-87,200	63,672	7,119	80	0,114709	ns	-111,903	81,171	9,373	75	-93,352	64,010	7,157	80	0,197838	ns
+ APV		-112,466	80,060	16,694	23	-131,840	83,675	17,080	24	0,414326	ns	-119,319	85,462	17,820	23	-141,061	83,108	16,964	24	0,193744	ns
+ CNQX		-8,944	7,831	2,361	11	-8,427	5,704	1,720	11	0,947360	ns	-6,844	4,293	1,294	11	-6,563	4,399	1,326	11	0,920240	ns
MNI	21,79	-115,633	81,192	9,438	74	-94,286	65,055	7,141	83	0,093172	ns	-123,141	83,524	9,710	74	-102,025	67,901	7,453	83	0,171359	ns
+ APV		-134,799	90,717	18,916	23	-150,501	86,352	18,006	23	0,278278	ns	-140,314	93,791	19,557	23	-156,923	94,695	19,745	23	0,460100	ns
+ CNQX		-12,020	8,610	2,596	11	-8,321	6,701	1,936	12	0,365484	ns	-7,755	6,196	1,868	11	-6,722	5,114	1,476	12	0,961440	ns

Tab. 7.1: Messwerttabelle der elektrophysiologischen Einzel-Signale im Voltage-Clamp-Modus nach optischer Glutamat-Freisetzung (Uncaging) mit steigender Laserleistung (10,00 mW bis 21,79 mW) für alle drei Versuchsbedingungen (20 mM MNI und zusätzlich 200 μ M APV oder 20 μ M CNQX im ACSF); getrennt für beide untersuchten Genotypen (WT = Wildtyp, KO = Knock-out); maximale durchschnittliche Amplituden der uEPSCs und die 20 % - 80 % Anstiegsraten; Angabe der Standard-Abweichung (SD), des Standard-Fehlers (SEM) und Anzahl der gemessenen Spines (N); Signifikanzlevel $\alpha = 0,05$; ns = nicht signifikant

Experimente	Laserleistung [mW]	durchschnittliche maximale Amplitude Kalzium [$\Delta G / R$]									
		WT				KO				p-Wert	
		$\Delta G / R$	SD	SEM	N	$\Delta G / R$	SD	SEM	N		
MNI	10,00	0,0124	0,0100	0,0014	48	0,0138	0,0147	0,0020	52	0,961784	ns
+ APV		0,0050	0,0031	0,0014	5	0,0053	0,0032	0,0013	6	0,887446	ns
+ CNQX		0,0070	0,0024	0,0009	7	0,0067	0,0033	0,0013	6	0,819348	ns
MNI	13,23	0,0183	0,0141	0,0020	50	0,0197	0,0179	0,0023	60	0,829404	ns
+ APV		0,0040	0,0029	0,0009	11	0,0062	0,0038	0,0009	16	0,057866	ns
+ CNQX		0,0132	0,0087	0,0033	7	0,0069	0,0037	0,0011	12	0,091966	ns
MNI	15,81	0,0252	0,0181	0,0024	58	0,0211	0,0181	0,0022	69	0,098453	ns
+ APV		0,0069	0,0046	0,0013	13	0,0061	0,0035	0,0009	14	0,493450	ns
+ CNQX		0,0173	0,0109	0,0035	10	0,0108	0,0053	0,0017	10	0,179560	ns
MNI	18,03	0,0273	0,0202	0,0026	61	0,0266	0,0213	0,0026	70	0,768276	ns
+ APV		0,0105	0,0067	0,0019	13	0,0080	0,0074	0,0019	16	0,281048	ns
+ CNQX		0,0175	0,0171	0,0057	9	0,0155	0,0109	0,0033	11	0,566260	ns
MNI	20,00	0,0276	0,0210	0,0026	66	0,0288	0,0229	0,0027	73	0,610842	ns
+ APV		0,0114	0,0060	0,0017	13	0,0095	0,0069	0,0017	17	0,470550	ns
+ CNQX		0,0276	0,0188	0,0077	6	0,0203	0,0101	0,0038	7	0,713286	ns
MNI	21,79	0,0300	0,0223	0,0027	69	0,0268	0,0223	0,0026	75	0,428126	ns
+ APV		0,0121	0,0058	0,0018	10	0,0117	0,0082	0,0021	15	0,585020	ns
+ CNQX		0,0216	0,0103	0,0037	8	0,0209	0,0103	0,0034	9	0,932208	ns

