

**Morphologische Grundlagen aktivitätsabhängiger  
synaptischer Plastizität**

Eine elektronenmikroskopische und elektrophysiologische Untersuchung

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Chemie

aus dem Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie  
- Abteilung Lebensmittelchemie -  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Henrike Neuhoff**  
aus Hamburg  
1999

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom November 1996 bis Mai 1999 unter der Leitung von Frau Dr. M. Schweizer im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg im Institut für Neurale Signalverarbeitung durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart

Gutachter: Prof. Dr. C. Schaller

Mündliche Prüfung: Juli 1999

## **A. Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Dr. Michaela Schweizer bedanken, die mir die Möglichkeit gab, diese Dissertation am Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg durchzuführen und mich in die Welt der Neurowissenschaften eingeführt hat.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Jochen Röper bedanken. Durch seine ständige Diskussionsbereitschaft und seinem Interesse an meinem Thema stand er mir stets mit Anregungen zur Seite.

Herzlichen Dank auch an Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart für die Bereitschaft, diese Arbeit als erster Gutachter zu betreuen. Ebenso vielen Dank an Frau Prof. Dr. Chica Schaller für die spontane Bereitschaft, das Koreferat für diese Arbeit zu übernehmen.

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie/Morphologie. Dr. Claudius B. Griesinger war besonders in der Anfangsphase dieser Arbeit eine große Hilfe für mich. Wir hatten zusammen immer viel Spaß bei der Arbeit. Vielen Dank auch an Frau Dr. Susanne Fehr. Es war eine stete Freude, mit ihr in einem Labor zu arbeiten. Ebenso gilt mein Dank Saskia Siegel für die Unterstützung in der Zellkultur und Joachim Grotherr, der sich bei zahlreichen Computerproblemen als einfach unentberlich erwiesen hat. Ebenso herzlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Elektrophysiologie von PD Dr. Jochen Röper und insbesondere bei Axel Neu für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bedanken.

Zum Schluß möchte ich mich von ganzen Herzen bei meinen Eltern und meinen Brüdern Henning und Heiko bedanken, die mir immer zur Seite standen. Mein tiefer Dank geht auch an Oma.

## B. Abkürzungsverzeichnis

1S,3R-ACPD	Aminocyclopentan-1S,3R-dicarboxylat
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
APV	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
CA	Cornu Ammonis
CaMKII	Calcium/Calmodulinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CNQX	6-Cyano-7-nitro-chinoxalin-2,3-dion
ECM	extrazelluläre Matrix
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxy ethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAD	Glutaminsäure-Decarboxylase
GFAP	glia fibrillary associated protein
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
LTP	Langzeitpotenzierung
MAGUKs	membrane-associated guanylate kinases
MAP	Mikrotubuli assoziierte Proteine
MEM	Minimal Essential Medium
NBQX	6-Nitro-7-sulphamobenzoquinoxaline-2,3dion
NCAM	Neuronales Zelladhäsionsmolekül
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OPA	operational amplifier
PAI-1	Plasmin-Aktivator Inhibitor I
PSD	postsynaptische Dichte
PSP	postsynaptisches Potential
PTX	Picrotoxin
SA	Spineapparat
SAP	synapse associated protein
SER	glattes (smooth) endoplasmatisches Reticulum
STP	short-term potentiation
TEA	Tetraethylammonium
TEM	Transmissionelektronenmikroskop

tPA	tissue plasminogen activator
tPA-stop	2,7-bis-(4-Amidinobenzyliden)-cycloheptan-1-one)dihydrochlorid
TTX	Tetrodotoxin
VAMPs	vesicle associated membrane proteins
ZNS	Zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	9
1.1	Synapsen.....	9
1.1.1	Chemische Synapsen.....	10
1.1.2	Ultrastruktur exzitatorischer Synapsen.....	11
1.1.2.1	Die Präsynapse.....	12
1.1.2.2	Der synaptische Spalt.....	13
1.1.2.3	Die Postsynapse.....	14
1.1.2.4	Komponenten der PSD.....	15
1.2	Synaptische Aktivität.....	15
1.2.1	Synaptische Erregung durch Glutamaterezeptoren.....	16
1.2.2	Synaptische Hemmung durch Chlorid-selektive Rezeptorkanäle.....	17
1.3	Synaptische Plastizität.....	18
1.3.1	Perforierte Synapsen.....	19
1.3.2	Hippocampus und LTP.....	20
1.3.3	Morphologische Korrelate aktivitätsabhängiger synaptischer Plastizität.....	22
1.3.4	Mögliche Mechanismen synaptischer Plastizität.....	22
1.3.4.1	NMDA-Rezeptor.....	23
1.3.4.2	Proteasen und aktivitätsabhängige synaptische Plastizität.....	23
1.4	Ziel dieser Arbeit.....	25
1.4.1	Vorgehensweise.....	25
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Zellkultur.....	27
2.1.1	Beschichtung der Coverslips.....	27
2.1.2	Medien für die Zellkultur.....	27
2.1.3	Präparation/Kultivierung der Neurone.....	28
2.2	Lichtmikroskopie.....	28
2.3	Immuncytochemie.....	29
2.3.1	Lucifer Yellow/Synaptophysinfärbung.....	30
2.3.2	Neuronen/Gliaverhältnis.....	30
2.3.3	Verhältnis exzitatorischer/inhibitorischer Neurone.....	30
2.4	Elektronenmikroskopie.....	31
2.4.1	Das Elektronenmikroskop.....	31
2.4.2	Experimente.....	35
2.4.3	Einbettung.....	35
2.4.4	Gridbefilmung.....	37
2.4.5	Kontrastierung.....	37
2.4.6	Auswertung.....	37
2.5	Elektrophysiologie.....	38
2.5.1	Aufbau des Meßstandes.....	38
2.5.1.1	Pipetten.....	39
2.5.1.2	Applikation.....	39
2.5.1.3	Datenaufnahme.....	39
2.5.2	Voltage-Clamp-Messung.....	39
2.5.3	Current-Clamp-Messung.....	40
2.5.4	Kapazitätskorrektur.....	41
2.5.5	Serienwiderstand.....	42

2.5.6	Durchführung .....	42
2.5.7	Meßprotokolle .....	44
2.5.7.1	Current-Clamp .....	44
2.5.7.2	Voltage-Clamp .....	44
2.5.8	Datenaufnahme .....	44
3	Ergebnisse .....	45
3.1	Hippocampale Zellkultur .....	45
3.1.1	Neuronen/Gliazellen .....	45
3.1.2	Neuronen/Gliaverhältnis .....	46
3.1.3	Verhältnis exzitatorischer/inhibitorischer Neurone .....	47
3.1.4	Synaptische Ultrastruktur .....	48
3.2	Perforierte Synapsen in Abhängigkeit synaptischer Aktivität .....	50
3.2.1	Erhöhung der Aktivität durch Picrotoxin .....	51
3.2.2	Rolle des NMDA-Rezeptors .....	52
3.2.3	Funktion des tPAs .....	52
3.2.4	Inhibition der synaptischen Aktivität durch TTX .....	54
3.3	Verhältnis von Schaft- und Spinesynapsen in Abhängigkeit von Aktivität .....	54
3.3.1	Erhöhung der Aktivität durch Picrotoxin .....	54
3.3.2	Rolle des NMDA-Rezeptors .....	55
3.3.3	Funktion des tPAs .....	56
3.3.4	Inhibition der synaptischen Aktivität durch TTX .....	57
3.4	Synaptische Parameter in Abhängigkeit von Aktivität .....	57
3.5	Elektrophysiologische Untersuchungen .....	58
4	Diskussion .....	60
4.1	Perforierte Synapsen .....	60
4.1.1	Aktivitätsabhängige Bildung perforierter Synapsen .....	60
4.1.2	Funktion perforierter Synapsen .....	62
4.1.3	Häufigkeit perforierter Synapsen .....	63
4.1.4	Modelle zur Entstehung perforierter Synapsen .....	65
4.1.5	Molekulare Mechanismen der Synapsenperforation .....	68
4.1.5.1	tPA .....	68
4.1.5.2	NMDA-Rezeptoren .....	70
4.1.5.3	Zelladhäsionsmoleküle .....	71
4.1.5.4	Membranmaterial .....	73
4.1.6	Modell der Synapsenperforation .....	74
4.2	Spine- und Schaftsynapsen .....	75
4.2.1	Entstehung von Schaft- und Spinesynapsen .....	75
4.2.2	Verhältnis von Spine- und Schaftsynapsen in Abhängigkeit von Aktivität .....	77
4.2.3	Anteil perforierter Synapsen an Spine- und Schaftsynapsen .....	78
4.2.4	Aktivitätsabhängige Veränderung der Synapsendichte .....	79
4.2.5	Funktion von Spines .....	80
4.3	Aktivitätsabhängige Veränderungen synaptischer Parameter .....	81
4.4	Ausblick .....	82
5	Zusammenfassung .....	84

6	Anhang.....	88
6.1	Zellkultur .....	88
6.1.1	Chemikalien/Lösungen.....	88
6.1.2	Beschichtung der Coverslips.....	88
6.1.3	Medien .....	88
6.1.4	Medienzusätze.....	89
6.1.5	Angesetzte Medien.....	89
6.1.6	Präparation der Neurone.....	90
6.1.7	Material/Geräte .....	91
6.2	Immuncytochemie.....	91
6.2.1	Chemikalien/Lösungen.....	91
6.2.2	Antikörper.....	92
6.2.3	Durchführung der Immuncytochemie .....	92
6.2.4	Material/Geräte .....	92
6.3	Elektronenmikroskopie.....	93
6.3.1	Chemikalien und Lösungen .....	93
6.3.2	Einbettungsprotokoll .....	93
6.3.3	Einbettungsmedien .....	94
6.3.3.1	Aralditeinbettung.....	94
6.3.3.2	Eponeinbettung .....	94
6.3.4	Gridbefilmung.....	95
6.3.5	Kontrastierung nach Reynolds.....	95
6.3.6	Material/Geräte .....	96
6.4	Elektrophysiologie.....	96
6.4.1	Chemikalien/Lösungen.....	96
6.4.2	Material/Geräte .....	96
6.5	Sonstige Chemikalien und Reagenzien .....	97
7	Literatur .....	99

## 1 Einleitung

Die größte Herausforderung der Neurowissenschaften besteht darin, die Funktionsweise des menschlichen Gehirns zu erforschen, und die biologische Basis des Bewußtseins und der geistigen Vorgänge, durch die wir wahrnehmen, handeln, lernen und uns erinnern, zu verstehen. Trotz neuer Techniken, die eine direkte Verknüpfung der molekularen Dynamik einzelner Nervenzellen mit Repräsentationen sensorischer und motorischer Aktivitäten im Gehirn erlauben und damit interne Mechanismen mit beobachtbaren Verhaltensreaktionen in Zusammenhang bringen, sind wir noch weit von der biologischen Erforschung des Gehirns und dem Verständnis höherer Gehirnfunktionen entfernt.

Die Schwierigkeit der Gehirnforschung ist in der außerordentlichen anatomischen Komplexität, sowie in der enormen Verschaltung des Gehirns begründet. Erst die streng geordnete Architektur und die Präzision in der Verschaltung ermöglichen die Steuerung der geistigen Prozesse. Bedenkt man, daß das menschliche Gehirn aus mindestens  $10^{11}$  Nervenzellen (Neuronen) besteht und jedes Neuron im Durchschnitt 1000 synaptische Kontakte ausbildet, also folglich rund  $10^{14}$  synaptische Verbindungen vorliegen, so ist es kaum verwunderlich, daß sowohl der Aufbau als auch die Verbindungen vieler Gehirnteile und damit auch Vorgänge wie Lernen, Gedächtnis etc. noch nicht völlig verstanden sind. Eine Grundvoraussetzung für ein tieferes Verständnis des Gehirns liegt daher in der Erforschung der Struktur und der Funktionsweise der neuronalen Verschaltungspunkte, der Synapsen.

### 1.1 Synapsen

Das Wort „Synapse“ wurde 1906 von Sherrington zum ersten Mal verwendet, um die Verbindung zwischen Neuronen zu beschreiben. Trotz der großen Anzahl von Synapsen liegen der synaptischen Übertragung nur zwei wesentliche Mechanismen zugrunde: die elektrische und die chemische Übertragung. Dementsprechend wird zwischen elektrischen und chemischen Synapsen unterschieden. Gegenstand dieser Arbeit sind die chemischen Synapsen. Chemische Synapsen sind flexibler und rufen im allgemeinen komplexere Verhaltensreaktionen hervor als elektrische Synapsen. Ferner können chemische Synapsen sowohl hemmende (inhibitorische) als auch erregende (exzitatorische) Vorgänge vermitteln und haben außerdem die Fähigkeit, neuronale Signale zu verstärken. Es sind folglich dynamische Systeme, deren Sensitivität modulierbar ist. Diese Modifizierbarkeit synaptischer Verbindungen, die *synaptische Plastizität*, gilt als die zelluläre Grundlage kognitiver Leistungen. Sie wird als entscheidende Voraussetzung für Lernen und Gedächtnis angesehen.

### 1.1.1 Chemische Synapsen

Chemische Synapsen sind spezialisierte Kommunikationsstellen zwischen Neuronen, an denen die Signalübertragung durch Neurotransmitter stattfindet. Nach Gray (1959) werden chemische Synapsen in zwei Kategorien unterteilt (s. Abbildung 1): Typ I (exzitatorische Synapsen) und Typ II (inhibitorische Synapsen).

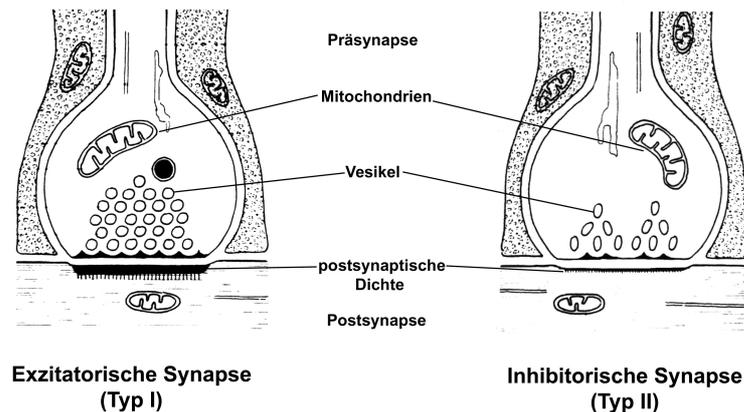


Abbildung 1: Typ I und Typ II Synapsen nach Gray (1959).

Exzitatorische Synapsen (Typ I) sind erregende Synapsen, die zumeist Glutamat als Neurotransmitter enthalten. Sie werden auch als asymmetrische Synapsen bezeichnet, da die Postsynapse gegenüber der Präsynapse eine charakteristische postsynaptische Verdichtung (postsynaptic density, PSD) aufweist. Die Dendriten exzitatorischer Neurone sind dicht mit Dornen (Spines) bedeckt. Daher können Synapsen entweder auf den Spines oder direkt auf den distalen Dendriten (Schaftsynapse) lokalisiert sein. Nach Untersuchungen von Beaulieu und Colonnier (1985) sind im visuellen Cortex adulter Ratten 84% aller Synapsen exzitatorisch. Von diesen 84% sind wiederum 79% Spinesynapsen, 21% Schaftsynapsen und nur 0.1% somatische Synapsen. Harris et al. (1994) schätzen sogar, daß über 90% aller Synapsen des zentralen Nervensystems (ZNS) Spinesynapsen sind.

Inhibitorische Synapsen (Typ II) werden hingegen als symmetrische Synapsen bezeichnet, da sie keine ausgeprägte PSD besitzen. Prä- und Postsynapse erscheinen daher im Elektronenmikroskop (EM) symmetrisch aufgebaut. Sie sind überwiegend am Soma oder proximalen Dendriten lokalisiert, wo ihr inhibitorischer Einfluß am effektivsten eingesetzt werden kann. In den, im Vergleich zu den glutamatergen Synapsen, etwas kleineren und länglicheren Vesikel ist meistens  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) als Transmitter vorhanden.

Nach Beaulieu und Collonnier (1985) sind die noch verbleibenden 16%, inhibitorische Synapsen, von denen wiederum 62% Schaftsynapsen, 31% Spinesynapsen, und 7% somatische Synapsen sind.

In allen Regionen des Nervensystems ist das Verhältnis exzitatorischer zu inhibitorischer Neurone 4:1 (Beaulieu et al., 1992). Erst dieses Verhältnis zwischen Inhibition und Erregung ermöglicht die normale Funktion des Nervensystems. Im Kontext der Plastizität wird insbesondere die vielfältige Ultrastruktur exzitatorischer Synapsen betrachtet. Auf diese soll daher im nächsten Abschnitt eingegangen werden.

### 1.1.2 Ultrastruktur exzitatorischer Synapsen

Eine Synapse besteht im allgemeinen aus drei Komponenten: der Präsynapse (Bouton), dem synaptischen Spalt und der Postsynapse (s. Abbildung 2). Diese drei Elemente bilden die sogenannte aktive Zone (active zone). Die Präsynapse wird zumeist von der Varikosität eines Axons gebildet; die Postsynapse in der Regel von einem Spine oder direkt von einem Dendriten (Schaftsynapse).

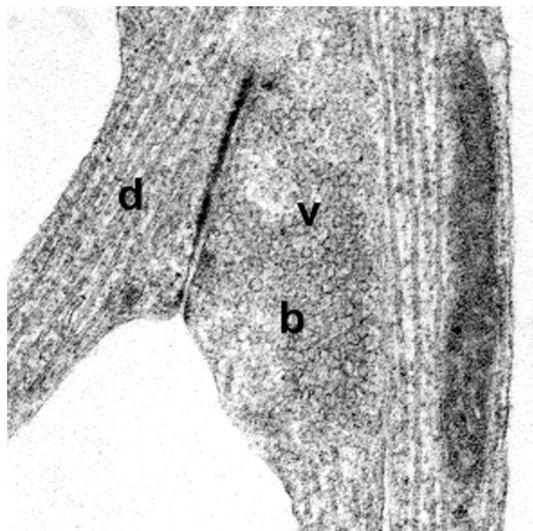


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Schaftsynapse aus einer hippocampalen Zellkultur. Der Bouton (b) ist dicht gefüllt mit Vesikeln (v). Die Postsynapse ist charakterisiert durch die postsynaptische Dichte, die als schwarzer Strich zu sehen ist. Der Dendrit (d) ist durch die ihn durchziehenden Mikrotubuli zu erkennen.

### 1.1.2.1 Die Präsynapse

Die Axone exzitatorischer und inhibitorischer Neurone bilden Synapsen über Boutons. Boutons sind axonische Spezialisierungen, die mit Vesikeln und z.T. mit Mitochondrien gefüllt sind. Die Boutons werden entweder als Varikositäten eines fortlaufenden Axons (boutons en passant) oder am Ende eines Axons (boutons terminaux) gebildet.

Boutons variieren in der Größe. In den meisten glutamatergen Synapsen wie z.B. in den CA1 Pyramidenzellen und den Körnerzellen im Gyrus dentatus des Hippocampus, aber auch in den Pyramidenzellen des Cortex, sind die Boutons relativ klein. Nach Harris und Stevens (1988, 1989) haben die Boutons von Pyramidenzellen aus dem Hippocampus der Ratte Größenordnungen zwischen  $0.04$  und  $0.26 \mu\text{m}^3$ . Die Boutons der Purkinjezellen sind hingegen etwas größer ( $0.04$  bis zu  $0.6 \mu\text{m}^3$ ). Die jeweilige Boutonform ist sehr variabel. In einigen Fällen werden von einem Bouton mehrere synaptische Kontakte eingegangen.

Wie die Größe der Boutons variiert auch die Größe der synaptischen Vesikel. Sie liegt bei glutamatergen Vesikeln zwischen  $35$ - $50$  nm Durchmesser. Die Glutamatkonzentration in isolierten Vesikeln aus dem cerebralen Cortex wurde auf  $60$ - $100$  mM/Vesikel geschätzt (Burger et al., 1989; Villanueva et al., 1990). Diese Konzentration würde  $1200$ - $2000$  Molekülen pro Vesikel entsprechen.

Die synaptischen Vesikel sind nicht gleichförmig über den Bouton verteilt, sondern kommen gehäuft an Stellen vor, an denen die präsynaptische Endigung im EM dichter erscheint. Diese speziellen Stellen haben die Form pyramidenartiger Vorsprünge (dense projections) und werden als präsynaptisches Grid bezeichnet. Im Querschnitt durch den Bouton sieht man, daß die dense projections in dem Grid hexagonal angeordnet vorliegen. Nach Gray (1959) spielt diese Anordnung eine Rolle bei der Freisetzung der Vesikel.

Die meisten Vesikel sind nicht genau am präsynaptischen Grid lokalisiert, sondern halten sich über Aktinfilamente verankert in der Nähe auf. Die Synapsine sind an der Verankerung der Vesikel am Zytoskelett beteiligt. Die nichtphosphorylierte Form des Synapsin I verknüpft die synaptischen Vesikel mit den Aktinfilamenten und anderen Komponenten des Zytoskeletts. Strömen durch Depolarisation bedingt, Calciumionen in die Endigung ein, so wird Synapsin I durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase phosphoryliert. Durch diese Phosphorylierung lösen sich die Vesikel vom Zytoskelett ab und können sich zur aktiven Zone bewegen. Das Andocken der Vesikel an der Plasmamembran, ihre Fusion und die Neurotransmitterausschüttung wird durch Wechselwirkungen zwischen Proteinen der Vesikelmembran (vesicle associated membrane proteins, VAMPs) und Proteinen der Plasmamembran (Syntaxin und Neurexin) geregelt (Kandel et al., 1993).

### 1.1.2.2 Der synaptische Spalt

Prä- und postsynaptische Membranen werden durch Proteine des Zytoskeletts und der sie umgebenden extrazellulären Matrix miteinander verbunden (Landis et al., 1988). Die Dimension des synaptischen Spaltes und die Anordnung der Rezeptoren in der postsynaptischen Membran sind wichtige Faktoren, welche die Kinetik und die Größe des postsynaptischen Stroms, der durch die Freisetzung von Neurotransmittern bewirkt wird, bestimmen.

Der synaptische Spalt ist gefüllt mit Fibrillen von 4-6 nm Durchmesser. Diese Fibrillen spielen neben dem Zusammenhalt der beiden Elemente, wahrscheinlich auch bei der Bewegung der Neurotransmitter zu den Rezeptoren eine wichtige Rolle. Andere kurze fibrilläre Strukturen (8-15 nm lang, 4-6 nm dick) ragen aus der PSD in den Spalt. Es handelt sich vermutlich um Rezeptormoleküle (Ichimura und Hashimoto, 1988). Die genaue Zusammensetzung der Proteine des synaptischen Spaltes ist bislang noch nicht bekannt.

Wichtig für den Zusammenhalt von Prä- und Postsynapse sind ebenfalls Zelladhäsionsmoleküle, wie z.B. das neuronale Zelladhäsionsmolekül (NCAM), Laminin und Cadherine, welche den synaptischen Spalt durchspannen (Fannon und Colman, 1996; Uchida et al., 1996; Spacek und Harris, 1998). Zu den Zelladhäsionsmolekülen gehören die Mitglieder der Integrin, Cadherin, Immunoglobulin, Selektin und Proteoglycan Superfamilien. Die funktionale Einheit der Zelladhäsionsmoleküle sind Multiproteinkomplexe, die aus drei Proteinklassen bestehen: den Zelladhäsionsmolekülen/Adhäsionsrezeptoren, den Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) und den Proteinen der peripheren Membran. An der extrazellulären Seite erkennen die Zelladhäsionsrezeptoren die Rezeptoren anderer Zellen oder Proteine der ECM und interagieren mit diesen. Proteine der ECM sind z.B. Fibronectine, Laminine, Kollagene und Proteoglycane. Auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran sind Zelladhäsionsrezeptoren mit zytoplasmatischen Plaques oder peripheren Membranproteinen verbunden. Die zytoplasmatischen Plaques sind für die Verbindung des Adhäsionssystems mit dem Zytoskelett sowie für die Weiterleitung von Signalen, die an den Rezeptoren der Adhäsionsmoleküle initiiert wurden verantwortlich.

Da Zelladhäsionsmoleküle für den Zusammenhalt von Prä- und Postsynapse verantwortlich sind und außerdem die Gestalt der Synapse beeinflussen, ist es denkbar, daß sie auch an der strukturellen Reorganisation von Synapsen, beteiligt sind (Mayford et al., 1992). Ihre Bedeutung im Rahmen synaptischer Plastizität wurde bereits mehrfach gezeigt (Fazeli et al., 1994; Becker et al., 1996; Lüthi et al., 1994; Muller et al., 1996; Kramer et al., 1997).

### 1.1.2.3 Die Postsynapse

Die meisten postsynaptischen Kontakte im Gewebe (>79%; s.o.) werden von Spines gebildet. Es gibt eine Vielzahl morphologisch unterschiedlicher Spines. Harris et al. (1988) analysierten Spines mittels serieller Rekonstruktion an 15 Tage alten und adulten Tieren und ordneten sie entsprechend ihrer Morphologie in 4 Kategorien ein: „Stubby“, „Thin“, „Mushroom“ und „Branched“ Spines (s. Abbildung 3).

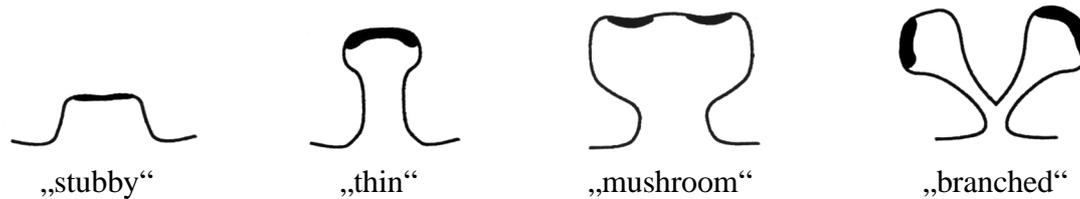


Abbildung 3: Spinekategorien nach Harris et al. (1992).

Stubby Spines sind kleine, kurze Fortsätze, die zu mehr als 30% bei 15 Tage alten Ratten vorkommen; bei adulten Tieren zu ca. 10%. Sie bilden wahrscheinlich die Vorstufe zu den Thin oder Mushroom Spines. Thin Spines sind lange, dünne Spines, mit distinktem Kopf. Sie kommen nach 15 Tagen zu 20% vor. Im ausgewachsenen Tier sind es die häufigsten Spines (>50%). Mushroom Spines zeichnen sich durch einen kurzen Hals und einen breiten, sehr großen Kopf aus. Sie kommen in beiden Altersklassen zu ca. 20% vor. Branched Spines hingegen sind sehr selten. Sie sind in beiden Alterstufen nur zu ca. 5% vorhanden und besitzen zwei Köpfe (Harris et al., 1988).

Jeder Spine enthält glattes endoplasmatisches Reticulum (SER), das 10-20% des Spinevolumens ausmacht. Das SER ist in die Membransynthese sowie in die Speicherung und Freisetzung von Calciumionen involviert (Andrews et al., 1988). Viele Spines besitzen einen Spineapparat (SA). Er sitzt meistens im Spinehals und scheint eine Verlängerung des SERs zu sein. Der Spineapparat ist wahrscheinlich, wie der Golgi-Apparat für die Synthese von Rezeptoren, die in Vesikeln verpackt zur PSD transportiert werden, zuständig (Altman, 1971).

Für die Gestalt des Spinezytoskeletts ist primär die Anordnung des Aktinmyosinnetzwerkes verantwortlich. In kleinen Spines sind die Filamente senkrecht zur Längsachse des dendritischen Schafts angeordnet. Mit zunehmender Spinekomplexität nimmt die Aktinkonzentration zu und die Organisation der Aktinfilamente wird komplexer (Markham und Fifkova, 1986).

Über die Funktion der Spines wird immer noch diskutiert. In den letzten Jahren verfestigte sich immer mehr die Meinung, daß Spines eine wichtige Rolle im Rahmen der synaptischen Plastizität spielen (Fifkova und van Harrefield, 1977; Chang und Greenough, 1984).

#### 1.1.2.4 Komponenten der PSD

An der Postsynapse befindet sich direkt an der Plasmamembran ein dichtes Gitter feiner Filamente (Hirokawa et al. 1989). Durch die hohe Affinität zu Osmiumtetroxid wird diese Region im EM als elektronendicht (dunkel gesehen) und daher als postsynaptische Dichte (PSD) bezeichnet (Palay, 1956). Die PSD ist höchst prominent in Typ I (exzitatorischen) Synapsen. Eine ähnliche, wesentlich schwächer ausgeprägte Struktur wird auch in GABAergen Synapsen gesehen.

Untersuchungen aufgereinigter PSDs haben gezeigt, daß diese aus einer Reihe unterschiedlicher Proteine bestehen, wie z.B. den Zytoskelettproteinen Tubulin (Kelly und Cotman, 1978; Ratner und Mahler, 1983) Aktin (Cohen et al., 1977) und Fodrin sowie dem Mikrotubuli assoziierten Protein MAP2 (Shafit-Zagardo et al., 1997). Aktinfilamente kommen zwar im ganzen Zytoskelett vor, sind aber in der PSD-Region besonders hoch konzentriert. Filamentöse Stränge, die wahrscheinlich aus F-Aktin bestehen, ziehen aus dem Randbereich der PSD in den Dendriten hinein und verbinden das fibröse Netz der PSD mit dem dendritischen Zytoskelett (Gulley und Reese, 1981). Des weiteren hat man Proteine der PSD-95 Familie, die Typ 2-Untereinheit des NMDA-Rezeptors und Adhäsionsmoleküle in der PSD nachgewiesen. Ferner kommen diverse Proteinkinasen vor, wie z.B. die Calcium/Calmodulin Kinase Typ II (CaMKII; Bennett und Kennedy, 1987), die cAMP-abhängige Proteinkinase (Wu und Siekevitz, 1988), die Tyrosinkinase (Gurd und Bisson, 1990) sowie die Proteinkinase C (PKC, Suzuki et al., 1993).

Die PSD fungiert wahrscheinlich als zytoskelettales Gerüst, das mit Membranproteinen und Rezeptoren interagiert, um deren Verteilung und laterale Mobilität sowie die posttranslatale Modulation der Rezeptorfunktionen zu regulieren. Die Beeinflussung der Morphologie der Postsynapse (Siekevitz, 1985), sowie die Steuerung regulatorischer Prozesse deuten auf die Involvierung der PSD in der synaptischen Plastizität hin (Wesa et al., 1982; Greenough et al., 1985).

### 1.2 Synaptische Aktivität

Die neuronale Signalleitung beruht auf den schnellen Änderungen der elektrischen Potentialdifferenz an der Zellmembran eines Neurons. Im Ruhezustand hat ein Neuron ein Ruhepotential von -65 mV. Es resultiert aus der ungleichen Verteilung von Natrium, Kalium- und Chloridionen sowie organischen Ionen beiderseits der Zellmembranen und aus der selektiven Permeabilität der Membran für Kaliumionen. Ein postsynaptisches Eingangssignal wird an der Triggerzone am Axonhügel in ein Aktionspotential umgewandelt, wenn es eine bestimmte

Schwelle (Treshold) von  $-40$  mV überschreitet. Infolge der Depolarisation kommt es zum Öffnen spannungsgesteuerter Natriumkanäle, wodurch Natriumionen entsprechend ihrem Konzentrationsgradienten in die Zelle fließen. Die Polarität des Membranpotentials wird dadurch kurzfristig bis auf etwa  $20$  mV umgekehrt. Die Natriumkanäle inaktivieren dann mit der Zeit. Eine Repolarisation der Membran wird durch den Ausfluß von Kaliumionen durch spannungsaktivierte Kaliumkanäle bewirkt (Kandel et al., 1993).

Das Auslösen eines Aktionspotentials unterliegt dem Alles-oder-Nichts-Prinzip. Ein Bruchteil einer Millisekunde kann über das Auslösen eines Aktionspotentials entscheiden. Ein Aktionspotential wird auf dem Weg zum Soma ständig wieder regeneriert. Die Amplitude am Entstehungsort ist somit die gleiche wie am Bestimmungsort. Da keine Abschwächung erfolgt, ist die Information des Signals nur durch die Frequenz der Spikes wiedergegeben. Je größer die Reizamplitude, desto höher ist die Spikefrequenz. Je länger die Reizdauer, desto länger ist die Spikefolge (burst).

Wenn das Aktionspotential die synaptische Endigung erreicht, schüttet die Zelle einen chemischen Transmitter aus, der als Übertragungssignal dient. Die ausgeschüttete Transmittermenge wird durch die Anzahl der Aktionspotentiale pro Zeiteinheit bestimmt. Der Transmitter bindet an entsprechende Rezeptoren der postsynaptischen Membran, wodurch ein postsynaptisches Potential hervorgerufen wird, das sich passiv bis zur Triggerzone ausbreitet. Exzitatorische Neuronen setzen meistens Glutamat als Transmitter frei, wodurch erregende postsynaptische Potentiale (EPSPs) entstehen, während inhibitorische Neurone meistens GABA als Transmitter haben und hemmende synaptische Signale (IPSPs) bewirken, welche die postsynaptische Zelle hyperpolarisieren und damit die Wahrscheinlichkeit für die Auslösung eines Aktionspotentials herabsetzen (Kandel et al., 1993).

Jedes Neuron empfängt erregende und hemmende Signale anderer Neuronen. Der Nettoeffekt der Inputs an jeder exzitatorischen oder inhibitorischen Synapse hängt vom Ort der Synapse, ihrer Größe sowie von der Nähe und relativen Stärke anderer erregender und hemmender Synapsen ab. Diese konkurrierenden Eingangssignale werden im postsynaptischen Neuron zu einer koordinierten Antwort verrechnet (synaptische Integration).

### 1.2.1 Synaptische Erregung durch Glutamatrezeptoren

Die Aminosäure L-Glutamat, die von primären afferenten Neuronen ausgeschüttet wird, ist der wichtigste erregende Neurotransmitter im Gehirn und Rückenmark. Man unterscheidet zwei Klassen von Glutamatrezeptoren: ionotrope Rezeptoren, die Ionenkanäle direkt steuern und metabotrope Rezeptoren, welche die Kanäle indirekt über Second-Messenger steuern.

Ionotrope Glutamatrezeptoren werden entsprechend ihrer Affinität für Strukturanaloge des Glutamats wiederum in NMDA und non-NMDA-Rezeptoren unterteilt.

Die non-NMDA-Rezeptoren können durch die Agonisten AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure), Kainat und Quisqualat aktiviert und durch die kompetitiven Antagonisten CNQX (6-Cyano-7-nitro-chinoxalin-2,3-dion) oder NBQX (6-Nitro-7-sulphamobenzoquinoxaline-2,3-dion) blockiert werden. Sie sind Kationenkanäle mit relativ niedriger Leitfähigkeit ( $<20$  pS), die für Natrium- und Kaliumionen permeabel sind. Unter Ruhebedingungen erzeugen sie den Hauptteil des EPSPs.

Der NMDA-Rezeptor hingegen wird vom Aminosäureanalogon NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) am effektivsten aktiviert und durch den kompetitiven Antagonisten APV (2-Amino-5-phosphonovaleriansäure) gehemmt. Gegenüber dem non-NMDA-Rezeptor weist er folgende Besonderheiten auf: Er ist ein Kationenkanal mit einer Leitfähigkeit von 50 pS, der sowohl für Natrium- und Kalium- als auch für Calciumionen permeabel ist. Durch den Calciumionen-Einstrom werden Calcium-abhängige Second-Messenger Kaskaden aktiviert. Calcium initiiert eine lang anhaltende Verstärkung der synaptischen Signalübertragung, indem es die Serin-Threonin-Proteinkinasen, die Calcium/Calmodulinkinase und die PKC sowie eine Tyrosinkinase aktiviert, welche dann weitere sekundäre Reaktionskaskaden anschalten, die bei manchen Formen langanhaltender synaptischer Modifikation wie z.B. LTP eine Rolle spielen.

Der NMDA-Rezeptor öffnet nur in Gegenwart des Co-Agonisten Glycin, welcher die Aktivität dieses Kanales moduliert. Glycin vergrößert die NMDA vermittelte Antwort, indem es die Öffnungswahrscheinlichkeit dieses Kanals verlängert. Ferner hat der Kanal einen spannungsabhängigen Magnesium-Block. Beim Ruhemembranpotential wird der NMDA-Rezeptorkanal bereits durch die im Extrazellulärraum vorliegende physiologische Magnesiumkonzentration im offenem Zustand blockiert. Erst durch zunehmende Depolarisation der Membran wird der Magnesium-Block entfernt, indem Magnesiumionen durch elektrostatische Abstoßung aus der Kanalpore getrieben werden. Natrium-, Kalium- und Calciumionen können dann einfließen. Infolge dessen öffnen sich weitere NMDA-aktivierte Kanäle und mehr Strom kann in die Postsynapse fließen. Der NMDA-Rezeptor steuert folglich nur zur späten Phase des EPSPs bei (Kandel et al., 1993).

### 1.2.2 Synaptische Hemmung durch Chlorid-selektive Rezeptorkanäle

GABA ist ein wichtiger inhibitorischer Transmitter im Gehirn und im Rückenmark. Er wird von inhibitorischen, GABAergen Neuronen freigesetzt, die ca. 30% aller zentralen Synapsen bilden. GABA wirkt auf zwei Rezeptoren, GABA<sub>A</sub> und GABA<sub>B</sub>.

Die Aktivierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors führt zu einem Anstieg der Chloridionen-Leitfähigkeit wodurch die postsynaptische Zelle hyperpolarisiert und die synaptische Aktivität inhibiert wird. Im allgemeinen wird durch den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ein schnelles inhibitorisches postsynaptisches Potential vermittelt, das die Impulsenstehung, die Amplitude und die Dauer eines exzitatorischen postsynaptischen Potentials und dabei besonders die NMDA-vermittelte Komponente beeinflusst. Blockierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors z. B. mit dem Kanalblocker Picrotoxin kann zu einer vollständigen Unterbindung der GABA<sub>A</sub>-IPSPs führen, indem es diesen Rezeptor in einen desensitivierten oder allosterisch geblockten Zustand versetzt. Infolge dieses Blockes werden die EPSPs nicht mehr durch die hemmenden IPSPs beeinflusst. Die Zellen zeigen dadurch stark erhöhte synaptische Aktivität.

Der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor hingegen ist metabotrop und aktiviert eine Second-Messenger Kaskade, die ihrerseits einen Kaliumkanal aktiviert.

### 1.3 Synaptische Plastizität

Plastische Veränderungen finden besonders in der frühen Phase der Entwicklung statt. Zu diesem Zeitpunkt werden synaptische Verbindungen zunächst im Überschuß angelegt und grob miteinander verknüpft. Diese Prozesse sind weitestgehend aktivitätsunabhängig. Eine Feinregulierung der synaptischen Kontakte erfolgt erst in der kritischen Phase der Entwicklung. In dieser Phase kommt es zu Umstrukturierungen (Remodelling) der synaptischen Verbindungen, bei denen wichtige synaptische Verbindungen gestärkt und unbrauchbare eliminiert werden. Dieses Remodelling erfolgt, wie die lebenslange Regulation der Effektivität der Synapsen, in Abhängigkeit von Aktivität und Erfahrung.

Die Vorstellung, daß Neurone in der Lage sind, ihre Struktur (Morphologie) und ihr Verschaltungsmuster zu modifizieren geht auf Ramon y Cajal (1906) zurück. Cajal nahm an, daß die Komplexität des neuronalen Netzwerkes und die Organisation der synaptischen Verbindungen essentielle Komponenten sind, welche die Funktionalität unseres Gehirns bedingen. Des weiteren wies er daraufhin, daß möglicherweise diese Plastizität des neuronalen Netzwerkes, das Remodelling synaptischer Verbindungen, mit komplexen Funktionen wie Lernen verbunden sein könnte. Diese Hypothese ist bislang nicht verworfen worden. Es liegen zahlreiche Evidenzen vor, daß aktivitätsabhängige Prozesse wie Lernen und Gedächtnis mit Veränderungen in der synaptischen Ultrastruktur verbunden sind. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, daß plastische Veränderungen durch exogene Einflüsse oder individuelle Lernprozesse bewirkt werden können. Morphologische Veränderungen wurden z.B. nach Aufzucht von Tieren in komplexer Umgebung (Diamond et al., 1975; Greenough et al., 1978;

Sirevaag und Greenough, 1985; West und Greenough, 1972), nach visuellem Training (Vrensen und Nunez Cardozo; 1981) sowie nach Läsionen (Nieto-Sampedro et al., 1982) oder nach Kindling (einem Plastizitätsparadigma, das in Zusammenhang mit Epilepsie-Entstehung diskutiert wird; Geinisman et al., 1989) aber auch in Abhängigkeit vom Alter (Dyson und Jones, 1984; Greenough et al., 1987; Harris et al., 1992; Markus et al., 1987) beobachtet.

### 1.3.1 Perforierte Synapsen

Ein sehr interessantes morphologisches Phänomen dieser Untersuchungen, das mit Plastizität in Verbindung gebracht wird, ist das Auftreten von sogenannten *perforierten Synapsen*.

Betrachtet man eine PSD im Querschnitt, so liegt normalerweise eine durchgehende Scheibe vor. Perforierte Synapsen hingegen weisen diverse Formen von Unterbrechungen in der PSD auf (Geinisman et al., 1993). Die PSD hat entweder die Form eines Hufeisens, ist in mehrere separate Abschnitte untergliedert oder weist ein oder mehrere Löcher in der Mitte auf (s. Abbildung 4).



Abbildung 4: Formen perforierter PSDs nach Geinisman et al. (1993)

Die Perforation ist nicht nur postsynaptisch, sondern erstreckt sich auch auf die Präsynapse. Dort fehlen an den perforierten Stellen das präsynaptische Grid und die Vesikel (Vrensen et al., 1980, 1981).

Perforierte Synapsen wurden lange Zeit einfach ignoriert, da man sie anfangs für Artefakte hielt. Erst 1969 veröffentlichten Peters und Kaiserman-Abramof die erste Beschreibung perforierter PSDs. In dieser detaillierten elektronenmikroskopischen Untersuchung rekonstruierten sie Synapsen mit Hilfe von Serienschnitten und stellten fest, daß alle Synapsen, die größer als 250 nm im Durchmesser sind, perforiert sind. Man nahm daher an, daß Perforationen zur Vergrößerung der PSD und somit der gesamten aktiven Zone dienen könnten und daß perforierte Synapsen dadurch effizientere Synapsen sein könnten (Peters und Kaiserman-Abramof, 1969; Vrensen und Nunes Cardozo, 1981; Sirevaag und Greenough, 1985).

Diverse Gruppen nahmen an, daß perforierte Synapsen ein Indiz für das synaptische Remodelling bzw. eine Zwischenstufe in einem Prozeß zur Bildung neuer Synapsen wären. Es wur-

den daraufhin Modelle entwickelt, die versuchten das Phänomen der perforierten Synapsen zu erklären. Einige Gruppen vertraten die Ansicht, daß perforierte Synapsen aus nicht perforierten Synapsen entstehen, indem sich die nicht-perforierten Synapsen vergrößern, perforiert werden und sich dann in zwei neue nicht-perforierte Synapsen teilen (Nietro-Sampedro et al., 1982, Carlin und Siekevitz, 1983; Dyson und Jones, 1984; Petit, 1988; Geinisman et al., 1991). Andere hingegen stützen die Hypothese, daß perforierte Synapsen eine eigenständige Population wären (Itarat und Jones, 1992, 1993; Jones, 1993).

Die Frage ob perforierte Synapsen einen eigenständigen Subtyp repräsentieren oder lediglich Intermediate des synaptischen Remodellings darstellen ist immer noch Gegenstand intensiver Diskussionen. Wie über die Mechanismen der Entstehung wird auch über die Funktion dieser Synapsen noch spekuliert.

### **1.3.2 Hippocampus und LTP**

Da die Feinregulierung synaptischer Kontakte in der kritischen Phase der Entwicklung, die natürlichen Regenerationsprozesse und erfahrungsabhängige Vorgänge in Abhängigkeit neuronaler Aktivität geschehen, wurden in letzter Zeit plastische Veränderungen in Abhängigkeit von Aktivität untersucht. Das vorherrschende Modell für aktivitätsabhängige synaptische Plastizität im Gehirn ist die Langzeitpotenzierung (long-term potentiation, LTP). LTP ist ein Grundbaustein für das heutige Modell für Lernen und Gedächtnis. Sie ist eine lang anhaltende Form der synaptischen Plastizität, die durch kurze, repetitive präsynaptische Stimuli hervorgerufen wird und mit einem Anstieg der Effizienz der synaptischen Übertragung verbunden ist. Bereits Hebb et al. (1949) postulierten, daß Informationen in unserem Gehirn als aktivitätsabhängige Veränderungen in der synaptischen Effizienz gespeichert werden.