Tab. 7.2: Messwerte der Kalzium-Antworten der Einzel-Signale im VC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung (10,00 mW bis 21,79 mW) für alle drei Versuchsbedingungen (20 mM MNI und zusätzlich 200 μ M APV oder 20 μ M CNQX im ACSF); getrennt für beide untersuchten Genotypen (WT = Wildtyp, KO = Knock-out); maximalen durchschnittlichen Amplituden der Kalzium-Transienten ($\Delta G/R$); Angabe der Standard-Abweichung (SD), des Standard-Fehlers (SEM) und Anzahl der gemessenen Spines (N); Signifikanzlevel $\alpha = 0,05$; ns = nicht signifikant

Experimente	Laserleistung [mW]	durchschnittliche Einstromrate Kalzium k_i [$\Delta G / R$] / s]								durchschnittliche Ausstromrate Kalzium k_e [$\Delta G / R$] / s]											
		WT				KO				p-Wert	WT				KO				p-Wert		
		k_i	SD	SEM	N	k_i	SD	SEM	N		k_e	SD	SEM	N	k_e	SD	SEM	N			
MNI	10,00	0,4551	0,5283	0,0763	48	0,9017	1,3347	0,1851	52	0,157115	ns	17,8747	62,5535	9,0288	48	13,0289	20,6626	2,8654	54	0,728890	ns
+ APV		0,3211	0,4610	0,2062	5	0,6853	1,1758	0,4800	6	0,696970	ns	3,4837	2,2104	0,9885	5	7,7249	6,4771	2,6443	6	0,696970	ns
+ CNQX		0,5143	0,6614	0,2500	7	0,6969	0,9660	0,3944	6	0,646854	ns	14,2602	17,8181	6,7346	7	37,8994	41,3782	16,8926	6	0,214452	ns
MNI	13,23	0,7930	0,7989	0,1130	50	1,6347	2,9304	0,3783	60	0,167935	ns	6,9929	7,6597	1,0832	50	8,8277	18,3316	2,3666	60	0,772002	ns
+ APV		0,4508	0,5488	0,1655	11	0,5381	0,5866	0,1467	16	0,786656	ns	9,0055	9,2877	2,8004	11	11,8771	20,3852	5,0963	16	0,688374	ns
+ CNQX		0,3671	0,3608	0,1364	7	0,6970	0,9648	0,2785	12	0,716520	ns	14,1824	13,9957	5,2899	7	15,6272	34,0551	9,8309	12	0,471740	ns
MNI	15,81	1,2921	1,6759	0,2201	58	1,7906	2,5887	0,3116	69	0,482524	ns	8,5927	8,2845	1,0878	58	10,2087	22,1019	2,6608	69	0,448982	ns
+ APV		0,3757	0,2862	0,0794	13	0,9764	1,3999	0,3741	14	0,652490	ns	21,7654	31,4655	8,7270	13	16,7401	35,1575	9,3962	14	0,193250	ns
+ CNQX		1,4164	1,7385	0,5497	10	0,7968	1,1359	0,3592	10	0,319740	ns	14,6288	18,5266	5,8586	10	7,3008	8,2895	2,6214	10	0,393040	ns
MNI	18,03	1,4705	1,7891	0,2291	61	1,7479	2,6481	0,3165	70	0,708970	ns	9,9134	21,7256	2,7817	61	9,6167	16,5653	1,9799	70	0,545844	ns
+ APV		1,5368	1,7817	0,4942	13	0,3965	0,4326	0,1081	16	0,276114	ns	18,8967	20,5279	5,6934	13	15,7242	17,5202	4,3801	16	0,695320	ns
+ CNQX		1,1220	1,2114	0,4038	9	1,1066	1,1998	0,3618	11	0,662270	ns	14,1494	15,9893	5,3298	9	9,3450	10,7916	3,2538	11	0,585480	ns
MNI	20,00	1,6254	1,6664	0,2051	66	1,8225	2,0805	0,2435	73	0,610266	ns	17,2248	49,6966	6,1172	66	12,2515	27,8140	3,2554	73	0,265572	ns
+ APV		0,6646	0,4697	0,1303	13	1,2683	1,8063	0,4381	17	0,938400	ns	27,7542	31,9395	8,8584	13	27,6281	54,2498	13,1575	17	0,270054	ns
+ CNQX		0,8915	0,4224	0,1724	6	0,9260	0,7369	0,2785	7	0,534966	ns	5,4070	3,5203	1,4371	6	3,9478	1,7277	0,6530	7	0,444056	ns
MNI	21,79	1,5876	1,6150	0,1944	69	1,5958	2,1657	0,2501	75	0,463508	ns	10,8166	16,8941	2,0338	69	7,9094	10,5083	1,2134	75	0,133647	ns
+ APV		1,5032	1,1486	0,3632	10	1,4182	1,8835	0,4863	15	0,260320	ns	19,0866	22,7612	7,1977	10	18,1894	17,8998	4,6217	15	0,934100	ns
+ CNQX		1,2741	0,9009	0,3185	8	1,0902	0,7225	0,2408	9	0,787330	ns	13,9928	13,1789	4,6595	8	7,9426	8,1622	2,7208	9	0,391526	ns