LTP wurde als erstes im Hippocampus (Bliss und Lomo, 1973) und später in anderen Hirnregionen beschrieben. Man nimmt an, daß der Hippocampus eine Art Kurzzeitspeicher für Inhalte des Langzeitgedächtnis darstellt. Er ist wahrscheinlich für die Verknüpfung von Informationen, die aus verschiedenen Cortexregionen kommen verantwortlich. Insbesondere spielt er eine wichtige Rolle beim räumlichen und zeitlichen Gedächtnis, z.B. bei der Verbindung von Informationen über Objekte und deren Platz in der räumlichen Umgebung oder von Personen und der Zuteilung der entsprechenden Namen. Verletzungen des Hippocampus infolge von Läsionen führen zur Störung bei der Abspeicherung neuer Informationen. Insbesondere das explizite Lernen ist beeinträchtigt. Erinnerungen an länger zurückliegende Episoden stellen bei den betroffenen Personen keine Schwierigkeit dar (Shepherd, 1990; Kandel et al., 1993).

Der Hippocampus ist eine Struktur der Großhirnrinde (Telencephalon). Er besteht aus dem Ammonshorn und dem Gyrus dentatus. Der Hippocampus besitzt drei wichtige afferente Verbindungswege, die vom entorhinalen Cortex bis in die CA1-Region reichen (CA von Cornu Ammonis, s. Abbildung 5 verändert nach Sheperd, 1990).

Der Tractus perforans entspringt aus dem entorhinalen Cortex, seine Axone enden auf den Körnerzellen im Hilus des Gyrus dentatus. Die Axone dieser Körnerzellen, die Moosfasern, bilden ihrerseits ein Faserbündel und laufen zu den Pyramidenzellen in der CA3-Region. Aus diesen entspringen wiederum erregende Axonkollateralen, die Schaffer-Kollateralen, welche auf die apikalen Dendriten der CA1-Neurone projizieren. Die Axone der CA1-Zellen ziehen zum Subiculum, von wo aus dann die Signale zurück in den entorhinalen Cortex gelangen.

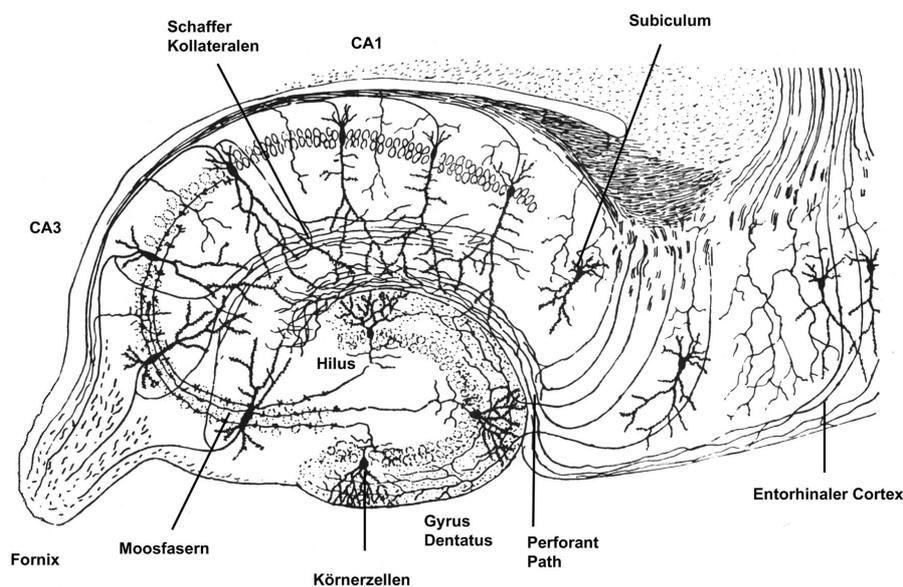


Abbildung 5: Aufbau des Hippocampus (modifiziert nach Roman y Cajal, 1906). Der Hippocampus kann in verschiedene Regionen unterteilt werden. Die CA1- und CA3-Region stellen die eigentliche Hippocampusformation dar. Die großen CA3-Pyramidenzellen projizieren über die Schafferkollateralen zu den CA1-Pyramidenzellen. Die Körnerzellen des Gyrus dentatus sind über die Moosfasern mit der CA3-Region verbunden.

Eine kurze hochfrequente Salve von Impulsen auf eines dieser drei Axonkollateralen erhöht die exzitatorischen postsynaptischen Signale der entsprechenden Neurone. Diese Verstärkung (LTP) kann an Hirngewebeschnitten (Slice) über mehrere Stunden, beim intakten Tier über Tage und sogar Wochen elektrophysiologisch mit der Patch-Clamp Technik nachgewiesen werden. Plastische Veränderungen können folglich nicht nur anatomisch sondern auch bio-

chemisch oder elektrophysiologisch sein. Sie können natürlich bedingt sein oder experimentell hervorgerufen werden.

Langanhaltende Potenzierung kann auch durch Applikation von Chemikalien wie z.B. Calcium (Turner et al., 1982), Arachidonsäure (Williams et al., 1989), den metabotropen Glutamat-Rezeptor Agonisten Aminocyclopentan-1S,3R-dicarboxylat (1S,3R-ACPD; Bortolotto und Collingridge, 1993) und dem Kaliumkanalblocker Tetraethylammonium (TEA; Aniksztejn und Ben-Ari, 1991) sowie Magnesium-freies Medium mit erhöhter Calciumkonzentration (Hosokawa et al., 1995) als auch Picrotoxin (Collin et al., 1997) erzielt werden. Nach Behandlung mit diesen Chemikalien kann mittels tetanischer Reizung kein LTP mehr erzeugt werden. Die Mechanismen chemisch induzierter Potenzierung scheinen mit denen der tetanischen zu konvergieren (Bliss und Collingridge, 1993).

### **1.3.3 Morphologische Korrelate aktivitätsabhängiger synaptischer Plastizität**

In den meisten Untersuchungen nach LTP-Induktion wurden Veränderungen in der Spine-morphologie (Fifkova, 1975; Fifkova und Anderson, 1981; Desmond und Levy, 1983, 1986a/b, 1988, 1990; Lee et al., 1980; Chang und Greenough, 1984; Hosokawa et al., 1995) oder in der PSD festgestellt. Es zeigte sich, daß in Abhängigkeit von Aktivität die Fläche der PSD zunahm (Desmond und Levy, 1983, 1986a/b, 1988). Ebenso beobachteten Geinisman (1991, 1993, 1996) und Buchs und Müller (1996), daß LTP-Induktion der Schaffer-Kollateralen mit einer Zunahme an perforierten Synapsen verbunden ist.

Die Häufigkeit perforierter Synapsen scheint somit nach natürlich oder künstlich auferlegten Bedingungen, die eine hohe neuronale Aktivität zur Folge haben, zu steigen. Es liegt somit die Vermutung nahe, daß in bestimmten Arealen des ZNS aktivitätsabhängige Änderungen der synaptischen Effizienz mit Veränderungen der Ultrastruktur korrelieren.

### **1.3.4 Mögliche Mechanismen synaptischer Plastizität**

Die Mechanismen, durch welche aktivitätsabhängige Plastizität vermittelt werden könnte, sind noch nicht aufgeklärt. Es liegen aber zahlreiche Hinweise vor, daß der NMDA-Rezeptor und die Serinprotease tPA (tissue plasminogen activator) an diesen Mechanismen beteiligt sein könnten.

### 1.3.4.1 NMDA-Rezeptor

Eine wichtige Funktion bei den Mechanismen des synaptischen Remodelling und der Bildung perforierter Synapsen könnte der NMDA-Rezeptor innehaben, denn die Tatsache, daß dieser Kanal sowohl spannungssensitiv, Calciumionen-durchlässig ist als auch die simultane Bindung von Glycin und Glutamat erfordert macht ihn zu einem interessanten Kandidaten in Hinblick auf plastische Prozesse. Denn wie für die Induktion von LTP sind auch bei diesem Kanal kooperative, assoziative und Input-spezifische Vorgänge zur Aktivierung erforderlich (Bliss und Collingridge, 1993). In der Tat liegen mehrere Hinweise vor, daß der NMDA-Rezeptor an den Prozessen neuronaler Plastizität z.B. bei der Induktion von LTP (Artola und Singer, 1987; Collingridge et al., 1993; Harris et al. 1984), bei Kindling (Peterson et al., 1984; Slater et al., 1985), bei der Konsolidierung monokularer Deprivationseffekte (Kleinschmidt, 1987; Rauschecker et al., 1990) und bei räumlichen Lernen (Morris et al., 1996) beteiligt ist. Dafür spricht auch die Tatsache, daß gerade in der frühen Entwicklung, zu einem Zeitpunkt wo viele synaptische Auf- und Umbauprozesse stattfinden, die NMDA-Rezeptor-Aktivität sehr hoch ist (Markus et al., 1987).

In vitro Experimente haben gezeigt, daß durch die alleinige Aktivierung des NMDA-Rezeptors die Ausbildung von Neuriten gefördert wird (Pearce et al., 1987). Ebenso wurde gefunden, daß in Ratten 1-2 Stunden nach NMDA-Injektion, die PSD-Länge und die Synapsendichte zunimmt (Brooks et al., 1991). Diese Untersuchungen zeigen, daß NMDA-Rezeptoren an der Veränderung der synaptischen Ultrastruktur und an der Formierung neuer Synapsen beteiligt sind und weisen erneut auf die Relevanz des NMDA-Rezeptors bei den Mechanismen struktureller Plastizität hin.

### 1.3.4.2 Proteasen und aktivitätsabhängige synaptische Plastizität

Möglicherweise könnten extrazellulär agierende Proteasen wie z.B. der gewebespezifische Plasminogen Aktivator (tPA) an Strukturveränderungen im ZNS beteiligt sein. Denn tPA bewirkt (wie bei der Blutgerinnung) die Aktivierung des Zymogens Plasminogen zur aktiven Protease Plasmin. Plasmin ist wiederum in der Lage, Moleküle der extrazellulären Matrix wie z.B. Fibronektin und Laminin zu schneiden. Da tPA in Wachstumskegeln kultivierter Neurone nachgewiesen worden ist (Krystosek und Seeds, 1981a/b) und diese für das Auswachsen von Neuriten von zentraler Bedeutung sind, liegt es nahe, daß das Plasminogen-Aktivator/Plasmin-System eine Degradation der extrazellulären Matrix bewirkt und dadurch bestimmte Wachstumsprozesse wie z.B. die Neuritenelongation ermöglicht (Pittman et al., 1985; Pittman und Buettner, 1989). Ebenso konnte gezeigt werden, daß tPA eine wichtige

Rolle beim Axonwachstum und der Bildung von glutamatergen Synapsen spielt (Baranes et al., 1998). tPA wäre somit ein wichtiges Molekül, das an der Regulation der neuronalen Entwicklung und an der Modulation der neuronalen Architektur beteiligt sein könnte (Gualandris et al., 1996).

Ferner vermutet man, daß tPA auch eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität in Kontext mit Lernen und Gedächtnis spielt, da die zelluläre Freisetzung von tPA aktivitätsabhängig ist (Gualandris et al., 1996) und eine Korrelation zwischen LTP und der verstärkten Expression von tPA im Hippocampus der Ratte nachgewiesen werden konnte. Qian et al. (1993) demonstrierten, daß nach Induktion von LTP im Tractus perforans die mRNA für tPA in den Körnerzellen des Gyrus dentatus ansteigt. Ebenso wurde herausgefunden, daß tPA-Knockout Mäuse keine langanhaltende Schaffer-Kollateralen-LTP haben und Lerndefizite aufweisen (Frey et al., 1996; Huang et al., 1996).

Diese Tatsachen machen tPA somit zu einem interessanten Kandidaten beim Studium der aktivitätsabhängigen synaptischen Plastizität.

## 1.4 Ziel dieser Arbeit

Mit dieser Arbeit sollen grundlegende Fragen zur aktivitätsabhängigen Plastizität exzitatorischer Neurone beantwortet werden. Wie in der Einführung dargelegt, gibt es einige Hinweise dafür, daß Neurone in Abhängigkeit von Aktivität ihre Ultrastruktur verändern. Eine Struktur, der im Kontext der Plastizität eine besondere Bedeutung zukommt, ist die perforierte Synapse. Da man perforierte Synapsen lange Zeit für Artefakte gehalten hat, ist bislang nur wenig über die Funktion und die Mechanismen der Entstehung bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Funktion und die Entstehung perforierter Synapsen zu untersuchen. In diesem Kontext sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- a) Werden synaptische Verbindungen in ihrer Ultrastruktur aktivitätsabhängig verändert? Korreliert diese Veränderung mit der Effektivität der synaptischen Übertragung und mit der Stimulationsdauer?
- b) Welche Rolle spielen perforierte Synapsen in der aktivitätsabhängigen synaptischen Plastizität?
- c) Sind NMDA-Rezeptoren an der Formierung perforierter Synapsen involviert?
- d) Ist tPA an den Mechanismen aktivitätsabhängiger synaptischer Plastizität beteiligt?

### 1.4.1 Vorgehensweise

Um Antworten auf diese komplexen Fragen zu finden, sollen exzitatorische Synapsen in einem zweidimensionalen Zellkultursystem untersucht werden. Die Experimente sollen an dissoziierten hippocampalen Neuronen der postnatalen Ratte durchgeführt werden. Der Hippocampus bietet sich für diese Untersuchung an, da diese Neurone, wie bereits in Studien zur Langzeitpotenzierung gezeigt werden konnte, die erforderliche Plastizität aufweisen. Des Weiteren gibt es Hinweise, daß im Hippocampus Struktur/Funktionsbeziehungen für die Speicherung expliziter Gedächtnisinhalte eine Rolle spielen könnten.

Ein Zellkultursystem zur Beantwortung dieser Fragen bietet viele Vorteile, da es einfacher ist, Zusammenhänge in einer reduzierten Umgebung, als im komplexen Gewebe zu untersuchen. Ferner können aufgrund der guten Zugänglichkeit dieses Systems sowohl definierte elektrophysiologische als auch pharmakologische und immunozytochemische Untersuchungen durchgeführt werden. Studien an Zellkulturen haben gezeigt, daß die Prinzipien der Zelldifferenzierung, der Synaptogenese und die synaptische Übertragung erhalten bleiben (Bartlett und Banker, 1984a/b; Papa et al., 1995). Einzelne Faktoren, welche einen Einfluß auf die Morphologie und Effektivität der synaptischen Übertragung haben könnten, können somit genau

untersucht werden. Daher bietet dieses reduzierte zweidimensionale Netzwerk ein ideales Modell zum Studium der synaptischen Plastizität.

Zu Beginn dieser Arbeit gilt es, dieses System im Labor zu etablieren und es hinsichtlich seiner Funktionalität (immunzytochemisch auf die Expression charakteristischer Markerproteine und elektrophysiologisch auf die Spontanaktivität) zu überprüfen. Die immunzytochemischen Untersuchungen werden mit einem konfokalen Lasermikroskop durchgeführt. Für die elektrophysiologische Untersuchungen wird die Patch-Clamp Technik angewendet. Sie ermöglicht die direkte Messung von Ionenströmen und somit der synaptischen Aktivität über die Membranen lebender Zellen.

Um zu untersuchen, ob in der Zellkultur die synaptische Ultrastruktur exzitatorischer Neurone in Abhängigkeit von der Netzwerkaktivität moduliert wird, wird die synaptische Aktivität in diesem System durch direkte Applikation von Pharmaka in verschiedenen Versuchen global erhöht oder inhibiert. Zur Erhöhung der synaptischen Aktivität soll der GABA<sub>A</sub>-Rezeptorkanal, durch den Antagonisten Picrotoxin blockiert werden. Um Aussagen über das Ausmaß plastischer Veränderungen in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer machen zu können, sollen sowohl Kurz- als auch Langzeitstimulationen durchgeführt werden.

Zur Inhibition der synaptischen Aktivität wird Tetrodotoxin (TTX) verwendet, welches selektiv die spannungsgesteuerten Natriumkanäle blockiert. Sind die Natriumkanäle soweit geblockt, daß die Amplitude des präsynaptischen Potentials unter -40 mV sinkt, kann kein Aktionspotential mehr am Axonhügel ausgelöst werden. Somit werden auch keine Transmitter mehr ausgeschüttet und es entstehen in der Postsynapse keine EPSPs mehr.

Um mögliche, an der synaptischen Plastizität involvierte Mechanismen herauszufinden, soll sowohl die Beteiligung des NMDA-Rezeptorkanals sowie die der Serinprotease tPA überprüft werden. Der NMDA-Rezeptor soll mit dem kompetitiven Antagonisten APV und tPA durch den kompetitiven Inhibitor tPA-stop (2,7-bis-(4-Amidinobenzyliden)-cycloheptan-1-one)dihydrochlorid) oder das Zymogen Plasminogen durch den Plasminogen-Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) geblockt werden.

Die Ultrastruktur erregender Synapsen soll infolge dieser unterschiedlichen Behandlungen mit Hilfe des Elektronenmikroskopes untersucht werden. Die Wirkung dieser Pharmaka auf die Aktivität der Neurone soll mit der Patch-Clamp Technik gemessen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

In Anlehnung an Huettner und Baughman (1996) wurde ein Protokoll zur Kultivierung primärer hippocampaler Neurone aus der postnatalen Ratte etabliert. Bei diesen Kulturen handelte es sich um Mischkulturen, bei denen sowohl Neurone als auch Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia) kultiviert wurden. Zur Präparation dieser Primärkulturen wurden 1-3 Tage alte (P1-3) Wistar Ratten aus der Tierhaltung des Universität-Krankenhauses Eppendorf verwendet.

Da Primärzellen in Bezug auf die Kultivierungsbedingungen erheblich anspruchsvoller als Zelllinien sind, wurden die *in vitro* Kulturparameter wie z. B. das Substrat, auf dem die Zellen wachsen, das Medium in dem sie kultiviert werden und die Temperatur, den in *in vivo* herrschenden Bedingungen soweit wie möglich angepaßt.

#### 2.1.1 Beschichtung der Coverslips

Die Zellen wurden auf Glasdeckgläsern von 12 mm Durchmesser kultiviert. Um das Anhaften und Anwachsen der Zellen auf diesen Deckgläsern zu ermöglichen, wurden diese mit Proteinen (Poly-L-Lysin, Fibronectin oder Laminin, s. 6.1.1), die auch *in vivo* in der Extrazellulärmatrix der Neurone vorkommen, beschichtet (Durchführung s. 6.1.2; Material und Geräte s. 6.1.7).

#### 2.1.2 Medien für die Zellkultur

Ein Zellkulturmedium besteht aus einem isotonisch gepufferten Grundnährmedium mit anorganischen Salzen, energieliefernden Nährstoffen, Aminosäuren und verschiedenen Zusatzstoffen, die für das Wachstum und Überleben der Zellen notwendig sind.

Um für die Neurone optimale Kulturbedingungen zu schaffen, wurden unterschiedlich angereicherte Medien verwendet (s. 6.1.3-5). Zum Ausplattieren der Neurone wurde Plating-Medium verwendet. Grundlage dieses Mediums war das Minimal Essential Medium (MEM), das mit Pferdeserum und Glucose angereichert wurde. Glucose ist für die Energiezufuhr der Zellen essentiell. Das Serum hingegen ist besonders für das Wachstum und die Proliferation der Gliazellen wichtig. Es enthält eine Vielzahl von Stoffen wie z.B. Polypeptide, Hormone, Lipide, Spurenelemente. Die genaue Zusammensetzung des tierischen Serums ist nicht vollständig bekannt. Da die Inhaltsstoffe jeder Charge verschieden sind, wurde eine ausgetestete

Charge reserviert und durchgehend verwendet, um Unregelmäßigkeiten in den Kultivierungsbedingungen zu verhindern.

Zum Auswachsen der Neurone in den ersten drei Tagen wurde Neuronenmedium verwendet. Neuronenmedium ist ein serumfreies MEM, das mit Glucose, Transferrin, Insulin, Progesteron, Putrescin, Natriumselenit, Natriumpyruvat und Ovalbumin (Hühnereiklar) angereichert ist, um eine optimale Versorgung der Neurone zu gewährleisten (s. 6.1.5). Zur Vermeidung übermäßiger Gliaproliferation, wurde diesem Medium kein Serum zugesetzt.

Für die weitere Kultivierung wurde Neuronenmedium mit 1- $\beta$ -D-Arabinofuranosyl-Cytosin-Hydrochlorid (AraC) versetzt. AraC ist ein Cytosin Analogon, das die DNA-Polymerase blockiert und dadurch die Zellteilung proliferationsfähiger Zellen (Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia etc.) unterbindet. Dadurch wurde ein frühzeitiges Absterben der Neurone durch Gliaüberwucherung verhindert.

### **2.1.3 Präparation/Kultivierung der Neurone**

Für jede Präparation wurden 10 postnatale Ratten (P1-3) verwendet (Durchführung s. 6.1.6). Die Zellen wurden auf die Coverslips mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert und in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Drei Stunden nach dem Ausplattieren wurde die Hälfte des Mediums gegen normales Neuronenmedium ausgetauscht. Nach drei Tagen der Kultivierung wurde AraC-haltiges Wachstumsmedium verwendet, um die Gliaproliferation zu unterbinden. Anschließend wurde das Medium alle 3-4 Tage erneuert.

Die Neurone wurden nach 12 Tagen in Kultur (days in culture, DIC) für die Experimente verwendet, da Untersuchungen gezeigt haben, daß die Zellen ab diesem Zeitpunkt bereits nahezu vollständig ausdifferenziert sind (Bartlett und Banker, 1984a/b).

## **2.2 Lichtmikroskopie**

Lichtmikroskopische Aufnahmen der Kulturen wurden mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop, welches mit einer JVC 3-CCD Kamera versehen ist aufgenommen. Zur digitalen Bildaufnahme wurde das Capture Tiff Programm der Firma Matrox verwendet. Die Bilder wurden anschließend mit den Programmen Adobe Photoshop und Macromedia Freehand weiter bearbeitet.

### 2.3 Immuncytochemie

Die Immuncytochemie ist eine Methode zum Nachweis bzw. zur zellulären Lokalisation chemischer Botenstoffe, niedermolekularer Transmitter und neuroaktiver Peptide mittels spezifischer Antikörper.

Die Zellen wurden zunächst mit Paraformaldehyd fixiert. Paraformaldehyd als Fixativ reagiert mit den Aminogruppen von Proteinen und Aminolipiden. Es gewährleistet aber im Gegensatz zu Glutaraldehyd, das meistens bei der Elektronenmikroskopie zur Fixierung verwendet wird, eine bessere Erhaltung vieler Zellfunktionen, wie z.B. enzymatische Aktivitäten und antigene Eigenschaften (Sabatini et al., 1963). Um die Antikörper-Antigen-Bindung zu verbessern, wurden die Zellen dann in Natriumborhydridlösung inkubiert und zur Permeabilisierung der Membranen durch eine Ethanolreihe gezogen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit einer Blockerlösung abgesättigt. In einer primären Antikörperreaktion erfolgte die Immunreaktion mit dem Substrat. Durch eine sekundäre Reaktion wurde ein Fluorochrom konjugierter Antikörper an den Primärantikörper gebunden (Durchführung: s. 6.2.3; Material und Geräte s. 6.2.4). Die Antikörperfärbungen wurden anschließend mit einem Leica TCS NT konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Die Fluorochrome wurden bei verschiedenen Wellenlängen durch einen Argon/Krypton-Laser angeregt (s. Tabelle 1).

Fluorochrome	Anregung (nm)	Emission (nm)
Lucifer Yellow	466, 488	528 (grün)
Cy2	488	528 (grün)
Cy3	568	628 (rot)
Cy5, TOTO	640	705 (blau)

Tabelle1: zeigt die Anregungs- und Emissionwellenlängen der verwendeten Fluorochrome.

Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluorochrome konnten am Konfokalen maximal drei Immunreaktionen parallel durchgeführt werden. Die emittierten Wellenlängen konnten auf getrennten Kanälen aufgenommen und anschließend vom TCS-Programm (Leica) als Overlay dargestellt werden. Die Aufnahmen wurden bei 10 und 20-facher Vergrößerung mit Neofluar Objektiven (Leica) oder bei 40 und 63-facher Vergrößerung mit Neofluar oil Objektiven der Firma Leica gemacht.

Es wurden entweder 8 oder 16 Schnitte durch das Präparat gelegt, die wiederum 8 mal gescannt wurden. Anschließend wurden die Bilder mit den Programmen Adobe Photoshop und Macromedia Freehand bearbeitet und beschriftet.

### 2.3.1 Lucifer Yellow/Synaptophysinfärbung

Zur Überprüfung der Morphologie und der Synaptogenese wurden 12 Tage alte Hippocampusneurone mit Lucifer Yellow gefüllt und mit Antikörpern gegen das in der Vesikelmembran enthaltene Protein Synaptophysin inkubiert.

Um Zellen mit Lucifer Yellow zu füllen, wurde das Patch-Clamp Verfahren (s. 2.5) angewendet. Es wurden relativ große Mikropipetten mit einem Widerstand von 2-3 M $\Omega$  verwendet. Die Zellen wurden jeweils im Whole-Cell Modus in der Voltage-Clamp Konfiguration 10-15 Minuten lang gefüllt. Die Qualität der Füllung wurde durch Beobachtung der Fluoreszenzintensität der Zelle verfolgt. Die Pipette wurde nach Abschluß der Füllung langsam aus dem Soma herausgefahren. Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Für die Immuncytochemie (s. 6.2) wurden ein Maus anti-Synaptophysin und ein anti-Maus Cy3 konjugierter Antikörper verwendet (Antikörper, s. 6.2.2; Durchführung s. 6.2.3).

### 2.3.2 Neuronen/Gliaverhältnis

Ein ausgewogenes Neuronen/Gliaverhältnis ist in der Kultur für das Überleben und Wachstum der Neurone wichtig. Bei einem zu hohem Gliaanteil werden die Neurone von Gliazellen überwuchert und sterben demzufolge ab. Ein zu geringer Gliaanteil führt zu einer Subversorgung der Neurone, wodurch das Wachstum stark beeinträchtigt wird. Daher wurde zu Beginn der Experimente das Neuronen/Gliaverhältnis in der Kultur nach 1, 4, 6, 8, 12 und 14 Tagen immuncytochemisch bestimmt.

Die Gliazellen wurden mit einem Maus anti-GFAP Antikörper und einem anti-Maus Cy2 konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen. GFAP (glia fibrillary associated protein) ist ein Glia spezifisches Protein. Neurone wurden mit einem Antikörper gegen das Tubuli-assoziierte Protein Tau (Rabbit anti-tau) und einem anti-Rabbit Cy3 konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen (s. 6.2.2). Zusätzlich wurde eine Kernfärbung mit Toto durchgeführt (Durchführung s. 6.2.3). Am konfokalen Lasermikroskop wurden von den verschiedenen Proben jeweils 10 Bilder bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen und das Verhältnis von Neuronen zu Gliazellen ausgezählt.

### 2.3.3 Verhältnis exzitatorischer/inhibitorischer Neurone

Da in den folgenden Experimenten nur exzitatorische Synapsen untersucht werden sollten, wurde das Verhältnis inhibitorischer zu exzitatorischer Neuronen in der Kultur immuncytochemisch untersucht.

Inhibitorische Neurone wurden mit den Antikörpern Rabbit anti-GAD und anti-Rabbit konjugiert mit Cy3 nachgewiesen. Das Enzym Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) decarboxyliert Glutamat bzw. Glutaminsäure zu  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), den vorherrschenden Transmitter der inhibitorischen (GABAergen) Neurone. Die exzitatorischen, GABA-negativen Neurone, wurden mit Maus anti-MAP2, einem Antikörper gegen das neuronale Protein MAP 2 (microfibrillary associated protein 2), und einem anti-Maus Cy2 konjugierten Antikörper detektiert (Durchführung s. 6.2.3). Es wurden 20 Bilder bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Auf jedem Bild wurde die Anzahl der GABA-positiven und -negativen Neurone gezählt und das Verhältnis dieser Zellen zueinander bestimmt.

## 2.4 Elektronenmikroskopie

### 2.4.1 Das Elektronenmikroskop

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Synapsen wurden am hochauflösenden Transmissionselektronenmikroskop (TEM) CEM 902 A der Firma Zeiss durchgeführt. Mit diesem TEM wird eine Auflösung von 0.344 nm (1000-fach größer als beim Lichtmikroskop) erreicht.

Der Aufbau eines TEMs ist dem eines Lichtmikroskopes analog. Es besteht aus einer Strahlungsquelle, magnetischen Linsen, einem fluoreszierenden Leuchtschirm, sowie einem Vakuum- und Kühlsystem. Der Hauptunterschied zum Lichtmikroskop liegt in der Verwendung von Elektronen als Strahlungsquelle. Elektronen haben eine wesentlich geringere Wellenlänge als sichtbares Licht, wodurch eine erheblich höhere Auflösung erreicht wird.

Nach de Broglie und Abbe ist das Auflösungsvermögen, von Linsenfehlern abgesehen, durch die Wellenlänge begrenzt, die sowohl von der Geschwindigkeit als auch von der Masse der Energiequelle abhängig ist. Die Wellenlängen des sichtbaren Lichts liegen zwischen 400-800 nm, die eines Elektrons bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV bei ca. 0.004 nm. Das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskopes liegt daher bei ca. 0.2  $\mu$ m, das eines TEMs bei ca. 0.2 nm. Aufgrund von Linsenfehlern, insbesondere der sphärischen Aberration (s.u.) ist das Auflösungsvermögen eines TEMs nur um den Faktor 1000 und nicht um den theoretischen Faktor von 100000 verbessert.

Die Strahlungsquelle: Das Filament bzw. die Kathode besteht aus einem V-förmigen Wolframfaden mit ca. 0.1 mm Durchmesser. Durch Anlegen einer geringen Potentialdifferenz zwischen den Fadenanschlüssen fließt ein Strom durch den Wolframfaden und es kommt aufgrund des elektrischen Widerstandes zum Aufheizen des Drahtes. Dieser Strom wird daher als Heizstrom bezeichnet. Ein optimaler Heizstrom liegt bei 2600 K. Übersättigung durch eine

Temperaturzunahme um 200 K über die Sättigungstemperatur führt zu einer drastischen Abnahme der Filamentlebensdauer. Durch Glühemission an der Fadenspitze werden die Elektronen in alle Richtungen emittiert. Verbindet man die Glühkathode mit dem negativen Pol und die Anode mit dem positiven Pol einer Gleichspannungsquelle, werden die aus der Kathode austretenden Elektronen in dem so erzeugtem elektrischen Feld zur Anode hin beschleunigt. Es entsteht ein Strom, der als Anodenstrom bezeichnet wird. Seine Stärke ist unter anderem von der zwischen Kathode und Anode bestehenden Spannung (Anoden- bzw. Beschleunigungsspannung) abhängig. Mit wachsender Anodenspannung wächst auch der Anodenstrom bis zu einem von der Temperatur der Kathode abhängigen Maximalwert, der als Sättigungswert bezeichnet wird. Es wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 80 kV gearbeitet.

Die emittierten Elektronen werden durch den sogenannten Wehneltzylinder, der die Kathode umgibt, gebündelt. Dieser wird auf einem zum Faden negativen Potential von mehreren hundert Volt gehalten. Der Zylinder wirkt auf die Elektronen abstoßend und fungiert als elektrostatische Linse, welche die Elektronen vor der Anode im Strahlkreuzungspunkt (Crossover) konzentriert. Die Elektronen, die durch die zentrale Öffnung der Anode strömen, bilden den Elektronenstrahl (Flegler et al., 1993; Plattner und Zingsheim, 1987).

Elektromagnetische Linsen: Eine elektromagnetische Linse besteht aus einer Spule mit mehreren Drahtwindungen. Strom, der durch diese Spule fließt induziert ein Magnetfeld, das die Elektronen ablenkt. Die Spule ist außen vollständig mit Eisen umgeben. Der Innenraum ist bis auf einen kleinen Spalt ebenfalls mit Eisen abgeschirmt. In diesem Spalt wird das elektrische Feld konzentriert. Die Elektronen durchlaufen die Magnetspule auf einer helikalen Bahn.

Alle elektromagnetischen Linsen werden durch Änderung des Stromes gesteuert bzw. fokussiert. Ein stärkerer Strom führt zu einer kürzeren Brennweite, wodurch die Kraft der Linse steigt. Die bei optischen Linsen geltenden Gesetzmäßigkeiten lassen sich auch auf die elektromagnetischen übertragen (Flegler et al., 1993).

Linsenfehler: Durch eine Anzahl von Linsenfehlern kann die Auflösung herabgesetzt werden. Die am häufigsten auftretenden Linsenfehler sind der Astigmatismus, die chromatische und die sphärische Aberration. Der Astigmatismus entsteht dadurch, daß die Stärke des Linsenfeldes nicht symmetrisch ist. Die Bilder werden entsprechend verzerrt. Die chromatische Aberration resultiert daraus, daß elektromagnetische Strahlung mit verschiedenen Energieniveaus unterschiedliche Wellenlängen hat. Energiereichere Elektronen mit kürzeren Wellenlängen haben einen anderen Brennpunkt als langwelligere Elektronen. Sie werden daher nicht in einem Punkt fokussiert, wodurch die Auflösung herabgesetzt wird. Es muß deshalb ein gutes Vakuum und eine gleichmäßige Beschleunigungsspannung anliegen. Besonders dickere Prä-

parate weisen ein heterogeneres Energiespektrum auf. Bei der sphärischen Aberration werden periphere Strahlen stärker gebrochen als innere. Dadurch kommt es ebenfalls zu verschiedenen Brennpunkten, wodurch die Auflösung herabgesetzt wird. Durch Aperturen können jedoch die äußeren Strahlen aus dem Strahlengang eliminiert werden.

Das Linsensystem: Der Elektronenstrahl wird zunächst durch zwei Kondensorenlinen fokussiert und durchstrahlt die Probe (s. Abbildung 6). Die erste Kondensorenlinse ist eine extra starke Linse. Sie verdichtet den ca. 50  $\mu\text{m}$  dichten Elektronenstrahl auf 1  $\mu\text{m}$ . Die zweite ist eine schwächere, variable Linse, die den Strahldurchmesser von 1 auf 10  $\mu\text{m}$  steuert. Dadurch können ganz gezielt bestimmte Bereiche einer Probe beleuchtet werden und somit Strahlungsschäden auf der restlichen Probenfläche vermieden werden. Mit dieser Linse kann am TEM die Strahlhelligkeit gesteuert werden (Flegler et al., 1993)

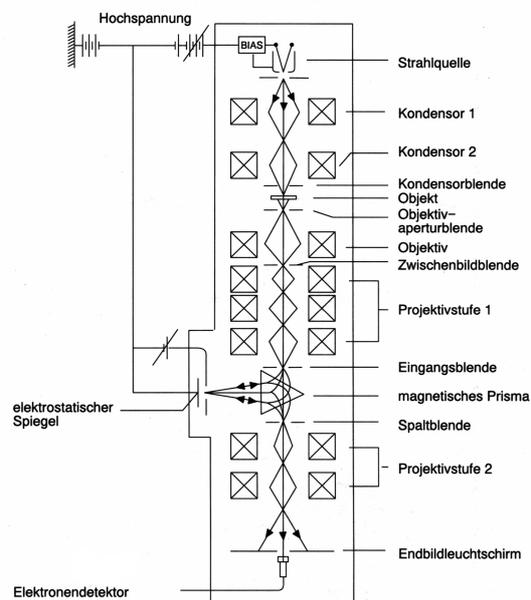


Abbildung 6: Funktionsschema für die Elektronenoptik des EM 902A.

Kondensorenlinen sind mit Aperturblenden ausgestattet. Kleinere Aperturblenden erzeugen dunklere Bilder und schützen empfindliche Präparate vor zu hohen Elektronenkonzentrationen. Die wichtigste Funktion der Kondensoraperturblenden besteht aber in der Definition des Aperturwinkels bei der Bestrahlung. Wenn sich der Strahl im Crossover befindet hat er eine maximale Apertur, aber nicht maximale Bildqualität. Durch Defokussieren der Kondensorenlinse wird der Aperturwinkel der Bestrahlung kleiner und damit die Strahlkohärenz und die Auflösung größer (Flegler et al., 1993).

Die meisten Elektronen passieren die Probe ohne Abweichung. Durch Kontrastieren mit Schwermetallen werden jedoch einige Elektronen abgelenkt und somit aus dem aus der Probe austretenden Strahl entfernt. Wie stark die unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen

den Elektronen im Strahl und den Atomen in der Probe zur Streuung und daher zur Bilderzeugung beitragen, hängt von der Dicke der Probe ab. Zu dicke Proben erzeugen zunehmend chromatische Aberration, welche die Auflösung herabsetzt. Die unterschiedliche Streuung führt zu dem Kontrast, der notwendig ist, um ein Bild auf dem Leuchtschirm zu erzeugen (Plattner und Zingsheim, 1987). Die Elektronen, welche die Probe passiert haben werden zunächst durch eine weitere magnetische Linse, der Objektivlinse fokussiert und vergrößert. Die Objektivlinse ist die wichtigste Linse im TEM. Sie ist die erste vergrößernde Linse und bestimmt das Auflösungsvermögen des TEMs. Alle Mängel in der Objektivlinse werden durch andere Linsen weiter vergrößert. Durch die Objektivaperturblende wird der Kontrast der Probe verstärkt. Beim CEM 902A stehen drei Kontrastblenden zur Verfügung: 30, 60 und 90  $\mu\text{m}$ . Durch kleine Aperturen wird der Kontrast auf Kosten der Beleuchtung vergrößert. Ferner wird die Schärfentiefe erhöht.

Durch intermediäre Linsen wird die Vergrößerung der Objektivlinse verzerrungsfrei weitergeleitet. Anschließend wird durch zwei aufeinanderfolgende Projektorlinsen das Bild weiter vergrößert und auf dem fluoreszierenden Leuchtschirm abgebildet. Dieser Schirm ist mit einer Schicht phosphoreszierenden Zink/Cadmiumsulfid, die mit Nitrocellulose an den Schirm gebunden ist, überzogen. Nach Elektronenbeschuss emittiert er sichtbares Licht. Abgelenkte Elektronen, die aus dem Strahl eliminiert wurden, können natürlich kein sichtbares Licht vom Schirm freisetzen. Die Stellen, die diese Elektronen getroffen hätten bleiben somit dunkel. Dadurch entsteht ein spezifisches Probenabbild (Flegler et al., 1993).

Das Vakuumsystem besteht aus verschiedenen Pumpen, Ventilen und Schaltkreisen. Die Säule muß evakuiert sein, da Gasmoleküle zwischen Kathode und Anode in positiv geladene Ionen umgewandelt werden, die dann wiederum zu diskontinuierlichen Entladungen zwischen Filament und Anode und somit zur Unterbrechung des gleichmäßigen Elektronenstrahls führen würden. Ferner wird durch ein schlechtes Vakuum die Lebensdauer des Filamentes herabgesetzt, da es zur Oxidierung des Wolframfilamentes kommen kann, wodurch weniger Elektronen emittiert werden können. Des weiteren könnten sich Elektronen in Luft nur ein paar Mikrometer fortbewegen, da sie durch Kollision mit Gasmolekülen gestoppt werden. Ebenso wird durch das Vakuum die Kontamination durch Gase wie z.B. Wasserdampf und organische Lösemittel aus dem Labor, die zur Entstehung korrosiver Gase führen könnten verhindert. In der Säule liegt ein Vakuum von ca.  $10^{-6}$  hPa vor.

Das Kühlsystem: Die Probe wird mit Stickstoff gekühlt, da der flüssige Stickstoff das Metall des Goniometers kalt hält. Dadurch werden Verunreinigungen angezogen und ein Reißen des

Schnittes bedingt durch Erhitzung verhindert. Die Kühlung der Säule erfolgt durch ein Wasserzirkulationssystem.

### 2.4.2 Experimente

Es wurden folgende Versuche durchgeführt:

- a) Wachstumsmedium wurde mit 50  $\mu\text{M}$  Picrotoxin für 15 Minuten versetzt. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Kulturen wurden für 1 Stunde bei 37°C inkubiert;
- b) Kulturen wurden für 3 und 8 Tage mit 50  $\mu\text{M}$  Picrotoxin versetzt;
- c) Kulturen wurden für 3 und 8 Tage mit 50  $\mu\text{M}$  Picrotoxin und 50  $\mu\text{M}$  APV versetzt;
- d) Kulturen wurden für 3 und 8 Tage lang mit 50  $\mu\text{M}$  APV versetzt;
- e) Kulturen wurden für 15 Minuten mit 50  $\mu\text{M}$  Picrotoxin und 1  $\mu\text{M}$  tPA-Inhibitor (tPA-stop oder PAI-1) versetzt. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Kulturen wurden für 1 Stunde bei 37°C inkubiert;
- f) Kulturen wurden für 15 Minuten mit 1  $\mu\text{M}$  tPA-Inhibitor (tPA-stop oder PAI-1) versetzt. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Kulturen wurden für 1 Stunde bei 37°C inkubiert;
- g) Kulturen wurden für 15 Minuten mit Magnesium-freiem Medium (MEM, Nr. 51200, Gibco/Life Technologies) das zusätzlich mit 1 mM Calcium angereichert wurde, versetzt. Die Calciumkonzentration betrug 2.5 mM. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Kulturen wurden für 1 Stunde bei 37°C inkubiert;
- h) Kulturen wurden für 8 Tage mit 1  $\mu\text{M}$  TTX versetzt.

Unbehandelte Kulturen dienten als Kontrollen. Das Medium der Kontrollen wurde immer parallel mit dem Medium der behandelten Kulturen ausgewechselt, um mögliche äußere Faktoren ausschließen zu können.

Es wurde bei jedem Experiment ca. 100 Synapsen ausgewertet. Die Experimente a - f wurden 4-mal mit jeweils unterschiedlichen Zellkulturpräparationen durchgeführt, g und h jeweils 2-mal. Im Anschluß wurden die Kulturen für die Elektronenmikroskopie eingebettet.

### 2.4.3 Einbettung

Die Neurone wurden mit Glutaraldehyd bei einer Temperatur von 37°C für 10 Minuten fixiert (s. 6.3.2). Es wurde die Temperatur von 37°C gewählt, da die Zellen im Inkubator auf diese Temperatur eingestellt waren und nicht durch eine Temperaturveränderung, welche zu einer veränderten Transmitterfreisetzung führen kann, die Ergebnisse der Stimulation verändert werden sollten. Zur Fixierung wurde Glutaraldehyd verwendet, da dieses Dialdehyd mit den

Aminogruppen löslicher- als auch membrangebundener Proteine zu hochvernetzten Komplexen auf Pyridinbasis reagiert, wodurch ein sehr hoher Grad der räumlichen Unversehrtheit in mit Glutaraldehydfixierten Gewebe erreicht wird.

Anschließend wurden die Zellen mit einem Gemisch aus Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ) bei  $37^\circ\text{C}$  weiter fixiert (s. 6.3.2).  $\text{OsO}_4$  wird in der Elektronenmikroskopie i.a. als sekundäres Fixativ benutzt, da durch eine alleinige Aldehydfixierung nicht alle Moleküle ausreichend fixiert werden. Die Hauptreaktion des  $\text{OsO}_4$  ist die Reaktion mit ungesättigten Fettsäuren der Membran sowie anderen ungesättigten Verbindungen. Ferner streut  $\text{OsO}_4$  als Schwermetalloxid effektiv Elektronen, so daß es auch als Kontrastmittel wirkt. Außerdem verlieren die Zellen durch die Osmiumbehandlung ihre osmotischen Eigenschaften und sind in den folgenden Schritten weniger empfindlich gegenüber ihrer Umgebung, so daß kein Puffer mehr verwendet werden muß (Plattner und Zingsheim, 1987).

Da im hydratisierten Zustand keine Elektronenmikroskopie durchgeführt werden kann, war eine Entwässerung des Präparates notwendig. Die Dehydratisierung wirkt möglichen Schrumpfs- und Deformierungseffekten entgegen. Ferner muß das zuletzt verwendete Dehydrierungsmittel mit dem Einbettungsmedium mischbar sein. Zur Entwässerung eignet sich Ethanol sehr gut, da es die Aufrechterhaltung der Reduktion und Bindung von Osmium erlaubt

Da man für die Transmissionselektronenmikroskopie sehr dünne Präparate benötigt, die in Form ultradünner Schnitte (60 nm) hergestellt werden, wurden die Proben in Kunstharze eingebettet. Zur Einbettung können verschiedene Harze verwendet werden. Es wurde entweder Araldit oder Epon verwendet (s. 6.3.3). Das Harz wurde erst kurz vor Gebrauch mit Beschleuniger versetzt und homogenisiert.