Tab. 7.3: Messwerte der Kalzium-Antworten der Einzel-Signale im VC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung (10,00 mW bis 21,79 mW) für alle drei Versuchsbedingungen (20 mM MNI und zusätzlich 200 μ M APV oder 20 μ M CNQX im ACSF); getrennt für beide untersuchten Genotypen (WT = Wildtyp, KO = Knock-out); Werte der Einstromraten k_i und Ausstromraten k_e für die durchschnittlichen Kalzium-Transienten; Angabe der Standard-Abweichung (SD), des Standard-Fehlers (SEM) und Anzahl der gemessenen Spines (N); Signifikanzlevel $\alpha = 0,05$; ns = nicht signifikant

7.3.2. Messwerte für die induzierten Einzel-Signale im Current-Clamp (CC)

Experimente	Laserleistung [mW]	Ruhemembranpotential [mV]										p-Wert	
		WT				KO							
		RMP	SD	SEM	N	RMP	SD	SEM	N				
MNI	10,00	-63,726	4,910	0,556	78	-64,154	4,046	0,441	84	0,322934	ns		
+ APV		-62,542	3,271	0,697	22	-62,924	2,807	0,573	24	0,717992	ns		
+ CNQX		-63,789	2,768	0,875	10	-63,688	2,064	0,622	11	1,000000	ns		
MNI	13,23	-63,759	4,623	0,523	78	-64,237	4,419	0,482	84	0,347528	ns		
+ APV		-62,816	3,425	0,730	22	-62,783	3,394	0,693	24	1,000000	ns		
+ CNQX		-62,595	2,812	0,889	10	-63,656	2,123	0,613	12	0,252100	ns		
MNI	15,81	-63,987	4,532	0,520	76	-63,604	4,151	0,450	85	0,651208	ns		
+ APV		-62,538	3,905	0,832	22	-63,266	3,477	0,725	23	0,528094	ns		
+ CNQX		-62,279	2,929	0,976	9	-63,232	2,181	0,630	12	0,483060	ns		
MNI	18,03	-64,303	4,926	0,597	68	-63,847	4,392	0,471	87	0,765286	ns		
+ APV		-62,580	3,728	0,777	23	-62,898	3,626	0,740	24	0,804602	ns		
+ CNQX		-62,987	1,995	0,631	10	-63,346	2,521	0,728	12	0,644240	ns		
MNI	20,00	-63,347	4,779	0,580	68	-63,893	3,963	0,432	84	0,272072	ns		
+ APV		-62,867	3,941	0,822	23	-63,034	3,660	0,747	24	0,892756	ns		
+ CNQX		-62,812	2,068	0,654	10	-63,489	3,324	0,959	12	0,775600	ns		
MNI	21,79	-64,058	5,045	0,621	66	-63,535	4,036	0,446	82	0,740706	ns		
+ APV		-62,944	3,716	0,775	23	-62,532	4,001	0,817	24	0,810916	ns		
+ CNQX		-62,115	2,654	0,839	10	-63,285	3,323	0,959	12	0,339380	ns		

Tab. 7.4: Ruhemembranpotential (RMP) in den Messungen der elektrophysiologischen Einzel-Signale im Current-Clamp-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung (10,00 mW bis 21,79 mW) für alle drei Versuchsbedingungen (20 mM MNI und zusätzlich 200 µM APV oder 20 µM CNQX im ACSF); getrennt für beide untersuchten Genotypen (WT = Wildtyp, KO = Knock-out); RMP in mV mit Angabe der Standard-Abweichung (SD), des Standard-Fehlers (SEM) und Anzahl der jeweils gemessenen Spines und somit Zellen (N); Signifikanzlevel $\alpha = 0,05$; ns = nicht signifikant