Die mit dem reinen Harz/Beschleunigergemisch bedeckten Deckgläser wurden dann so auf ausgehärtete Araldit/Eponträger gelegt, daß die Zellen zu der Trägeroberfläche zeigten. Die Proben wurden dann für 2 Tage bei  $60^\circ\text{C}$  in einen Ofen zur Aushärtung gestellt. Anschließend wurden sie in flüssigen Stickstoff gehalten, wodurch das Glas vom Harz abgesprengt wurde. Die Zellen befanden sich nun auf der Harzoberfläche. Die eingebetteten Proben wurden auf eine  $60^\circ\text{C}$  warme Heizplatte gelegt und in kleine Würfel von 2-3 mm<sup>2</sup> geschnitten. Diese Würfel wurden auf bereits gegossene Aralditständer aufgeklebt und zur Härtung des Klebers erneut 1 Stunde bei  $60^\circ\text{C}$  in den Ofen gestellt. Anschließend konnten die Proben mit Rasierklingen zur Trapezform getrimmt werden. An einem Ultramikrotom wurden mit einem Diamantmesser 60 nm dünne Schnitte geschnitten, die mit einem Grid von der Wasseroberfläche

des Diamantmessers aufgenommen wurden. Die Grids wurden zunächst luftgetrocknet und dann kontrastiert.

#### **2.4.4 Gridbefilmung**

Um ein besseres Haften der Schnitte auf dem Grid zu ermöglichen, wurden die Grids mit entweder 0.2 % Pioloform gelöst in Chloroform oder 0.5 % Parladiol gelöst in Isoamylacetat befilmt (Durchführung s. 6.3.4) Entscheidend bei der Befilmung ist ein gleichmäßiger dünner Film, da sonst die Präparate zu dick und die Bilder daher unscharf werden. Es können auch unbefilmte Grids verwendet werden. Diese haben den Vorteil, daß man schärfere Bilder erhält. Allerdings haften die Präparatkanten auf diesen Grids relativ schlecht, wodurch der Schnitt nicht so gut aufliegt.

#### **2.4.5 Kontrastierung**

Zur Erhöhung des Kontrastes und der Bildschärfe wurden die Schnitte kontrastiert. Es wurde die Doppelkontrastierung mit den Schwermetallsalzen Uranylacetat und Bleicitrat nach Reynolds (1963) durchgeführt (s. 6.3.5).

Durch die Uranylacetatkontrastierung wird der Kontrast proteinreicher Strukturen und Nucleinsäuren sowie der Gesamtkontrast der restlichen Zellkomponenten erhöht. Blei, gewöhnlich als Bleicitrat mit pH 12, verbessert den Kontrast von Glykogen, SH-Gruppen einiger Proteine, Nucleotide (über die Phosphatgruppen) und Verbindungen, die mit  $\text{OsO}_4$  reagieren (Plattner und Zingsheim, 1987). Da die Kontrastierung mit Blei besser verläuft, wenn das Material vorher mit Uranylacetat behandelt wurde (die beiden Kontrastierungsmittel scheinen Synergisten zu sein) wird dieser Schritt zuletzt durchgeführt. Das Kontrastieren mit Blei ist sehr anfällig für Verunreinigungen durch Bleicarbonat, das mit atmosphärischen  $\text{CO}_2$  gebildet wird. Daher wird die Bleikontrastierung in Gegenwart von NaOH-Plätzchen durchgeführt, welche das atmosphärische  $\text{CO}_2$  binden.

#### **2.4.6 Auswertung**

Die Auswertung der Synapsen wurde durchgeführt, ohne zu wissen um welche Gruppe es sich handelte. Die Bildaufnahme am TEM erfolgte mit der Kamera SIT 66 und Analysis®-Software. Es wurden von jeder Gruppe ca. 100 Synapsen bei einer 13400-fachen Vergrößerung aufgenommen. Auf jedem zur Auswertung verwendeten Bild einer exzitatorischen Synapse mußten die Präsynapse mit Vesikeln, der synaptische Spalt und die postsynaptische Dichte (PSD) der Postsynapse, die entweder durch einen Spine oder einen Dendriten darge-

stellt wurde, deutlich zu erkennen sein. Die Synapsen wurden dann in verschiedene Kategorien unterteilt: Es wurde zwischen Spine- und Schaftsynapsen sowie zwischen perforierten und nicht-perforierte Synapsen unterschieden.

Eine Synapse wurde als Spinesynapse gewertet, wenn in der Postsynapse keine Organellen und Mikrotubuli vorlagen, sondern nur schwach angefärbtes Material, das für Spines charakteristisch ist, zu sehen war. Hingegen konnten Dendriten leicht durch Mikrotubuli und Mitochondrien identifiziert werden. Eine Synapse wurde als perforiert bezeichnet, wenn die PSD aus zwei oder mehreren einzelnen Segmenten, die aber alle zu einer Membran gehörten, bestand. Synapsen mit kontinuierlicher PSD wurden entsprechend als nicht-perforiert bezeichnet. In Anlehnung an Gabbot und Stewart (1987) wurden bei jeder Synapse außerdem folgende Parameter bestimmt:

- Länge der gesamten Kontaktzone zwischen Prä- und Postsynapse
- Länge der gesamten PSD (ohne Unterbrechungen)
- Assoziations-Index (Verhältnis von PSD-Länge zur Länge der Kontaktzone in Prozent)
- Boutonfläche
- Mitochondrienfläche

In den Tabellen und Grafiken wurden die Mittelwerte der Daten und die Stichprobenstandardabweichungen angegeben. Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit dem Student's t-test (Mathcad) oder mit dem  $\chi^2$ -Test (Excel) ermittelt.

## 2.5 Elektrophysiologie

Ergänzend zu den morphologischen Untersuchungen wurde mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik (Neher und Sakman, 1976) der Einfluß von Picrotoxin, APV und tPA-stop auf die Spontanaktivität der Neurone untersucht.

### 2.5.1 Aufbau des Meßstandes

Der Patch-Clamp-Meßstand bestand aus einem inversen Mikroskop, Mikromanipulator, Vorverstärker mit Pipettenhalter und Pipette, Patch-Clamp-Verstärker, A/D-Wandler und einem Computer (s. 6.4.2). Die Geräte waren auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut, da bereits geringe mechanische Schwingungen und Erschütterungen in der Umgebung zu einer Störung der hochempfindlichen Messung führen konnten. Zur Abschirmung war der Stand mit einem Faraday-Käfig umgeben und geerdet.

### 2.5.1.1 Pipetten

Patch-Pipetten werden durch ihre Wandstärke und ihren Widerstand charakterisiert. Dieser hängt von der Spitzenöffnung und der Flankenform (Flankenwiderstand) ab. Es wurden Pipetten aus dünnwandigen Borsilikatglas mittels eines horizontalen Pipettenziehgerätes gezogen. Die Pipettenwiderstände lagen zwischen 2 - 4 M $\Omega$ .

Die Pipetten wurden mit interzellulärer Lösung gefüllt und in den Pipettenhalter eingesetzt, der elektrisch mit dem Vorverstärker verbunden war. Pipettenhalter und Vorverstärker befanden sich auf einem motorisierter Mikromanipulator. Dieser ist erforderlich, um mit der Pipette gezielt auf einer Zelle aufzusetzen.

Der Vorverstärker ist über einen chlorierten Silberdraht mit der Pipettenlösung verbunden; der Erdleiter mit der Badlösung. Beide Elektroden wurden vor jedem Versuch mit konzentrierter Natriumhypochloridlösung neu chloriert.

### 2.5.1.2 Applikation

Die Applikation der Pharmaka erfolgte durch eine langsame Badperfusion. Die Flüssigkeit floß dabei durch die Gravitation bedingt in die Kammer. Diese Art der Applikation ist für Modifizierung von Strömen etc. ausreichend (Numberger und Draguhn, 1996). Das Flüssigkeitsvolumen in der Kammer wurde niedrig gehalten, um einen schnellen Lösungsaustausch (< 2 Minuten) zu gewährleisten.

### 2.5.1.3 Datenaufnahme

Die Datenaufnahme erfolgte über den EPC-9 Patch-Clamp Verstärker. Dieser besteht aus einem Vor- und einem Hauptverstärker. Der Patch-Clamp-Vorverstärker mißt das Stromsignal und ließt es als Spannung aus (Strom/Spannungswandler). Die Meßwerte werden dann zur Steuereinheit des Verstärkers weitergeleitet, wo sie entsprechend umgerechnet und auf den Monitor ausgelesen werden. Es können entweder Voltage-Clamp- oder Current-Clamp-Messungen durchgeführt werden.

## 2.5.2 Voltage-Clamp-Messung

Mit der Voltage-Clamp-Messung können einzelne Ströme durch Ionenkanäle gemessen und die Kinetiken dieser Ströme untersucht werden.

Im Voltage-Clamp Modus wird das Membranpotential der Zelle durch einen Kompensationsstrom, der genauso groß ist wie der Strom, der durch die Membran fließt, diesem aber entge-

gen gerichtet ist, konstant gehalten. Dieser Kompensationsstrom läßt Schlüsse über die Leitfähigkeit der Membran zu.

Das Abgleichen des Potentials der Zelle mit einem vorgegebenden Kommandopotential erfolgt über den Vorverstärker. Die wichtigsten Elemente des Vorverstärkers sind der Operationsverstärker (OPA, operational amplifier) und der Rückkopplungswiderstand  $R_f$  (f für feedback). Am (-) Eingang des OPA liegt die Pipettenspannung  $U_{pip}$  an, am (+) Eingang die Sollspannung ( $U_{soll}$ ), die über die Steuereinheit des Verstärkers vorgeben werden kann. Ist  $U_{pip} \neq U_{soll}$ , entsteht am Ausgang des OPAs eine Spannung ( $U_f$ ), die dieser Differenz proportional, aber in Abhängigkeit von  $R_f$  extrem verstärkt ist. Durch diese Spannungsdifferenz fließt über  $R_f$  ein Strom. Da der Eingangswiderstand von OPA unendlich hoch ist (ca.  $10^{12} \Omega$ ), kann dieser Strom nur in die Pipette fließen. Er fließt solange, bis  $U_{pip} = U_{soll}$  ist. Die Spannung am OPA ( $U_f$ ) wird an einem nachgeschalteten Differenzverstärker mit der Kommandospannung ( $U_{soll}$ ) verglichen und die Differenz ( $U_{aus}$ ) über den Strommonitor ausgegeben. Das Spannungssignal wird an die Steuereinheit weitergeleitet und durch einen, am EPC-9-Verstärker eingestellten, von  $R_f$ -abhängigen Kalibrierungsfaktor in den Strom umgerechnet.

### 2.5.3 Current-Clamp-Messung

In der Current-Clamp-Anordnung wird der Strom durch die Membran fest vorgegeben. Das Potential hingegen bleibt variabel. Dadurch können Rückschlüsse auf das physiologische Erregungsmuster, die Spontanaktivität der Zelle gezogen werden.

In dieser Meßkonfiguration wird das Potential zwischen Pipette und Badelektrode gemessen. Der Vorverstärker arbeitet in diesem Modus als einfacher Spannungsfolger. Dies geschieht durch eine schnelle zusätzliche Rückkopplungsschleife, die zwischen dem (-) Eingang des OPA mit der Pipettenspannung ( $U_{pip}$ ), über die differentielle OPA-Ausgangsspannung zurück zum (+) OPA-Eingang verläuft. Ändert sich das Membranpotential der Zelle und somit  $U_{pip}$ , ändert sich auch die Spannung am OPA-Ausgang. Dies resultiert in der Änderung des über  $R_f$  fließenden Stromes und der an  $R_f$  abfallenden Spannung  $U_f$ , die dann auf den (+) OPA-Eingang zurückgeleitet wird. Diese Ausgleichsspannung ist proportional zur Potentialänderung der Zelle. Sie wird über den Spannungsmonitor aufgenommen.

### 2.5.4 Kapazitätskorrektur

Bei jeder Änderung der Kommandospannung kommt es zunächst zu einem Umladeprozess der Pipetten- und Zellkapazität. Die Kapazität ( $C$ ) ist die Ladungsmenge ( $Q$ ), die zum Aufbau einer Spannung ( $U$ ) benötigt wird:  $C \cdot U = Q$ . Um die an einen Kondensator anliegende Spannung zu verändern, muß entweder Ladung hinzugefügt oder entfernt werden. Die Änderung der Ladung ist das Ergebnis des Stromes über den Kondensator. Da Strom der Fluß von Ladung pro Zeiteinheit ist (1 Coulomb ist die Ladungsmenge, die 1 Ampere Strom in einer Sekunde transportiert.  $1C = 1A \cdot s$ ) hängt sie von der Stromgröße und der Dauer des Stromflusses ab. Die Membrankapazität reduziert im Endeffekt die Geschwindigkeit, mit der sich das Membranpotential auf einen Strompuls hin ändert. Die Zeitkonstante  $\tau$  ist das Produkt aus Membranwiderstand und Membrankapazität. Sie gibt die Zeit an, in der der Strom 63% seines Endwertes erreicht.

Bei jeder Spannungsänderung geht folglich Zeit für die kapazitive Umladung verloren. Eine Änderung der Kommandospannung führt daher nicht sofort zu der entsprechenden Änderung des Membranpotentials. Als Antwort auf einen rechteckigen Strompuls entstehen schnell ansteigende und exponentiell abfallende, sogenannte transiente Ströme, die durch das Verschieben von Ladungen auf der Membran bedingt sind. Diese kapazitiven Artefakte stören das eigentliche Meßsignal und können bei sehr großen Spannungssprüngen den Vorverstärker kurzzeitig in die Sättigung treiben, wodurch der Regelkreis für die Spannung dann kurzzeitig ausfällt. Durch die Kapazitätskompensation (C-Kompensation) werden daher die kapazitiven Ströme klein gehalten werden. Der transiente Strom wird durch einen zweiten Eingang in die Pipette gespeist und erscheint daher nicht mehr im Stromsignal des eigentlichen Meßkreises.

Am EPC-9 Verstärker gibt es zwei unterschiedliche Kapazitätskorrekturmechanismen. Mit der schnellen Kapazitätskorrektur (C-fast) mit einer Zeitkonstante von 0.5 - 0.8  $\mu s$  können die kapazitiven Ströme von Pipette und Pipettenhalter korrigiert werden. Mit der langsamen Kapazitätskorrektur (C-slow) mit einer langsamen Zeitkonstanten ( $< 5 \mu s$ ) werden die Umladeströme der Membran korrigiert.

Die Kapazität ist direkt proportional zur Fläche der Membran und somit ein direktes Maß für die Größe eines Neurons. Da auf einer großen Fläche mehr Ladung gespeichert werden kann, wird bei größeren Neuronen mehr Strom benötigt als bei kleineren, um das gleiche Membranpotential zu erzeugen.

### 2.5.5 Serienwiderstand

Im Whole-Cell Modus ist die Pipette mit dem Zellinneren leitend verbunden. Zwischen Silberdraht und Soma liegt der Serienwiderstand  $R_S$ . Dieser entspricht rein theoretisch dem Pipettenwiderstand  $R_{PIP}$ . Da jedoch beim Öffnen der Zelle Membranfragmente mit in die Pipette gesaugt werden, ist er beinahe doppelt so groß wie  $R_{PIP}$ . Dies hat zur Folge, daß die Geschwindigkeit des bei einer Spannungsänderung zu injizierenden Stromes verringert wird. Der Vorverstärker reagiert erst mit Verzögerung, wodurch das Kommandopotential für eine kurze Zeit von der Sollspannung abweicht. Des weiteren fällt bei der Strominjektion ein Teil der Spannung bereits am Serienwiderstand ab, wodurch im Zellinneren eine zu geringe Spannung aufgebaut wird. Nur wenn  $R_S$  gegenüber dem Membranwiderstand  $R_M$  sehr klein ist, liegt nahezu die vorgegebene Spannung an. Um den Verlust zu kompensieren, wird über einen weiteren Regelkreis noch ein zusätzlicher Anteil zur Kommandospannung addiert, der proportional zum gerade injizierten Strom ist und somit einen Teil des erwarteten Spannungsverlustes ausgleicht (Numberger und Draguhn, 1996).

### 2.5.6 Durchführung

Der Coverslip mit den zu messenden Zellen wurde in eine 35 mm Petrischale überführt und mit einem Silikonkleber befestigt. Zusätzlich wurde ein Plexiglaseinsatz in die Schale eingesetzt, um das Kammervolumen zu verringern. Der Plexiglaseinsatz hatte an der Seite drei eingefräste Zugänge für die Pipette, die Badelektrode sowie den Ab- und Zufluß. Der Coverslip wurde in die Meßkammervorrichtung des inversen Mikroskops eingesetzt und vor Patch-Beginn 30 Minuten lang mit externer Lösung (s. 6.4.1) perfundiert, da sich innerhalb dieses Zeitraumes, die durch die Umsetzung des Coverslips bedingte erhöhte Erregbarkeit der Neuronen wieder normalisiert.

Die Neurone wurden entweder mit normalen Phasenkontrast oder mit differentiellen Interferenzkontrast (DIC) nach Nomarski visualisiert. Der DIC bietet den Vorteil, daß man praktisch einen optischen Schnitt durch die zu patchende Zellen legen kann, so daß Strukturen über und unter der Beobachtungsebene weniger stören. Durch abwechselndes fokussieren der Pipettenspitze bzw. der Zelle kann man sich gut orientieren und die Pipette langsam an die Zelloberfläche fahren.

Die Pipette wurde mit interner Lösung gefüllt (s. 6.4.1), in die Pipettenhalterung eingespannt und mit dem Mikromanipulator vorsichtig an die Oberfläche der zu patchenden Zelle herangefahren. Zur Korrektur möglicher Offset-Potentiale wurde mit einem Korrekturmechanismus des EPC-9 das Potential auf Null eingestellt. Unter Offset-Potentiale versteht man Spannun-

gen zwischen Übergängen innerhalb der Meßkette (z.B. Polarisierungen an der Silber/Silberchlorid-Elektrode im umgebenden Elektrolyten) oder Übergangspotentiale zwischen Pipette und Bad. Durch behutsames Saugen des Membranstückes an die Pipettenöffnung kam es zu direktem Kontakt zwischen Membranoberfläche und Pipette (s. Abbildung 7). Das Membranstück unter der Pipette wurde dadurch elektrisch von der Umgebung und ihrem Hintergrundrauschen isoliert, wobei die Widerstände zwischen Pipetteninnerem und Bad im Bereich mehrerer Gigaohm (Gigaseal) lagen. In dieser Cell-attached-Konfiguration wurde der Verstärker zunächst auf Voltage-Clamp-Modus eingestellt und eine Spannung von  $-60$  mV angelegt. Anschließend wurde die schnelle Kapazität (C fast) korrigiert. Die Membran unter der Pipette blieb in dieser Anordnung noch intakt. Um in den Whole-Cell-Modus zu gelangen, wurde der Membranbereich unter der Pipette durch Anlegen eines leichten Unterdrucks durchbrochen. Es wurde nun der Strom durch die gesamte verbleibende Membran gemessen. Die Lösung des Pipetteninneren ist beim Whole-Cell-Modus direkt mit dem Inneren der Zelle verbunden, so daß nach ein paar Sekunden das Zellinnere mit der Pipettenlösung gefüllt ist. Da nun nicht nur der Bereich unter der Pipette, sondern die ganze Zellmembran umgeladen wird, änderte sich auch die Stromantwort auf den Testpuls und die transienten Ströme nahmen zu. Diese langsamen kapazitiven Ströme (C-slow) wurden ebenfalls korrigiert. Alle Messungen wurden im Whole-Cell-Modus durchgeführt.

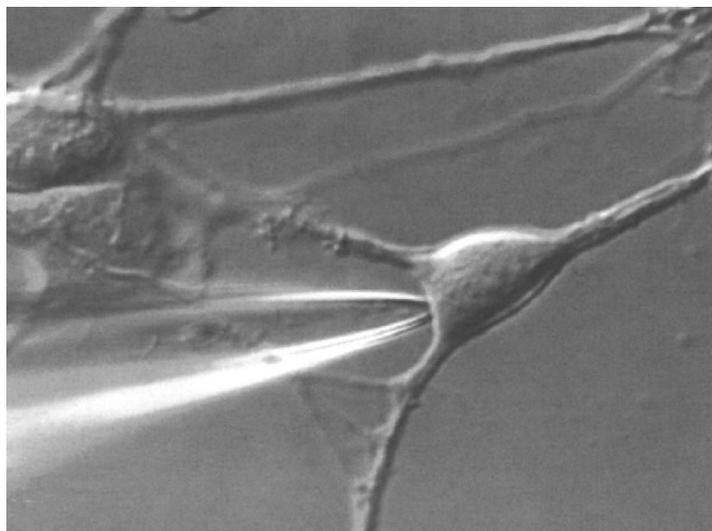


Abbildung 7: Gepatchtes Neuron. Links im Bild sieht man die Patch-Pipette, deren Spitze in direktem Kontakt mit der Zellmembran ist.

## **2.5.7 Meßprotokolle**

### **2.5.7.1 Current-Clamp**

Zur Verifizierung der Elektronenmikroskopischen Versuche wurde der Einfluß von: a.) 50  $\mu\text{M}$  Picrotoxin; b.) 50  $\mu\text{M}$  APV und 50  $\mu\text{M}$  Picrotoxin sowie c.) 1  $\mu\text{M}$  tPA-stop und 50  $\mu\text{M}$  Picrotoxin auf die Spontanaktivität der Neurone im Vergleich zu Kontrollen gemessen.

Dazu wurde die Spontanaktivität der Zellen in der Whole-Cell Konfiguration zunächst 2 Minuten lang aufgenommen. Dann wurden dem jeweiligen Versuch entsprechend die Pharmaka für 5 Minuten eingewaschen, die Spontanaktivität aufgenommen und wieder ausgewaschen.

### **2.5.7.2 Voltage-Clamp**

Für die Immunocytochemie wurden Zellen mit Lucifer Yellow gefüllt. Es wurde eine interne Lösung mit 0.1% Lucifer Yellow verwendet (s. 6.4.1). In der Whole-Cell Konfiguration wurden die Zellen unter visueller Kontrolle der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes 10 bis 15 Minuten lang gefüllt. Anschließend wurde die Pipette vorsichtig wieder herausgefahren.

## **2.5.8 Datenaufnahme**

Die Daten wurden mit Hilfe des Softwarepaketes Pulse + Pulsefit aufgenommen. Um das hochfrequente Rauschen der Signale abzusenken wurde ein Tiefpaß (low pass) Bessel-Filter verwendet. Die Signale wurden bei einer Grenzfrequenz von 1 kHz gefiltert. Unterhalb dieser Frequenz werden die Frequenzanteile etwas abgeschwächt, oberhalb werden sie immer stärker eliminiert. Die Digitalisierung der Daten erfolgte mit 2 kHz. Nachdem Nyquist-Kriterium muß mit einer mindestens Doppelt so hohen Frequenz wie die höchste im Signal vorkommende Frequenz digitalisiert werden. Zur Darstellung der Daten wurde die Igor-Software verwendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Hippocampale Zellkultur

#### 3.1.1 Neuronen/Gliazellen

Die Lichtmikroskopische Untersuchung der postnatalen dissoziierten Hippocampuskultur zeigte, daß entsprechend den unterschiedlichen Hippocampusregionen verschiedene Neuro-  
nentypen in der Kultur vorkamen. Neben den charakteristischen Pyramidenzellen aus der CA3 und der CA1 Region waren ebenso die rundlichen Körnerzellen aus dem Gyrus dentatus vorhanden (s. Abbildung 8). Des weiteren gab es eine Vielzahl unterschiedlicher Gliatypen, welche die Neurone umgaben. Am häufigsten waren die Astrozyten. Sie zeichneten sich durch einen unregelmäßig geformten mehr oder minder sternförmigen Zellkörper mit relativ langen Fortsätzen aus (s. Abbildung 8). Die Neurone waren über ein stark verzweigtes Netzwerk miteinander verbunden. Dieses dichte Geflecht synaptischer Kontakte konnte immun-  
cytochemisch mit einem Maus anti-Synaptophysin und einem anti-Maus Cy3 konjugierten Antikörper im Konfokalen Lasermikroskop gezeigt werden (s. Abbildung 9).

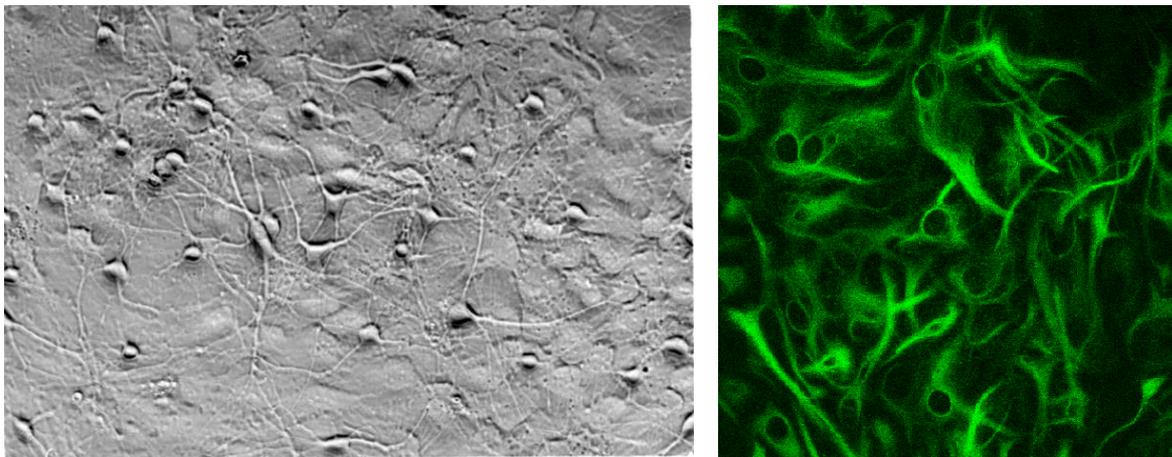


Abbildung 8: Linkes Bild: Lichtmikroskopische Aufnahme der hippocampalen Zellkultur. Sie zeigt einen Ausschnitt aus dem neuronalen Netzwerk. Die Neurone wachsen auf einem dichten Gliarase. Rechtes Bild: Gliazellen nach GFAP-Antikörperfärbung aufgenommen im konfokalen Lasermikroskop.

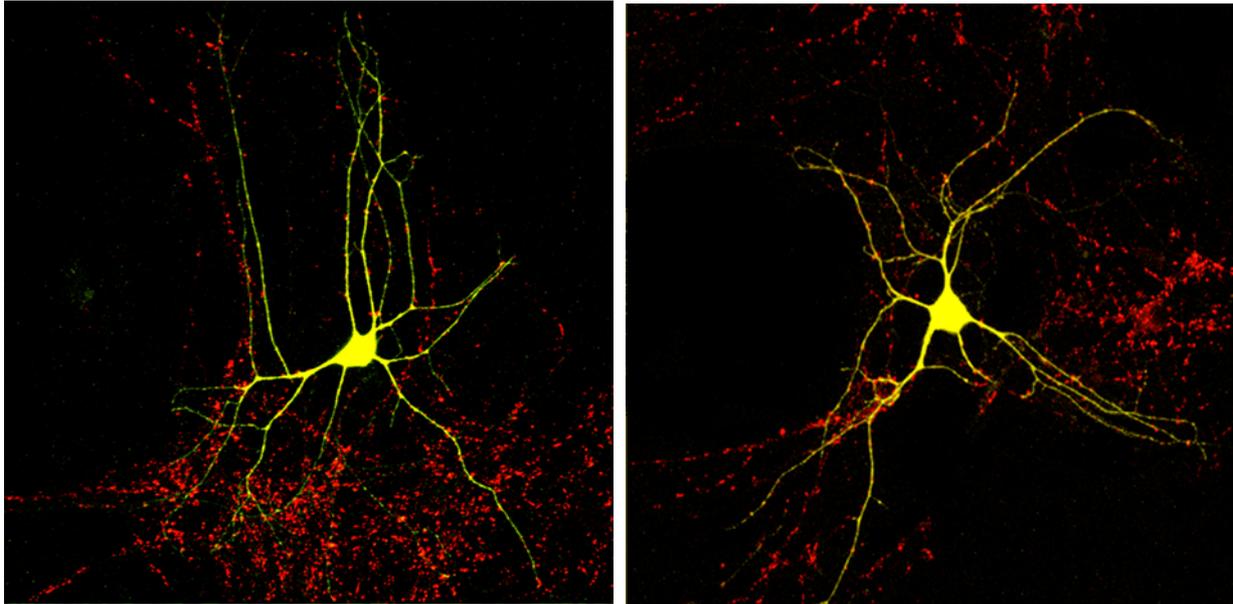


Abbildung 9: Lucifer Yellow gefüllte Neurone. Nach immunzytochemischen Färbungen mit Maus-anti-Synaptophysin und einem anti-Maus konjugiertem Cy3 Antikörper konnten die Boutons dieser Neurone und die der Nachbarneurone im konfokalen Lasermikroskop rot dargestellt werden. Es ist deutlich die Verteilung der Boutons entlang der Dendriten zusehen. Die rotgefärbten Boutons weisen auf das dichte Netzwerk synaptischer Kontakte der umgebenden Neurone hin.

### 3.1.2 Neuronen/Gliaverhältnis

Zu Beginn der Kultivierung lagen Neurone und Gliazellen im Verhältnis 1:1 vor. Mit zunehmender Kultivierungsdauer nahm der Gliaanteil stetig zu, während die Anzahl der Neurone entsprechend sank.

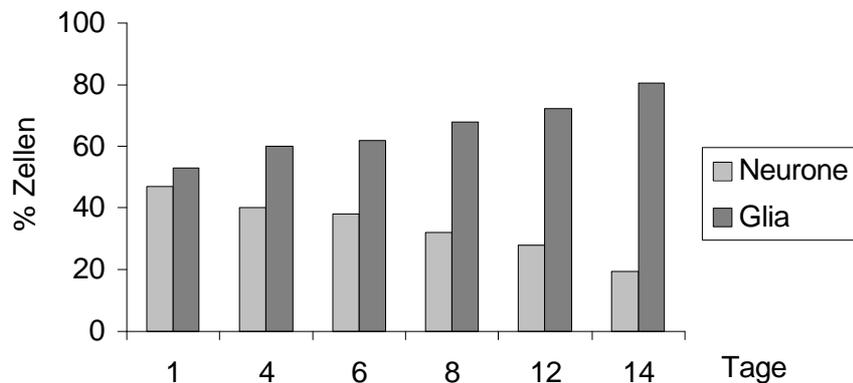


Abbildung 10: Entwicklung des Neuronen/Gliaverhältnisses. Am 1. Tag der Kultur beträgt das Verhältnis von Neuronen und Gliazellen noch nahezu 1:1. Mit zunehmender Kultivierungsdauer nimmt der prozentuale Anteil der Gliazellen stetig zu. Nach 2 Wochen beträgt das Verhältnis 1:4.

Eine exponentielle Zunahme der Gliazellen wurde durch den Zusatz von 5  $\mu\text{M}$  AraC zum Medium unterbunden. Dennoch nahm der Neuronenanteil ständig ab. Am 4. Tag betrug er noch 40%, am 8. nur noch 32%. Nach 12 Tagen in Kultur betrug das Neuronen/Gliaverhältnis 3:7. Nach 14 Tagen bereits 1:4 (s. Abbildung 10).

### 3.1.3 Verhältnis exzitatorischer/inhibitorischer Neurone

In dieser Primärkultur waren 30% der Neurone inhibitorisch (Gabaerg) und die verbleibenden 70% exzitatorisch (s. Abbildung 11). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen aus der Literatur (Beaulieu et al., 1992). Die Gabaergen Neurone unterschieden sich von den glutamatergen durch ihre geringere Größe. Des weiteren ist das Soma rundlich bis oval, während die typischen glutamatergen Neurone durch ihre Größe und durch die pyramidenartige Form des Somas auffallen.

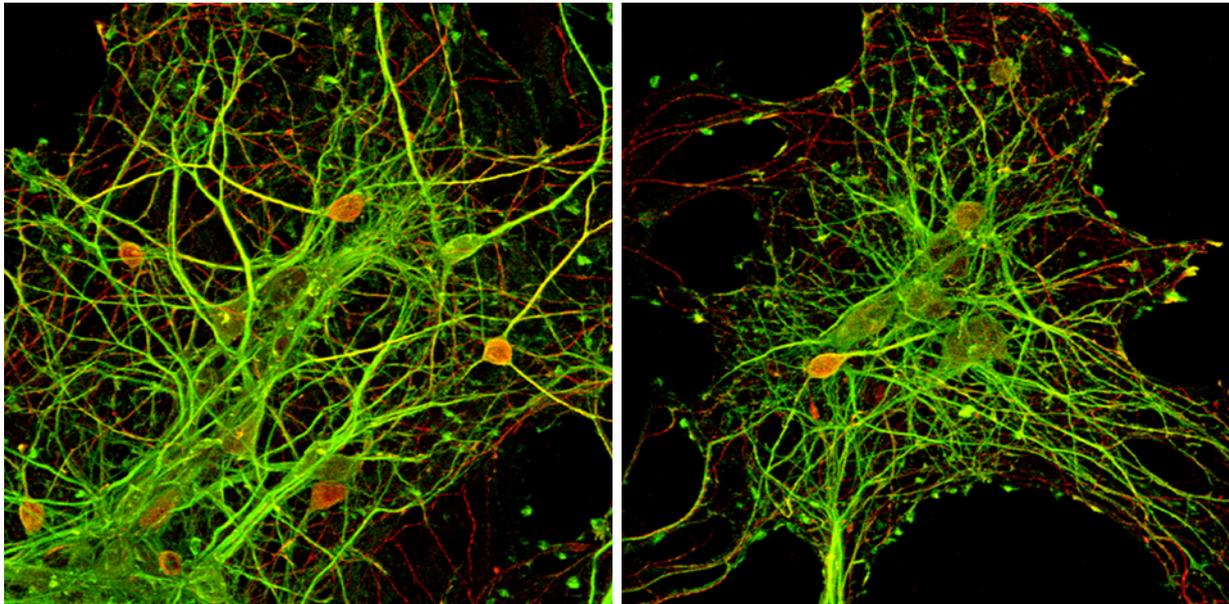


Abbildung 11: Gabaerge und glutamaterge Neurone. Durch immuncytochemische Färbungen mit Antikörpern gegen das Enzym GAD und das Protein MAP2 wurde am konfokalen Laser-mikroskop die Verteilung GABAerger und GABA-negativer Zellen untersucht. Die inhibitorischen Neurone (rot) lagen im Verhältnis 3:7 zu den exzitatorischen Neuronen (grün) vor.

### 3.1.4 Synaptische Ultrastruktur

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Neurone bei 13400-facher Vergrößerung zeigten, daß die Zellen eine intakte Ultrastruktur aufwiesen. Es konnten deutlich die zytoplasmatischen Komponenten der Somata, Axone und Dendriten gesehen werden. Die Dendriten zeichneten sich gegenüber den schmalen Axonen durch die sie durchziehenden Mikrotubuli, das granuläre endoplasmatische Reticulum und das Vorkommen von Ribosomen aus (s. Abbildung 12).

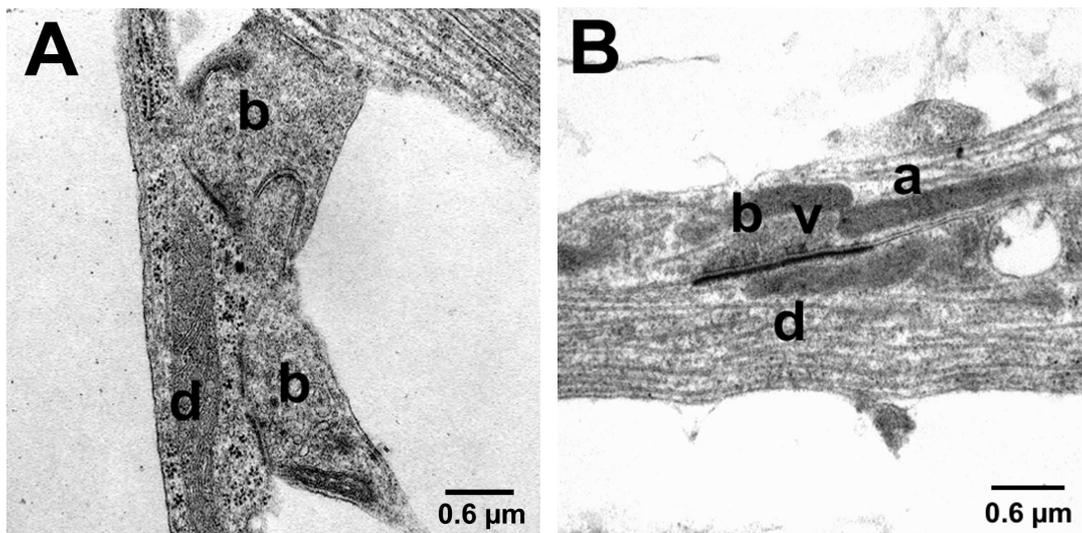


Abbildung 12: Ausschnitte aus der Ultrastruktur verschiedener Neurone. Bild A zeigt zwei Boutons (b) die dicht nebeneinander auf einem Dendriten Synapsen ausbilden. In B ist ein Axon (a), das über einen mit Vesikeln (v) gefüllten Bouton mit einem Dendriten eine Synapse bildet, gezeigt.

Die zahlreichen exzitatorischen Synapsen kamen entweder direkt auf dem Dendriten (Schaftsynapse) oder auf einem dendritischen Dorn (Spinesynapse) vor. Die Spinesynapsen konnten wiederum anhand ihrer Gestalt in verschiedene Kategorien unterteilt werden. Es gab kurze dicke (stubby) Spines, dünne Spines oder weiter ausgebildete Spines mit ausgeprägtem Spinehals und distinktem Kopf (s. Abbildung 13). Die Membranen waren deutlich zu erkennen. Daher konnte anhand der postsynaptischen Dichte eine weitere Einteilung in perforierte Synapsen, die eine diskontinuierliche PSD hatten und in nicht-perforierte Synapsen mit einer kontinuierlichen PSD erfolgen.

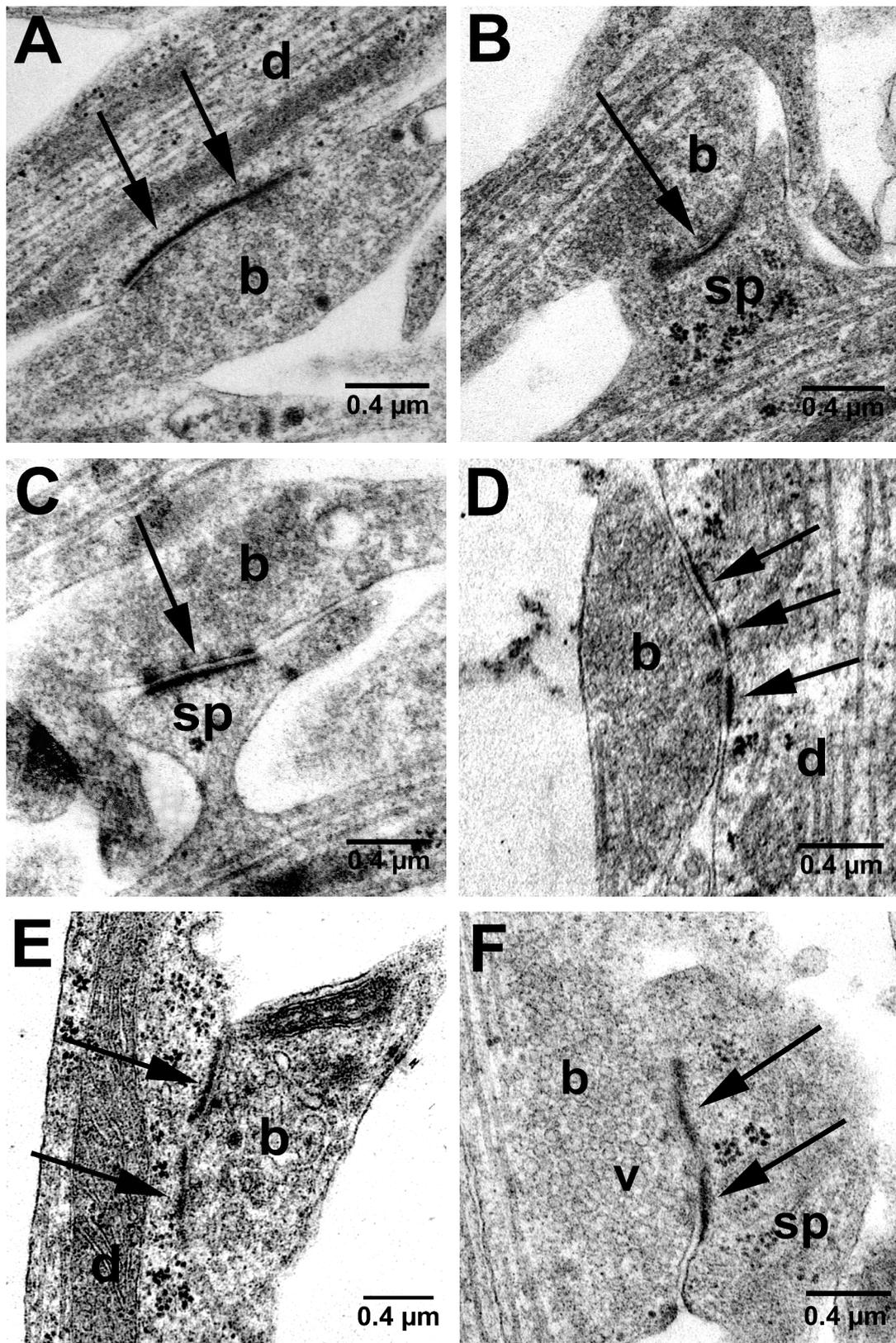


Abbildung 13: Exzitatorische Synapsen in der hippocampalen Zellkultur. Abbildung A: zeigt eine nicht-perforierte Schaftsynapse. Die Postsynapse wird von einem Dendriten (d) gebildet. Die Pfeile weisen auf die PSD, die als schwarzer Strich zu erkennen ist. Die Präsynapse wird durch den mit Vesikeln (v) gefüllten Bouton (b) charakterisiert. Abbildung B und C zeigen

unterschiedliche Spinesynapsen: Einen kurzen, breiten „stubby“ Spine und einen ausdifferenzierten Spine (sp) mit Spinehals und -kopf. In Abbildung D ist eine mehrfach perforierte und in Abbildung E eine einfache perforierte Schaftsynapse abgebildet. Deutlich sieht man die Unterbrechung in der PSD sowie auf der präsynaptischen Seite im Grid. In Abbildung F ist eine perforierte Spinesynapse zu sehen. Der Bouton ist deutlich mit Vesikeln (v) gefüllt.

### 3.2 Perforierte Synapsen in Abhängigkeit synaptischer Aktivität

Die elektronenmikroskopische Untersuchung unbehandelter Kulturen ergab, daß  $34.7 \pm 2.0\%$  aller untersuchten Synapsen Spine- und  $65.3 \pm 2.0\%$  Schaftsynapsen waren. Insgesamt waren  $12.3 \pm 2.9\%$  aller Synapsen perforiert und  $87.7 \pm 2.9\%$  nicht-perforiert (s. Abbildung 14, Tabelle 2). Der Hauptteil der perforierten Synapsen ( $88.6\%$ ) waren Schaftsynapsen.

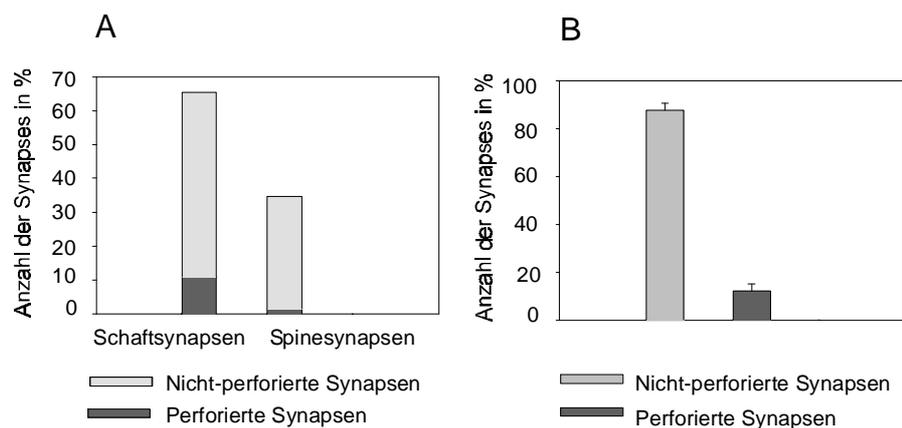


Abbildung 14: A zeigt die Verteilung von Spine- zu Schaftsynapsen sowie den prozentualen Anteil perforierter und nicht-perforierter Synapsen in den Kontrollgruppen. B zeigt das prozentuale Verhältnis von perforierten und nicht-perforierten Synapsen. Insgesamt waren 12% aller Synapsen perforiert.

Tabelle 2: Aktivitätsabhängige Verteilung von perforierten und nicht-perforierten Synapsen.