Experimente	Laserleistung [mW]	maximale Amplitude der uEPSPs [mV]								20% - 80% Anstiegsraten der uEPSPs [mV/s]								p-Wert			
		WT				KO				p-Wert	WT				KO						
		Amplitude	SD	SEM	N	Amplitude	SD	SEM	N		Rate	SD	SEM	N	Rate	SD	SEM			N	
MNI	10,00	1,034	0,964	0,109	78	1,191	1,280	0,140	84	0,770198	ns	678,70	685,16	77,58	78	742,94	777,64	84,85	84	0,861400	ns
+ APV		0,807	0,993	0,212	22	1,264	1,079	0,220	24	0,518095	ns	513,91	665,36	141,86	22	865,47	802,98	163,91	24	0,671408	ns
+ CNQX		0,154	0,118	0,037	10	0,186	0,109	0,033	11	0,405360	ns	64,73	65,73	20,61	10	59,17	36,85	11,11	11	1,000000	ns
MNI	13,23	2,427	1,947	0,220	78	2,280	2,178	0,238	84	0,283390	ns	1487,56	1147,64	129,95	78	1436,34	1294,63	141,26	84	0,339726	ns
+ APV		1,818	1,630	0,348	22	2,494	1,619	0,331	24	0,679689	ns	1202,09	1014,42	216,27	22	1680,57	1025,85	209,40	24	0,058499	ns
+ CNQX		0,284	0,212	0,067	10	0,242	0,191	0,055	12	0,973080	ns	99,55	84,61	26,76	10	83,44	79,01	22,09	12	0,446640	ns
MNI	15,81	3,439	2,381	0,273	76	3,047	2,507	0,272	85	0,120602	ns	2108,69	1368,90	157,02	76	1881,53	1462,56	158,64	85	0,096097	ns
+ APV		2,811	2,167	0,462	22	3,421	1,825	0,381	23	0,134478	ns	1818,94	1310,84	279,47	22	2195,19	1169,29	243,81	23	0,208444	ns
+ CNQX		0,451	0,401	0,134	9	0,355	0,172	0,050	12	0,970700	ns	159,72	164,11	54,70	9	93,17	52,32	15,10	12	0,393380	ns
MNI	18,03	4,019	2,658	0,322	68	3,966	2,961	0,317	87	0,622632	ns	2470,71	1555,73	188,66	68	2404,95	1573,10	168,65	87	0,620632	ns
+ APV		3,678	2,444	0,510	23	4,285	2,184	0,446	24	0,288634	ns	2216,13	1259,17	262,55	23	2671,25	1254,73	256,12	24	0,221594	ns
+ CNQX		0,559	0,532	0,168	10	0,517	0,386	0,112	12	0,821140	ns	189,90	210,32	66,51	10	124,07	72,80	21,02	12	0,970220	ns
MNI	20,00	4,540	2,622	0,318	68	4,216	2,897	0,316	84	0,231222	ns	2778,47	1496,34	181,46	68	2523,74	1576,80	172,04	84	0,152025	ns
+ APV		4,217	2,639	0,550	23	5,068	2,669	0,545	24	0,202006	ns	2533,81	1365,12	284,65	23	3185,97	1597,21	326,03	24	0,155761	ns
+ CNQX		0,645	0,508	0,161	10	0,558	0,281	0,081	12	0,972040	ns	205,49	245,06	77,49	10	159,42	159,04	45,91	12	0,484426	ns
MNI	21,79	4,716	2,773	0,341	66	4,144	2,781	0,307	82	0,119371	ns	2769,06	1588,08	195,48	66	2447,35	1465,61	161,85	82	0,197186	ns
+ APV		4,941	2,843	0,593	23	6,020	2,977	0,608	24	0,133252	ns	2864,29	1406,72	293,32	23	3607,40	1678,77	342,68	24	0,136834	ns
+ CNQX		0,717	0,545	0,172	10	0,650	0,443	0,128	12	0,764766	ns	212,14	182,18	57,61	10	174,95	100,00	28,87	12	0,729080	ns

Tab. 7.5: Messwerte der elektrophysiologischen Einzel-Signale im CC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung (10,00 mW bis 21,79 mW) für alle drei Versuchsbedingungen (20 mM MNI und zusätzlich 200 µM APV oder 20 µM CNQX im ACSF); getrennt für beide untersuchten Genotypen (WT = Wildtyp, KO = Knock-out); maximale durchschnittliche Amplituden der uEPSPs und die 20 % - 80 % Anstiegsraten; Angabe der Standard-Abweichung (SD), des Standard-Fehlers (SEM) und Anzahl der gemessenen Spines (N); Signifikanzlevel $\alpha = 0,05$; ns = nicht signifikant