Synapsen <sub>n</sub> (%)	Kontrollen	PTX 15 min	PTX 3/8 Tage	APV 3/8 Tage	PTX+ APV 3/8 Tage	tPA-Inhibitor 15 min	PTX+ tPA-Inhibitor 15 min	Mg <sup>2+</sup> -freies Medium 15 min	TTX 8 Tage
Spinesynapsen	34.7 ± 2.00	36.5 ± 6.46	41.1 ± 6.00	30.2 ± 4.50	31.1 ± 5.69	25.7 ± 6.42	27.0 ± 7.08	33.2 ± 7.13	9.0 ± 4.36
Perforierte Spinesynapsen	1.4 ± 1.36	5.0 ± 4.94	5.9 ± 1.51	1.1 ± 1.90	1.5 ± 1.78	0.0 ± 0.00	0.2 ± 0.47	1.8 ± 1.98	0.0 ± 0.00
Nicht-perforierte Spinesynapsen	33.3 ± 2.03	31.5 ± 3.70	35.2 ± 6.34	29.1 ± 6.36	29.6 ± 4.06	25.7 ± 6.42	26.8 ± 6.76	31.4 ± 7.03	9.0 ± 4.36
Schaftsynapsen	65.3 ± 2.00	63.6 ± 6.46	58.9 ± 6.00	69.8 ± 4.49	68.9 ± 5.70	74.3 ± 6.42	73.0 ± 7.08	66.8 ± 7.13	91.0 ± 4.36
Perforierte Schaftsynapsen	54.4 ± 2.12	45.9 ± 4.68	36.4 ± 9.51	59.3 ± 7.11	58.9 ± 2.41	62.1 ± 8.10	62.5 ± 5.86	44.1 ± 7.51	81.5 ± 5.90
Nicht-perforierte Schaftsynapsen	54.4 ± 2.12	45.9 ± 4.68	36.4 ± 9.51	59.3 ± 7.11	58.9 ± 2.41	62.1 ± 8.10	62.5 ± 5.86	44.1 ± 7.51	81.5 ± 5.90
Σ aller perforierten Synapsen	12.3 ± 2.91	22.6 ± 1.44	28.4 ± 3.22	11.6 ± 1.23	11.5 ± 2.27	12.2 ± 3.57	10.7 ± 3.92	24.5 ± 6.50	9.5 ± 4.45
Σ aller nicht-perforierten Schaftsynapsen	87.7 ± 2.91	77.4 ± 1.44	71.6 ± 7.22	88.4 ± 1.23	88.5 ± 2.27	87.8 ± 3.57	89.3 ± 3.92	75.5 ± 6.50	90.5 ± 4.45

Diese Tabelle zeigt die Verteilung von perforierten und nicht-perforierten Spine- und Schaftsynapsen nach unterschiedlichen Behandlungen. Die Häufigkeit der Synapsen ist angegeben in % und bezieht sich jeweils auf die Gesamtheit der untersuchten Synapsen.

### 3.2.1 Erhöhung der Aktivität durch Picrotoxin

Bereits eine 15-minütige Stimulation mit dem GABA<sub>A</sub>-Antagonisten Picrotoxin führte zu einem signifikanten Anstieg der perforierten Synapsen von 12.3 ± 2.9% (Kontrolle) auf 22.6 ± 1.4% ( $p < 0.001$ ;  $\chi^2$ -Test). Die Anzahl der perforierten Synapsen nahm folglich um 83% zu. Nach 3-tägiger Stimulation wiesen 28.4 ± 3.2% aller Synapsen Perforationen auf (s. Abbildung 15A). In Bezug auf die Kontrollgruppen entsprach dies einer signifikanten Zunahme der perforierten Synapsen um 130% ( $p < 0.001$ ;  $\chi^2$ -Test). Gegenüber der 15-minütigen Stimulation wurde eine signifikante Zunahme um 26% ( $p < 0.01$ ;  $\chi^2$ -Test) erreicht.

Eine 8-tägige Stimulation der Kulturen mit Picrotoxin führte zu keiner weiteren Zunahme der perforierten Synapsen. Das Maximum an perforierten Synapsen in der Kultur wurde somit nach 3 Tagen ausgebildet. 80% aller perforierten Synapsen wurde bereits nach 15-minütiger Stimulation gebildet.

Da die Ergebnisse der 3-tägigen Stimulation denen der 8-tägigen auch in allen anderen analysierten synaptischen Parametern entsprach, wurden diese beiden Gruppen zusammengefaßt und im Folgenden als 3/8 bezeichnet.

### 3.2.2 Rolle des NMDA-Rezeptors

3-tägige Inkubation der Kulturen in Medium mit APV führte zu keiner Veränderung des prozentualen Anteils der perforierten Synapsen im Vergleich zu den Kontrollkulturen (s. Tabelle 2). Nach der APV Behandlung waren  $11.5 \pm 2.3\%$  aller Synapsen perforiert; in den Kontrollgruppen  $12.3 \pm 2.9\%$ . 8-tägige APV Behandlung führte weder zu weiteren Veränderungen in der Anzahl der perforierten Synapsen noch in allen anderen analysierten Parametern. Daher wurden die Ergebnisse der 3- und 8-tägigen APV-Behandlungen ebenfalls zusammengefaßt und als 3/8 dargestellt.

Stimulation der Kulturen mit Picrotoxin in Gegenwart von APV führte zu keiner Zunahme der perforierten Synapsen. Eine Zunahme an perforierten Synapsen durch den GABA<sub>A</sub>-Antagonisten Picrotoxin wurde somit durch den NMDA-Rezeptor Antagonisten APV vollständig unterbunden. Entsprechend der APV behandelten Gruppen (s.o.) waren nach der Co-Applikation von Picrotoxin und APV nur  $11.6 \pm 1.2\%$  aller Synapsen perforiert (s. Tabelle 2). Gegenüber der alleinigen Picrotoxin-Applikation kam es zu einer signifikanten Abnahme der perforierten Synapsen von  $22.6 \pm 1.4\%$  auf  $11.6 \pm 1.2\%$  ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2$ -Test; s. Abbildung 15B).

15-minütige Inkubation der Kulturen in Medium ohne Magnesium und 2.5 mM Calcium führte ähnlich wie bei der Picrotoxinstimulation zu einem signifikanten Anstieg der perforierten Synapsen von  $12.3 \pm 2.9\%$  auf  $24.5 \pm 6.5\%$  ( $p < 0.01$ ,  $\chi^2$ -Test). Dies entspricht einer Zunahme der perforierten Synapsen von 98% (s. Abbildung 15D).

Diese Ergebnisse zeigen, daß der NMDA-Rezeptor eine sehr wichtige Rolle bei der Bildung perforierter Synapsen spielt.

### 3.2.3 Funktion des tPAs

Kulturen, die für 15 Minuten mit tPA-Inhibitor (entweder tPA-stop oder PAI-1) behandelt wurden, zeigten eine den Kontrollgruppen entsprechende Verteilung der perforierten Synapsen von  $12.2 \pm 3.5\%$  (s. Tabelle 2). Stimulation der Zellen mit Picrotoxin in Gegenwart von tPA-Inhibitor führte zu keiner Zunahme der perforierten Synapsen. Lediglich  $10.7 \pm 3.9\%$  aller Synapsen waren perforiert. Die durch Picrotoxin verursachte Zunahme an perforierten Synapsen wurde durch die tPA-Inhibitoren signifikant geblockt ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2$ -Test). Die Anzahl der perforierten Synapsen betrug  $10.7 \pm 3.9\%$  (s. Abbildung 15C). Diese Daten zeigen, daß tPA eine wichtige Rolle bei der Bildung perforierter Synapsen spielt.

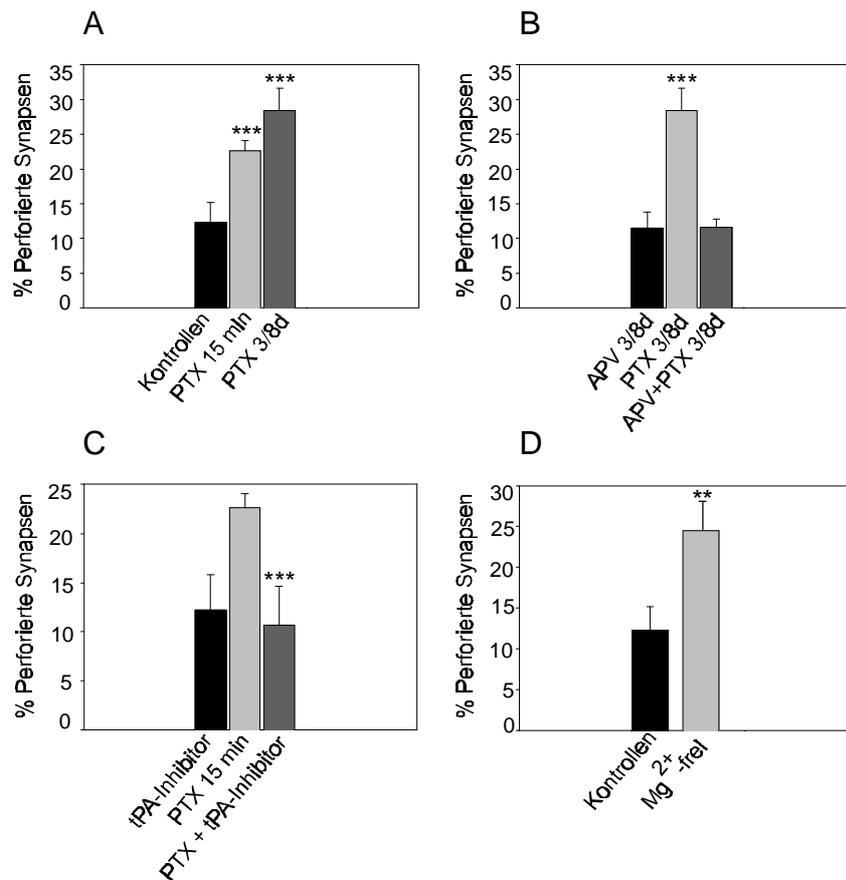


Abbildung 15: Häufigkeit perforierter Synapsen nach unterschiedlichen Behandlungen. A: 15-minütige Stimulation mit Picrotoxin führte zu einem signifikanten Anstieg in der Anzahl der perforierten Synapsen. Durch 3/8-tägige Stimulation nahm der Anteil der perforierten Synapsen weiter zu. B: Die durch Picrotoxin bedingte Zunahme der Häufigkeit der perforierten Synapsen, wurde durch den NMDA-Rezeptor Antagonisten APV vollständig unterbunden. Co-Applikation von Picrotoxin und APV führte zu einer der alleinigen APV-Applikation ähnlichen Verteilung der perforierten Synapsen. C: Die durch kurzzeitige Picrotoxin Stimulation bedingte Zunahme der perforierten Synapsen wurde durch tPA-Inhibitoren selektiv geblockt. Co-Applikation von Picrotoxin und tPA-Inhibitor führte zu einer Verteilung der perforierten Synapsen ähnlich wie in den mit tPA-Inhibitor behandelten Kontrollen. D: Der prozentuale Anteil der perforierten Synapsen wurde durch Stimulation mit 0mM Magnesium und 2.5 mM Calcium gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht.

### 3.2.4 Inhibition der synaptischen Aktivität durch TTX

Inhibition der synaptischen Aktivität durch Langzeitbehandlung mit TTX (8 Tage) führte zu keiner signifikanten Veränderung in der Häufigkeit der perforierten Synapsen. Nach TTX-Behandlung waren  $9.5 \pm 4.5\%$  aller Synapsen perforiert ( $12.3 \pm 2.9\%$  Kontrollgruppen) (s. Tabelle 2, Abbildung 16).

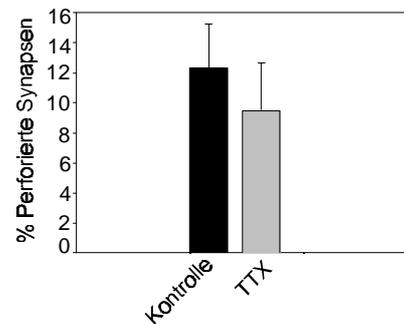


Abbildung 16: Auswirkung der TTX Langzeitbehandlung auf die Häufigkeit der perforierten Synapsen. Im Vergleich zu den Kontrollen kam es zu keiner signifikanten Abnahme der perforierten Synapsen.

## 3.3 Verhältnis von Schaft- und Spinesynapsen in Abhängigkeit von Aktivität

### 3.3.1 Erhöhung der Aktivität durch PicROTOXIN

Schaft- und Spinesynapsen lagen in den Kontrollgruppen im Verhältnis 1:2 vor (s. Abbildung 14). Durch Kurzzeitstimulation mit PicROTOXIN wurde dieses Verhältnis nicht geändert (s. Tabelle 2). Die Gesamtanzahl der Spinesynapsen betrug nach Stimulation  $36.5 \pm 6.4\%$  (Kontrolle:  $34.5 \pm 2.0\%$ ). Es veränderte sich jedoch das Verhältnis perforierter Schaft- zu Spinesynapsen. In den Kontrollen waren 4% aller Spinesynapsen und 17% aller Schaftsynapsen perforiert. Nach Kurzzeitstimulation waren hingegen 13% der Spine- und 28% der Schaftsynapsen perforiert. Der Anteil der perforierten Spinesynapsen an den Spinesynapsen stieg somit von 4% auf 13%, der der perforierten Schaftsynapsen an den Schaftsynapsen von 17% auf 28% an.

Stimulation mit PicROTOXIN für 3/8 Tage verursachte eine leichte, jedoch nicht signifikante Zunahme an Spinesynapsen von  $34.5 \pm 2.0\%$  (Kontrollgruppen) auf  $41.1 \pm 6.0\%$  (s. Abbildung 18A). Nach 3/8-tägiger Stimulation waren 14% aller Spinesynapsen und 38% aller Schaftsynapsen perforiert. Der Anteil der perforierten Spinesynapsen an den Spinesynapsen

stieg somit von 4% auf 14%, der der perforierten Schaftsynapsen an den Schaftsynapsen von 17% auf 38% an (s. Abbildung 17).

Folglich wurde durch kurzzeitige Stimulation eine stärkere Zunahme an perforierten Spinesynapsen bewirkt, während es nach längerer Stimulation zu keinem weiteren Anstieg der perforierten Spinesynapsen jedoch zu einer weiteren Zunahme der perforierten Schaftsynapsen kam.

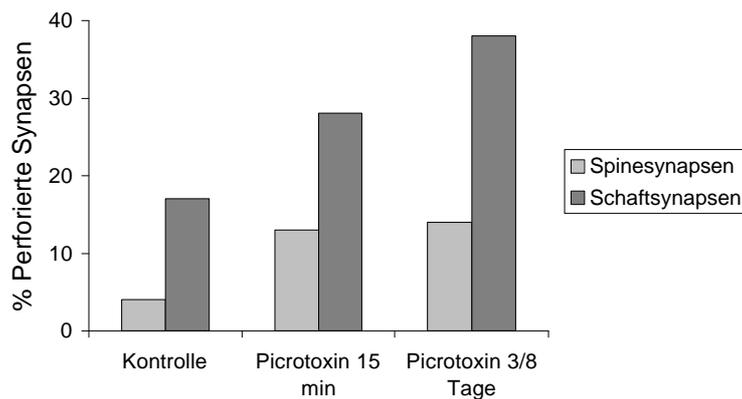


Abbildung 17: Verteilung von perforierten Spine- und Schaftsynapsen in Abhängigkeit der Stimulationsdauer. Durch Kurzzeitstimulation nahmen sowohl die perforierten Spinesynapsen als auch die perforierten Schaftsynapsen zu. Langzeitstimulation hingegen bewirkte vor allem die Zunahme der perforierten Schaftsynapsen.

### 3.3.2 Rolle des NMDA-Rezeptors

Block des NMDA-Rezeptors mit APV führte zu keiner Veränderung in der Verteilung der Spine- und Schaftsynapsen (s. Tabelle 2). Das Verhältnis von Spine- zu Schaftsynapsen blieb auch bei der Co-Applikation von Picrotoxin und APV unverändert.  $30.2 \pm 4.5\%$  aller Synapsen waren Spinesynapsen. Davon waren wie in den Kontrollgruppen 4% perforiert. Von den  $69.8 \pm 4.5\%$  Schaftsynapsen waren 15% perforiert (s. Tabelle 2). Nach Picrotoxin-Applikation waren 14% aller Spinesynapsen und 38% aller Schaftsynapsen perforiert. Co-Applikation von Picrotoxin und APV bewirkte eine signifikante Abnahme der perforierten Spinesynapsen auf 4% und der perforierten Schaftsynapsen auf 15%. Ferner sank die Anzahl der Spinesynapsen von  $41.1 \pm 6.0\%$  auf  $30.2 \pm 4.5\%$  (s. Abbildung 18B).

Kurzzeitige Stimulation des NMDA-Rezeptors durch Aufhebung des Magnesiumblockes und erhöhter Calciumkonzentration führte zu keinem Anstieg der Spinesynapsen. Das Verhältnis von Schaft- zu Spinesynapsen betrug wie bei den Kontrollen 1:2 (s. Tabelle 2). Es änderte sich jedoch das Verhältnis der perforierten Spine- zu den perforierten Schaftsynapsen. Nach der Stimulation waren 5% der Spinesynapsen perforiert (Kontrolle 4%) und 34% der Schaftsynapsen (Kontrolle 17%) perforiert. Es kam hier somit zu einer signifikanten Zunahme der perforierten Schaftsynapsen ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2$ -Test).

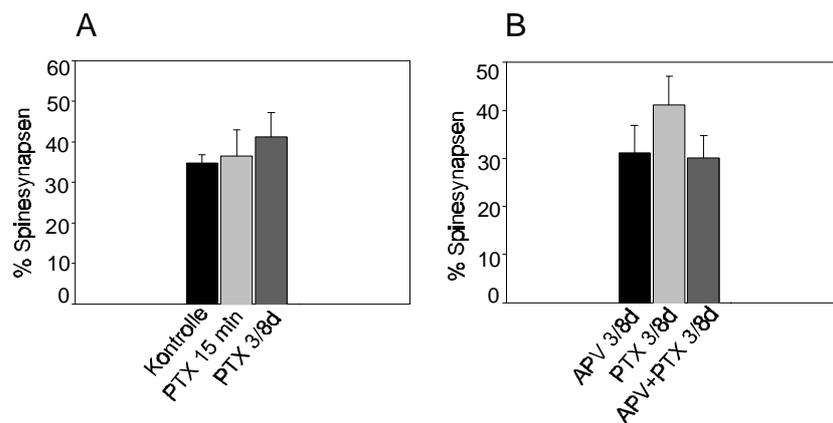


Abbildung 18: Häufigkeit von Spinesynapsen nach Applikation von Picrotoxin (PTX) und APV. A: Die Anzahl der Spines stieg nach Stimulation mit Picrotoxin in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer leicht an. B: Die nach 3/8-tägiger Stimulation mit Picrotoxin bedingte Zunahme an Spinesynapsen wurde durch APV vollständig geblockt. Co-Applikation von APV und Picrotoxin zeigte eine Häufigkeit der Spinesynapsen entsprechend der APV behandelten Kontrollgruppen.

### 3.3.3 Funktion des tPAs

Inkubation der Zellen mit tPA-Inhibitor führte im Vergleich zu den Kontrollen ( $34.7 \pm 2.0\%$ ) zu einer leichten aber nicht-signifikanten Abnahme der Spinesynapsen ( $25.7 \pm 6.4\%$ ). Es wurden jedoch keine perforierten Spinesynapsen gefunden. Hingegen waren wie in den Kontrollgruppen 17% der Schaftsynapsen perforiert (s. Tabelle 2).

Co-Applikation von Picrotoxin und tPA-Inhibitor bewirkte keine signifikante Abnahme der Spinesynapsen ( $27.0 \pm 7.1\%$ ; Kontrolle:  $34.7 \pm 2.0\%$ ). Das Verhältnis von Spine- zu Schaftsynapsen betrug 1:3. Ferner waren nur 1% der Spinesynapsen (Kontrolle: 4%) und 14% der Schaftsynapsen (Kontrolle: 17%) perforiert. Es lag jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen dem Gesamtanteil der perforierten Synapsen ( $10.7 \pm 3.9\%$ ) im Vergleich zu den Kontrollen ( $12.3 \pm 2.9\%$ ) vor. Jedoch wurde die Wirkung des Picrotoxins durch den tPA-Inhibitor

vollständig aufgehoben. Es kam zu einer signifikanten Abnahme der perforierten Spine- und Schaftsynapsen von 5% bzw. 28% (Picrotoxin) auf 1% bzw. 14% ( $p < 0.01$ ;  $\chi^2$ -Test).

### 3.3.4 Inhibition der synaptischen Aktivität durch TTX

8-tägige Inhibition der Aktionspotentiale mit TTX führte zu einer signifikanten Veränderung des Verhältnisses zwischen Spine- und Schaftsynapsen ( $p < 0.001$ ;  $\chi^2$ -Test). Lediglich  $9.0 \pm 4.4\%$  aller Synapsen waren Spinesynapsen (s. Abbildung 19). Die restlichen  $91.0 \pm 4.4\%$  waren Schaftsynapsen. Somit betrug das Verhältnis von Spine- zu Schaftsynapsen 1:10 anstelle von 1:2 (Kontrollen).

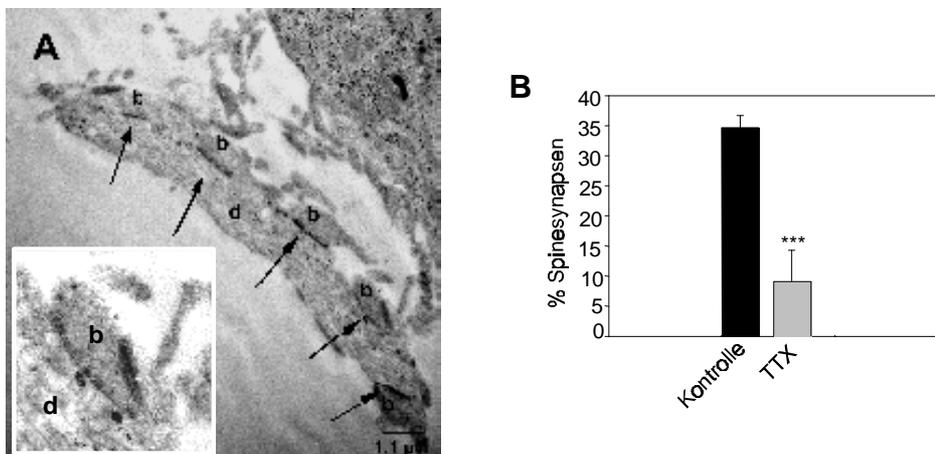


Abbildung 19: Auswirkungen der TTX Langzeitbehandlung auf die Häufigkeit der Spinesynapsen. A: Nach 8-tägiger TTX-Behandlung nahm der prozentuale Anteil der Spinesynapsen signifikant ab. Es kamen fast nur noch Schaftsynapsen vor. Bild A zeigt, daß die Boutons (b) direkt auf den Dendriten (d) Synapsen ausbildeten. B: zeigt die signifikante Abnahme der Spinesynapsen nach TTX-Langzeitbehandlung.