Experimente	Laserleistung [mW]	durchschnittliche maximale Amplitude Kalzium [$\Delta G / R$]										p-Wert	
		WT				KO				p-Wert			
		$\Delta G / R$	SD	SEM	N	$\Delta G / R$	SD	SEM	N				
MNI	10,00	0,0132	0,0113	0,0020	33	0,0163	0,0193	0,0031	38	0,649598	ns		
+ APV		0,0025	0,0014	0,0006	5	0,0042	0,0021	0,0006	12	0,089205	ns		
+ CNQX		0,0073	0,0087	0,0039	5	0,0153	0,0111	0,0045	6	0,233766	ns		
MNI	13,23	0,0209	0,0170	0,0023	53	0,0207	0,0166	0,0023	53	0,842040	ns		
+ APV		0,0068	0,0038	0,0015	6	0,0062	0,0041	0,0011	14	0,510990	ns		
+ CNQX		0,0173	0,0108	0,0044	6	0,0164	0,0121	0,0040	9	0,676124	ns		
MNI	15,81	0,0251	0,0215	0,0028	59	0,0257	0,0210	0,0027	60	0,508538	ns		
+ APV		0,0070	0,0039	0,0011	12	0,0079	0,0063	0,0017	14	1,000000	ns		
+ CNQX		0,0168	0,0198	0,0081	6	0,0153	0,0102	0,0032	10	0,511988	ns		
MNI	18,03	0,0267	0,0231	0,0032	53	0,0272	0,0211	0,0025	72	0,469004	ns		
+ APV		0,0060	0,0055	0,0013	17	0,0080	0,0051	0,0013	16	0,157489	ns		
+ CNQX		0,0228	0,0178	0,0067	7	0,0164	0,0098	0,0030	11	0,451986	ns		
MNI	20,00	0,0309	0,0218	0,0028	60	0,0281	0,0211	0,0025	74	0,497926	ns		
+ APV		0,0106	0,0084	0,0025	11	0,0113	0,0099	0,0025	16	0,861814	ns		
+ CNQX		0,0201	0,0176	0,0062	8	0,0207	0,0138	0,0044	10	0,617122	ns		
MNI	21,79	0,0317	0,0255	0,0034	56	0,0300	0,0191	0,0023	67	0,829316	ns		
+ APV		0,0100	0,0061	0,0017	13	0,0115	0,0067	0,0017	16	0,732600	ns		
+ CNQX		0,0316	0,0231	0,0103	5	0,0223	0,0124	0,0039	10	0,477522	ns		

Tab. 7.6: Messwerte der Kalzium-Antworten der Einzel-Signale im CC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung (10,00 mW bis 21,79 mW) für alle drei Versuchsbedingungen (20 mM MNI und zusätzlich 200 μ M APV oder 20 μ M CNQX im ACSF); getrennt für beide untersuchten Genotypen (WT = Wildtyp, KO = Knock-out); maximalen durchschnittlichen Amplituden der Kalzium-Transienten ($\Delta G/R$); Angabe der Standard-Abweichung (SD), des Standard-Fehlers (SEM) und Anzahl der gemessenen Spines (N); Signifikanzlevel $\alpha = 0,05$; ns = nicht signifikant

Experimente	Laserleistung [mW]	durchschnittliche Einstromrate Kalzium k_i [($\Delta G / R$) / s]								durchschnittliche Ausstromrate Kalzium k_e [($\Delta G / R$) / s]								p-Wert			
		WT				KO				WT				KO							
		k_i	SD	SEM	N	k_i	SD	SEM	N	k_e	SD	SEM	N	k_e	SD	SEM	N				
MNI	10,00	1,4929	2,9164	0,5077	33	1,8245	3,6698	0,5953	38	0,672856	ns	33,6064	51,8684	9,0291	33	16,6162	33,6073	5,4518	38	1,000000	ns
+ APV		0,0538	0,0859	0,0384	5	0,3102	0,5612	0,1620	12	0,288300	ns	6,1136	6,5156	2,9139	5	17,3189	44,0501	12,7162	12	0,569166	ns
+ CNQX		0,4108	0,3884	0,1737	5	0,9425	0,7059	0,2882	6	0,190476	ns	9,3074	5,5355	2,4755	5	37,6419	65,4827	26,7332	6	0,337660	ns
MNI	13,23	1,2512	1,2928	0,1776	53	1,4412	2,1169	0,2908	53	0,901620	ns	10,1052	14,4297	1,9821	53	20,2475	48,9257	6,7205	53	0,310832	ns
+ APV		0,4315	0,5890	0,2405	6	0,5449	1,0113	0,2703	14	0,821620	ns	21,2316	21,6311	8,8309	6	19,4000	37,9621	10,1458	14	0,428070	ns
+ CNQX		0,9084	0,9430	0,3850	6	0,8627	0,7278	0,2426	9	0,936264	ns	15,9600	14,6385	5,9762	6	22,6593	19,9358	6,6453	9	0,428372	ns
MNI	15,81	1,6782	2,5419	0,3309	59	2,1565	3,9929	0,5155	60	0,415910	ns	20,3129	60,6344	7,8939	59	17,8893	39,9523	5,1578	60	0,376688	ns
+ APV		0,3827	0,5552	0,1603	12	1,2133	1,8830	0,5033	14	0,120032	ns	17,9669	23,1575	6,6850	12	18,8569	27,2589	7,2852	14	0,954760	ns
+ CNQX		0,4136	0,4185	0,1708	6	0,9908	1,4732	0,4659	10	0,344906	ns	13,9878	13,7355	5,6075	6	25,7790	45,0105	14,2336	10	0,738262	ns
MNI	18,03	2,0320	2,9833	0,4098	53	2,3658	3,5757	0,4214	72	0,461214	ns	14,1572	26,7902	3,6799	53	14,7512	23,0967	2,7220	72	0,914846	ns
+ APV		0,7801	0,7176	0,1740	17	0,9199	1,2207	0,3052	16	0,927490	ns	38,5657	71,5962	17,3646	17	8,3859	9,8486	2,4622	16	0,671760	ns
+ CNQX		1,1679	0,3378	0,1277	7	1,4489	2,0172	0,6082	11	0,146368	ns	12,0060	9,7276	3,6767	7	8,1389	6,4844	1,9551	11	0,445828	ns
MNI	20,00	1,9009	1,9783	0,2554	60	2,5308	4,2448	0,4934	74	0,757324	ns	8,3138	8,6993	1,1231	60	13,6818	22,1808	2,5785	74	0,494378	ns
+ APV		1,4294	1,4023	0,4228	11	1,2659	1,6384	0,4096	16	0,758214	ns	15,3282	27,6375	8,3330	11	27,3121	30,5683	7,6421	16	0,184940	ns
+ CNQX		0,9338	0,7270	0,2570	8	2,0554	3,8522	1,2182	10	0,910324	ns	28,9927	38,3345	13,5533	8	6,7295	6,6119	2,0909	10	0,358060	ns
MNI	21,79	1,8408	2,3898	0,3194	56	1,9467	2,7939	0,3413	67	0,891836	ns	13,8753	30,9435	4,1350	56	12,1433	20,8557	2,5479	67	0,755408	ns
+ APV		1,4585	1,5588	0,4323	13	1,6989	2,2477	0,5619	16	0,522512	ns	34,1942	63,0310	17,4817	13	13,1911	13,6527	3,4132	16	1,000000	ns
+ CNQX		0,6720	0,7055	0,3155	5	1,6149	1,2473	0,3944	10	0,099900	ns	5,4521	3,0140	1,3479	5	13,2366	23,9941	7,5876	10	0,893106	ns

Tab. 7.7: Messwerte der Kalzium-Antworten der Einzel-Signale im CC-Modus nach Glutamat-Uncaging mit steigender Laserleistung (10,00 mW bis 21,79 mW) für alle drei Versuchsbedingungen (20 mM MNI und zusätzlich 200 μ M APV oder 20 μ M CNQX im ACSF); getrennt für beide untersuchten Genotypen (WT = Wildtyp, KO = Knock-out); Werte der Einstromraten k_i und Ausstromraten k_e für die durchschnittlichen Kalzium-Transienten; Angabe der Standard-Abweichung (SD), des Standard-Fehlers (SEM) und Anzahl der gemessenen Spines (N); Signifikanzlevel $\alpha = 0,05$; ns = nicht signifikant

7.3.3. Messwerte für die reinen bAP-Serien im CC

Experimente bAP-Serien	durchschnittliche maximale Amplitude Kalzium [$\Delta G / R$]										Differenz WT-KO	p-Wert
	WT				KO							
	$\Delta G / R$	SD	SEM	N	$\Delta G / R$	SD	SEM	N				
15 bAPs @ 50 Hz	0,1207	0,0525	0,0073	51	0,0923	0,0414	0,0053	61	23,53%	0,015087	*	
24 bAPs @ 25 Hz	0,1022	0,0492	0,0072	47	0,0722	0,0383	0,0052	54	29,39%	0,010701	*	

Tab. 7.8: Messwerte der Kalzium-Antworten der reinen bAP-Serien im CC-Modus durch Aktivierung spannungsgesteuerter Kalzium-Kanäle (VGCC); Experimente von 15 bAPs mit 50 Hz und 24 bAPs mit 25 Hz; 20 mM MNI-Glutamat im ACSF enthalten (Normalbedingung); getrennt für beide untersuchten Genotypen (WT = Wildtyp, KO = Knock-out); maximalen durchschnittlichen Amplituden der Kalzium-Transienten ($\Delta G/R$); Angabe der Standard-Abweichung (SD), des Standard-Fehlers (SEM) und Anzahl der gemessenen Spines (N); Signifikanzlevel $\alpha = 0,05$ (*); ns = nicht signifikant

Experiment	durchschnittliche Einstromrate Kalzium k_i [$\Delta G / R$ / s]								p-Wert	durchschnittliche Ausstromrate Kalzium k_e [$\Delta G / R$ / s]								p-Wert		
	WT				KO					WT				KO						
	k_i	SD	SEM	N	k_i	SD	SEM	N		k_e	SD	SEM	N	k_e	SD	SEM	N			
15 bAPs @ 50 Hz	0,6075	0,3013	0,0422	51	0,4764	0,2419	0,0310	61	0,0438388	*	2,4838	0,8563	0,1199	51	2,5026	0,7460	0,0955	61	0,717572	ns
24 bAPs @ 25 Hz	0,2766	0,1330	0,0194	47	0,2191	0,1108	0,0151	54	0,045863	*	2,4693	0,9036	0,1318	47	2,7193	1,2937	0,1760	54	0,321336	ns

Tab. 7.9: Messwerte der Kalzium-Antworten der reinen bAP-Serien durch Aktivierung spannungsgesteuerter Kalzium-Kanäle (VGCC); Experimente von 15 bAPs mit 50 Hz und 24 bAPs mit 25 Hz; 20 mM MNI-Glutamat im ACSF enthalten (Normalbedingung); getrennt für beide untersuchten Genotypen (WT = Wildtyp, KO = Knock-out); Werte der Einstromraten k_i und Ausstromraten k_e für die durchschnittlichen Kalzium-Transienten; Angabe der Standard-Abweichung (SD), des Standard-Fehlers (SEM) und Anzahl der gemessenen Spines (N); Signifikanzlevel $\alpha = 0,05$ (*); ns = nicht signifikant

7.3.4. Messwerte für das Stimulations-Protokoll zur Induktion von STDP im CC

Experimente Potenzierung (24 uEPSPs @ 25 Hz + 24 bAPs @ 25 Hz)	durchschnittliche maximale Amplitude Kalzium [$\Delta G / R$]										
	WT				KO				Differenz WT-KO	p-Wert	
	$\Delta G / R$	SD	SEM	N	$\Delta G / R$	SD	SEM	N			
MNI	0,2489	0,0952	0,0154	38	0,1859	0,0813	0,0127	41	25,31%	0,016837	*
+ APV	0,1517	0,0569	0,0147	15	0,1337	0,0559	0,0132	18	11,87%	0,251720	ns
+ CNQX	0,1606	0,0538	0,0269	4	0,1889	0,0840	0,0376	5	-17,62%	0,825396	ns

Tab. 7.10: Messwerte der Kalzium-Antworten während des Stimulations-Protokolls zur Induktion eines NMDAR-abhängigem LTPs; Abfolge von 24 uEPSPs und 24 bAPs (mit einer Zeitverzögerung von 10 ms folgend) mit einer jeweiligen Frequenz von 25 Hz für alle drei Versuchsbedingungen (20 mM MNI und zusätzlich 200 μ M APV oder 20 μ M CNQX im ACSF); getrennt für beide untersuchten Genotypen (WT = Wildtyp, KO = Knock-out); maximalen durchschnittlichen Amplituden der Kalzium-Transienten ($\Delta G/R$); Angabe der Standard-Abweichung (SD), des Standard-Fehlers (SEM) und Anzahl der gemessenen Spines (N); Signifikanzlevel $\alpha = 0,05$ (*); ns = nicht signifikant

Experimente Potenzierung (24 uEPSPs @ 25 Hz + 24 bAPs @ 25 Hz)	durchschnittliche Einstromrate Kalzium k_i [$(\Delta G / R) / s$]									durchschnittliche Ausstromrate Kalzium k_e [$(\Delta G / R) / s$]										
	WT				KO				p-Wert	WT				KO				p-Wert		
	k_i	SD	SEM	N	k_i	SD	SEM	N		k_e	SD	SEM	N	k_e	SD	SEM	N			
MNI	1,0662	0,6748	0,1095	38	0,7722	0,4427	0,0691	41	0,051401	ns	3,3820	2,0702	0,3358	38	3,4145	1,8113	0,2829	41	0,556672	ns
+ APV	0,4408	0,1584	0,0409	15	0,4211	0,1472	0,0347	18	0,741620	ns	2,5844	1,2054	0,3112	15	2,4010	1,6874	0,3977	18	0,565656	ns
+ CNQX	0,9748	0,3719	0,1860	4	0,7966	0,2546	0,1139	5	0,539682	ns	4,9463	2,6799	1,3400	4	4,4153	1,2018	0,5374	5	0,555556	ns

Tab. 7.11: Messwerte der Kalzium-Antworten während des Stimulations-Protokolls zur Induktion eines NMDAR-abhängigem LTPs; Abfolge von 24 uEPSPs und 24 bAPs (mit einer Zeitverzögerung von 10 ms folgend) mit einer jeweiligen Frequenz von 25 Hz für alle drei Versuchsbedingungen (20 mM MNI und zusätzlich 200 μ M APV oder 20 μ M CNQX im ACSF); getrennt für beide untersuchten Genotypen (WT = Wildtyp, KO = Knock-out); Werte der Einstromraten k_i und Ausstromraten k_e für die durchschnittlichen Kalzium-Transienten; Angabe der Standard-Abweichung (SD), des Standard-Fehlers (SEM) und Anzahl der gemessenen Spines (N); Signifikanzlevel $\alpha = 0,05$; ns = nicht signifikant

DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich Herrn Prof. Michael Frotscher Dank sagen, dass er mir die Möglichkeit gegeben in seiner Gruppe zu arbeiten und zu promovieren. Auch für die Begutachtung und die konstruktive Kritik meiner Dissertation möchte ich mich bedanken.

Einen weiteren Dank geht an meinen zweiten Betreuer und Gutachter meiner Disseratation Herrn Prof. Christian Lohr aus dem Fachbereich Biologie.

Einen Besonderen Dank gilt Saschko für die intensive und engagierte Betreuung mit unzähligen Tipps, Experimentplanungen und Vorschlägen. Bei Problemen stand er mir immer mit Rat und Tat an der Seite. Für die Bearbeitung meines Manuskriptes und die immer vorhandene Diskussions-Bereitschaft einen extra Dank.

Ich bedanke mich auch bei allen Technischen Assistenten, die mich bei den Routine-Arbeiten immer unterstützt haben. Conny Hofmann hat mir zu Beginn meiner Arbeit das nötige Laborwissen beigebracht, von dem ich mein Leben lang profitieren werde. Aniko Schneider gewährte mir einen faszinierenden Einblick in die EM. Und zum Schluss Bettina Herde, die vor allen in den letzten Jahren in jeder Hinsicht eine große Hilfe war und noch ist.

Bei allen Mitarbeitern(innen) der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die entspannte und freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Meinen beiden besten Freundinnen auch einen besonderen Dank. Wir sehen uns zwar selten, aber sind immer füreinander da. Mit Ulli konnte ich jeder Zeit private und auch wissenschaftliche Probleme diskutieren und wir haben zusammen schon viele sehr schöne Stunden verlebt. Sandra mit ihren zwei Knirpsen hat für ganz andere Abwechslung gesorgt. Ich möchte beide in meinem Leben nicht mehr missen.

Als letztes geht mein Dank an meine Familie, an meine Mom und André und an meine Omi und meinen Opa. Sie haben mich während der letzten Jahre in jeder Hinsicht unterstützt und mir zur Seite gestanden. Sie haben mir immer grenzenlose Geduld und Nachsicht entgegen gebracht und für die manchmal nötige Ablenkung und Zerstreuung gesorgt. Und sie sind meine Verbindung zu meiner Heimat und ich fahr jedes Mal gern nach Hause. Ohne sie wäre ich außerdem nicht der Mensch, der ich heute bin.

LEBENS LAUF

Daten zur Person:

Vorname Name	Anja Tippmann
Wohnort	Bramfelder Weg 70B 22159 Hamburg
Telefon	040/67103961 0173/8695002
E-Mail	anja_tippmann@web.de anja.tippmann@zmnh.uni-hamburg.de
Geburtsdatum	14.08.1981
Geburtsort	Marienberg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Religion	evangelisch

Schulbildung

09.1988-08.1992	Grundschule, Oberschule Auerbach
09.1992-07.2000	Gymnasium, Greifensteingymnasium Thum

Studium

10.2000-06.2005	Universität Leipzig, Fachrichtung: Biologie Diplom
17.06.2005	Abschluss Diplom-Biologin

Berufspraxis

06.2005-12.2005	Arbeitssuchend
15.12.2005-14.12.2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin Universität Freiburg, Medizinische Fakultät Institut für Anatomie und Zellbiologie, Abteilung Neuroanatomie
seit 15.12.2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin Universitätsklinikum Eppendorf, Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH), Institut für Strukturelle Neurobiologie

Publikationen:

Böhme, M. U.; Fritsch, G.; **Tippmann, A.**; Schlegel, M. & Berendonk, T. U. (2007), "The complete mitochondrial genome of the green lizard *Lacerta viridis viridis* (Reptilia: Lacertidae) and its phylogenetic position within squamate reptiles.", *Gene* **394**(1-2), 69-77.

Konferenzbeiträge:

05.2010	SFB/TR3 – Junior Scientists' Meeting in Bonn, Fachvortrag: Tippmann, A. "Calcium and the spine apparatus – Two-photon calcium imaging combined with glutamate uncaging at individual synapses in organotypic slice cultures"
03.2011	9. NWG Treffen in Göttingen, Poster T7-1A: Tippmann, A., Drakew, A. und Frotscher, M. „Role of the spine apparatus in synaptic transmission – Two-photon Ca^{2+} imaging combined with glutamate uncaging at individual synapses in organotypic slice cultures"