### 3.4 Synaptische Parameter in Abhängigkeit von Aktivität

Weder Erhöhung noch Erniedrigung der synaptischen Aktivität hatten eine signifikante Veränderung eines synaptischen Parameters zur Folge (s. Tabelle 3). Die PSD-Längen bewegten sich von  $0.39 \pm 0.04 \mu\text{m}$  (Kontrollen) bis maximal  $0.46 \pm 0.09 \mu\text{m}$  (Magnesium-freies Medium). Ebenso verhielten sich die Längen der gesamten Kontaktzonen. Es wurden Kontaktzonenlängen von  $0.76 \pm 0.04 \mu\text{m}$  (Kontrollgruppen) bis maximal  $0.81 \pm 0.04 \mu\text{m}$  (Magnesium-freies Medium) gemessen. Demzufolge wies der Assoziationsindex auch keine Signifikanzen auf.

Die Boutonflächen variierten zwischen  $0.62 \pm 0.03 \mu\text{m}^2$  (Kontrollen) bis  $0.73 \pm 0.07 \mu\text{m}^2$  (tPA-Inhibitoren). Das Verhältnis von Mitochondrien- zu Boutonflächen betrug gemäß dem „ultrastrukturellen Größenprinzip“ 1:10 (Pierce and Lewin, 1983).

Tabelle 3: Synaptische Parameter in Abhängigkeit von Aktivität.

Synaptische Parameter	Kontrollen	PTX 15 min	PTX 3/8 Tage	APV 3/8 Tage	PTX+ APV 3/8 Tage	tPA-Inhibitor 15 min	PTX+ tPA-Inhibitor 15 min	Mg <sup>2+</sup> -feies Medium 15 min	TTX 8 Tage
PSD-Länge ( $\mu\text{m}$ )	$0.39 \pm 0.04$	$0.39 \pm 0.06$	$0.42 \pm 0.05$	$0.38 \pm 0.02$	$0.42 \pm 0.03$	$0.42 \pm 0.04$	$0.42 \pm 0.05$	$0.46 \pm 0.09$	$0.39 \pm 0.03$
Kontaktzonenlänge ( $\mu\text{m}$ )	$0.76 \pm 0.04$	$0.75 \pm 0.19$	$0.78 \pm 0.04$	$0.78 \pm 0.10$	$0.77 \pm 0.09$	$0.79 \pm 0.11$	$0.81 \pm 0.04$	$0.79 \pm 0.05$	$0.78 \pm 0.09$
Assoziationsindex (%)	$51.1 \pm 4.21$	$52.1 \pm 2.97$	$53.2 \pm 4.34$	$48.1 \pm 6.22$	$54.1 \pm 3.78$	$54.5 \pm 7.43$	$52.3 \pm 4.90$	$58.2 \pm 5.43$	$50.0 \pm 0.76$
Boutonfläche ( $\mu\text{m}^2$ )	$0.62 \pm 0.03$	$0.66 \pm 0.03$	$0.67 \pm 0.04$	$0.73 \pm 0.03$	$0.73 \pm 0.04$	$0.73 \pm 0.07$	$0.66 \pm 0.33$	$0.59 \pm 0.08$	$0.75 \pm 0.05$
Mitochondrienfläche ( $\mu\text{m}^2$ )	$0.07 \pm 0.01$	$0.07 \pm 0.01$	$0.08 \pm 0.01$	$0.07 \pm 0.01$	$0.07 \pm 0.03$	$0.07 \pm 0.02$	$0.06 \pm 0.02$	$0.06 \pm 0.01$	$0.08 \pm 0.01$

In dieser Tabelle sind die PSD- und Kontaktzonenlängen sowie die Fläche von Boutons und Mitochondrien nach Behandlung mit verschiedenen Pharmaka aufgelistet. Es konnten keine signifikanten Veränderungen in der Länge der PSD und der gesamten Kontaktzone noch in den Bouton- oder Mitochondrienflächen festgestellt werden.

### 3.5 Elektrophysiologische Untersuchungen

Erhöhung der synaptischen Aktivität durch den GABA<sub>A</sub>-Antagonisten Picrotoxin bewirkte gegenüber den unstimulierten Kontrollen (s. Abbildung 20A) eine starke Erhöhung der Spontanaktivität. Die Neurone zeigten ein nahezu ununterbrochenes Spikemuster (s. Abbildung 20B). Co-Applikation von Picrotoxin und APV resultierte in einer der Kontrollen entsprechenden Spontanaktivität (s. Abbildung 20C). Die Neurone zeigten neben vereinzelt Aktionspotentialen kleinere Bursts in unregelmäßigen Zeitabständen.

Die Serinprotease tPA hatte keinen Einfluß auf die Spontanaktivität der Neurone. Applikation von Picrotoxin und tPA zeigte entsprechend der alleinigen Picrotoxinstimulation eine stark erhöhte Spikefrequenz (s. Abbildung 20D).

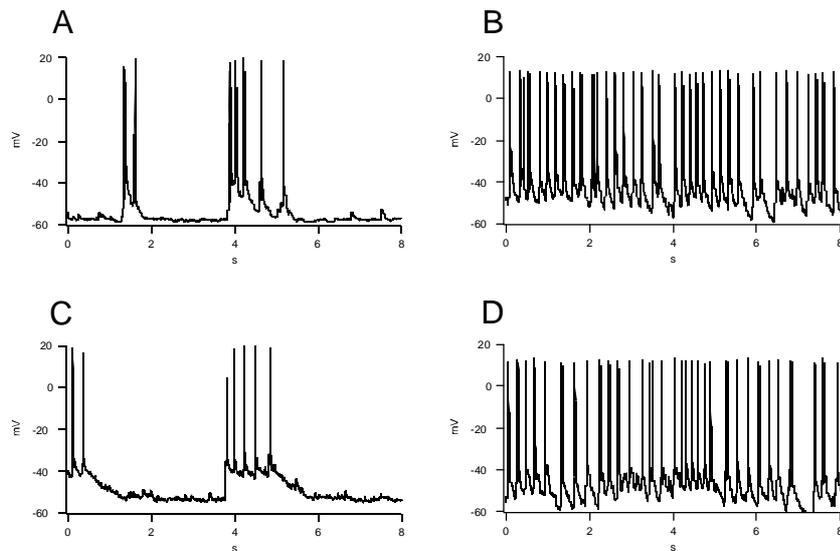


Abbildung 20: Auswirkungen verschiedener Pharmaka auf die Spontanaktivität der Neurone. A: Spontanaktivität in unbehandelten Kulturen. B: Applikation von Picrotoxin führte zu einer starken Erhöhung der Spikesfrequenz. C: Die durch Picrotoxin induzierte Erregbarkeit der Neurone konnte durch APV geblockt werden. D: tPA hatte keinen Einfluß auf die Spontanaktivität der Neurone. Co-Applikation von Picrotoxin und tPA führte zu keiner Veränderung des Spikeverhaltens.

## 4 Diskussion

### 4.1 Perforierte Synapsen

#### 4.1.1 Aktivitätsabhängige Bildung perforierter Synapsen

Mit dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß in Kultur ein direkter Zusammenhang zwischen synaptischer Aktivität und der Häufigkeit perforierter Synapsen besteht. Globale Erhöhung der synaptischen Aktivität mit dem GABA<sub>A</sub>-Antagonisten Picrotoxin oder durch Magnesium-freies Medium, das mit Calcium angereichert wurde, bewirkte eine signifikante Zunahme perforierter Synapsen. Diese Zunahme perforierter Synapsen erfolgte sehr schnell. Bereits nach 15-minütiger Stimulation, wonach die Kulturen für eine Stunde weiter inkubiert wurden, stieg der prozentuale Anteil der perforierten Synapsen um 83% bzw. 98% an. Längere Stimulation mit Picrotoxin für 3 Tage bewirkte einen Anstieg um 129%. Hingegen wurde keine weitere Zunahme der perforierten Synapsen nach 8-tägiger Stimulation festgestellt. In einer 12 Tage alten Kultur sind somit maximal 1/3 aller Synapsen nach einer Stimulation perforiert. Dieses Maximum wird bereits nach 3-tägiger Stimulation erreicht. Da 80% aller perforierten Synapsen bereits nach Kurzzeitstimulation gebildet wurden, ist es nicht auszuschließen, daß die Sättigung an perforierten Synapsen nicht erst nach 3 Tagen sondern schon früher auftritt. Der Mechanismus zur Bildung perforierter Synapsen verläuft folglich sehr schnell und steht, wie die elektrophysiologischen Messungen zeigen, im direkten Zusammenhang mit der Effektivität der synaptischen Übertragung. Bereits eine kurzzeitige Applikation von Picrotoxin führte zu einer sehr hohen Spikefrequenz und einer nahezu ununterbrochenen Burstdauer.

Bislang liegen keine anderen Studien über perforierte Synapsen in Kultur vor, mit denen man diese Ergebnisse direkt vergleichen kann. Die Bedeutung perforierter Synapsen wurde jedoch eingehend im Zusammenhang mit LTP und Kindling (einem Plastizitätsparadigma, das in Zusammenhang mit der Entstehung von Epilepsie diskutiert wird) am Slice oder in *in vivo* untersucht. Buchs und Muller (1996) konnten mit einer Calciumpräzipitationsmethode zeigen, daß 30-40 Minuten nach LTP-Induktion in der CA1-Region des Hippocampus 60% aller vermutlich aktivierten Synapsen perforiert waren. Bei den nicht-aktivierten waren im Vergleich nur 20% perforiert. Geinisman et al. (1988, 1989, 1991, 1992, 1993) fanden, daß sowohl nach Induktion von LTP als auch nach Kindling mehr perforierte Synapsen vorlagen. Sie sahen eine selektive Zunahme der vielfach segmentierten perforierten Synapsen von 53%. Eine Zunahme anderer perforierter Synapsentypen wurde nicht gefunden. Schuster et al. (1990) fanden im Gyrus dentatus der Ratte nach hochfrequenter Reizung eine signifikante Zunahme von

Spinesynapsen mit Spinules. Da Spinules öfters die PSD unterbrechen und als fingerartige Fortsätze in die Präsynapse hineinreichen, könnte dies auch auf eine Zunahme segmentierter PSDs hinweisen. Bolshakov et al. (1997) sahen, daß die Induktion von L-LTP durch Badperfusion von cAMP in einer Zunahme der freigesetzten Transmitterquanten resultierte. Sie führten diese Zunahme auf die Bildung von perforierten Synapsen zurück, denn durch die Perforation wird möglicherweise sowohl die PSD als auch die Präsynapse in voneinander unabhängige Freisetzungszonen unterteilt, wodurch praktisch aus einer Synapse mehrere Synapsen entstehen, die entweder synchron oder unabhängig voneinander Transmitterquanten freisetzen können.

Da nach längerer Applikation von Picrotoxin in Slicekulturen kein LTP mehr induziert werden kann, könnte man vermuten, daß durch Picrotoxin die Schwelle zur LTP-Induktion erreicht wird (Collin et al., 1997). Die Mechanismen, die Picrotoxin hervorruft könnten somit denen der LTP entsprechen. Dies würde für die Übereinstimmung der hier vorliegenden Ergebnisse mit denen nach LTP-Induktion sprechen. Ebenso konnten Hosokawa et al. (1995) nach Perfusion von Slicekulturen mit Medium ohne Magnesium aber mit erhöhter Calciumkonzentration auch kein LTP mehr induzieren. Sie führten diese Tatsache ebenfalls darauf zurück, daß eine Potenzierung bereits induziert worden ist und postulierten, daß die Mechanismen der chemischen und elektrischen Induktion von LTP identisch sein könnten. Diese Erklärung ist wiederum in Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Ergebnissen.

Eine Zunahme an perforierten Synapsen wurde auch in Abhängigkeit von der Umgebung gefunden. Studien ergaben, daß Ratten, die in komplexer Umgebung aufgezogen wurden, mehr perforierte Synapsen im visuellen Cortex aufweisen als isoliert aufgezogene Tiere (Greenough et al., 1987; West und Greenough, 1972; Greenough et al., 1985; Sirevaag und Greenough, 1985).

Perforierte Synapsen können folglich sowohl durch chemische als auch elektrische Stimulation gebildet werden. Sie stehen im direkten Zusammenhang mit LTP und können durch Kindling, verschiedene Reize in der Umgebung oder durch intensives Training entstehen. Die Bildung perforierter Synapsen ist also an Lern- und Erfahrungsvorgänge oder allgemein an Prozesse, die mit hoher synaptischer Aktivität einhergehen, gekoppelt. Man könnte daher folgern, daß perforierte Synapsen für die aktivitätsabhängige Verstärkung der synaptischen Übertragung verantwortlich sind. Die Mechanismen dieser beiden Stimulationsarten sind möglicherweise ähnlich.

Kontrovers zu diesen Daten ist jedoch die Studie von Sorra und Harris (1998), die in der CA1 Region im Hippocampus der Ratte 2 Stunden nach LTP-Induktion keine Veränderungen in

der Verteilung perforierter zu nicht-perforierter Synapsen fanden. Sie schlossen daraus, daß entweder morphologische Veränderungen bei der LTP zu diesem Zeitpunkt keine Rolle spielen oder, daß durch Synaptogenese und Synapsenelimination keine Nettoveränderungen feststellbar sind.

Im Gegensatz zu der schnellen Zunahme der perforierten Synapsen konnte durch Langzeitinhibition synaptischer Aktivität mit TTX kein signifikanter Rückgang bewirkt werden. Die Entfernung oder der Umbau von perforierten Synapsen scheint demzufolge aktivitätsunabhängig sein.

Andererseits könnte in der Kultur genau wie eine maximale Anzahl auch ein gewisses Minimum an perforierten Synapsen immer vorhanden sein, das für die Funktionalität des Systems erforderlich ist. Geht man davon aus, daß die Kontrollgruppen nur knapp über diesem Minimum liegen, so kann durch Langzeitinhibition synaptischer Aktivität nur noch eine geringe Abnahme bis zu diesem Minimum erfolgen. Der Abbau perforierter Synapsen könnte dann trotzdem aktivitätsabhängig sein, aber durch das Erreichen der Mindestanzahl an perforierten Synapsen schnell zum Stillstand kommen.

#### **4.1.2 Funktion perforierter Synapsen**

Wie eben dargestellt, ist das Auftreten perforierter Synapsen an Mechanismen gebunden, welche die synaptische Aktivität erhöhen. Perforierte Synapsen könnten folglich effizientere Synapsen als die nicht-perforierten sein und zur Aufrechterhaltung hoher synaptischer Aktivität wie z.B. der Potenzierung nach LTP-Induktion dienen. Für diese Hypothese spricht die Tatsache, daß perforierte Synapsen im Vergleich zu den nicht-perforierten größer sind. Peters und Kaiserman-Abramof (1969) stellten fest, daß alle Synapsen, deren PSD größer als 250 nm ist, perforiert sind. Bedingt durch die Größe könnte die metabolische Tätigkeit oder der Austausch von Membrankomponenten in diesen Synapsen erhöht sein. Dies könnte zu einem größeren biochemischen Umsatz führen, der in einer verstärkten Vesikelfreisetzung resultiert (Greenough et al., 1978; Peters und Kaiserman-Abramof, 1969; Sirevaag und Greenough, 1985; Vrensen und Nunez-Cardozo, 1981).

Da die Perforation nicht nur auf die Postsynapse beschränkt ist, sondern auch im präsynaptischen Grid auftritt (Vrensen et al., 1980, 1981), könnten durch die Perforation sowohl Prä- als auch Postsynapse in zwei oder mehrere separate aktive Zonen unterteilt werden, die zu voneinander unabhängigen Freisetzungszonen führen könnten (Lisman und Haris, 1993). Dies hätte zur Folge, daß die Freisetzung von Vesikeln an den einzelnen Transmissionszonen simultan erfolgen könnte. Die Amplitude der Miniaturpotentiale würde dann entsprechend der

Anzahl der Perforationen ein vielfaches der normalen sein. Bei normalen nicht-perforierten Synapsen könnten die Miniaturpotentiale entsprechend einer Gauss-Verteilung vorliegen, während bei perforierten hingegen eine multiquantale Verteilung vorkommen könnte (Edwards, 1995; Bolshakov et al., 1998). Durch die Erhöhung der Anzahl der Freisetzungszonen könnte die Exozytose von Transmittern einen größeren Einfluß auf das postsynaptische Potential und somit auf die Wahrscheinlichkeit der Zelle zur Auslösung eines Aktionspotentials haben, wodurch eine effektivere Signalweiterleitung erreicht werden würde.

Perforationen sind folglich keine zufällig gebildeten Zwischenformen, sondern werden im ZNS in Abhängigkeit von Aktivität gebildet, um eine effektivere Übertragung zu gewährleisten. Dies bedeutet, daß die Struktur einer Synapse mit großer Wahrscheinlichkeit mit der Effektivität synaptischer Übertragung korreliert.

### 4.1.3 Häufigkeit perforierter Synapsen

Wie in den vorherigen Abschnitten dargestellt, können perforierte Synapsen in Abhängigkeit von Aktivität gebildet werden. Wie perforierte Synapsen gebildet werden, ist bislang nicht bekannt. Es wurden verschiedene Modelle zur Entstehung der Perforation entwickelt. Bevor jedoch auf diese Modelle eingegangen wird, soll zunächst die Ontogenese perforierter und nicht-perforierter Synapsen betrachtet werden, da sie wichtige Hinweise auf die Entstehung eines Synapsentyps oder die Verbindung zwischen verschiedenen Synapsenarten bringen könnte.

Nach Studien von Itarat und Jones (1992, 1993) kommen perforierte Synapsen bei der Ratte schon in der frühen Synaptogenese (E19) vor, wo die Synapsen noch sehr klein und undifferenziert sind. Die Häufigkeit perforierter Synapsen steigt dann mit dem Alter an. Nach Tag 7 der Geburt liegen bereits 12%, nach 14 Tagen 17% (Itarat und Jones, 1993) bzw. 18% (Jones und Calverley, 1991) vor. Obwohl die Perforationen zu diesem Zeitpunkt zwar noch immer sehr klein und einfach sind, sind perforierte Synapsen bereits größer als nicht-perforierte (Itarat und Jones, 1993). Nach 60 Tagen steigt die Anzahl perforierter Synapsen auf 33%. Nach 22 Monaten liegen noch 27% perforierter Synapsen vor (s. Abbildung 21). Diese perforierten Synapsen sind nun gegenüber den zum Anfang vorliegenden erheblich größer, komplexer und weisen viele Transmissionszonen auf. Perforierte Synapsen unterliegen somit in der Entwicklung deutlichen morphologischen Veränderungen, die mit einem Ausdifferenzierungsvorgang zu vergleichen sind.

Nicht-perforierte Synapsen hingegen kommen in den ersten vier Wochen im deutlichen Überschuß vor. Ihre Anzahl halbiert sich bis zum 4. Monat wieder. Sie erreicht im 7. Monat noch

ein Zwischenmaximum und fällt dann bis zum 10. Monat wieder ab. Vom 10. bis zum 22. Monat bleibt die Anzahl dann konstant (s. Abbildung 21). Untersuchungen der nicht-perforierten Synapsen mittels serieller Rekonstruktion haben gezeigt, daß sie mit zunehmendem Alter keinen strukturellen Modifikationen unterliegen. Sie sind im Vergleich zu den perforierten kleiner und haben eine kontinuierliche PSD. Das Verhältnis perforierter zu nicht-perforierten Synapsen beträgt in der Entwicklung im allgemeinen 1:3.

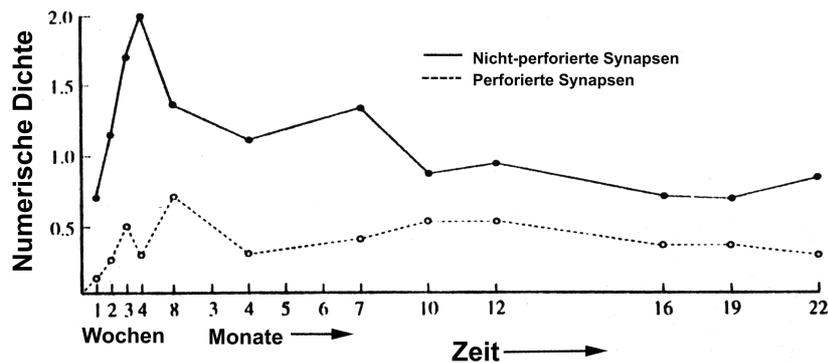


Abbildung 21: Entwicklung perforierter und nicht-perforierter Synapsen in den ersten 22 Monate (aus Calverly und Jones, 1993).

Der in Abbildung 21 gezeigte Kurvenverlauf scheint für jeden Synapsentyp individuell zu sein, da keine Abnahme des einen Synapsentypes mit einer Zunahme des anderen verbunden ist. Dies deutet daraufhin, daß sowohl perforierte als auch nicht-perforierte Synapsen von der frühen Entwicklung an eigenständige Populationen sind. Diese Feststellung ist ein wichtiger Aspekt in Hinblick auf die verschiedenen Modelle zur Entstehung perforierter Synapsen, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden sollen.

Ferner könnte die Tatsache, daß perforierte Synapsen bereits von der frühen Entwicklung an vorliegen und daß es immer ein bestimmtes Verhältnis zwischen perforierten und nicht-perforierten Synapsen gibt, darauf hindeuten, daß ein gewisser prozentualer Anteil an perforierten Synapsen zur Aufrechterhaltung der normalen Funktionen des ZNS erforderlich ist. Diese Annahme stände auch im Kontext mit der Langzeitinhibition synaptischer Aktivität, denn durch TTX konnte ein gewisses Minimum perforierter Synapsen nicht unterschritten werden. Hingegen kann das Verhältnis zwischen perforierten und nicht-perforierten Synapsen offensichtlich durch Lern- und Erfahrungsprozesse temporär verändert werden.

#### 4.1.4 Modelle zur Entstehung perforierter Synapsen

Viele Wissenschaftler haben versucht, die Entstehung perforierter Synapsen mit Hilfe von Modellen zu erklären. In den 80er Jahren glaubte man, daß perforierte Synapsen Zwischenstufen im Prozeß der Synapsenregenerierung und Erneuerung sind (Nietro-Sampedro et al., 1982; Carlin und Siekevitz, 1983; Dyson und Jones, 1984; Petit, 1988). Zu dieser Hypothese sind unterschiedliche Modelle entwickelt worden, die aber alle die Ansicht teilen, daß perforierte Synapsen aus nicht perforierten Synapsen entstehen. Es wurde angenommen, daß sich die nicht-perforierten Synapsen im Laufe der Entwicklung vergrößern, irgendwann Perforationen aufweisen und sich dann in zwei neue nicht-perforierte Synapsen teilen (s. Abbildung 22).

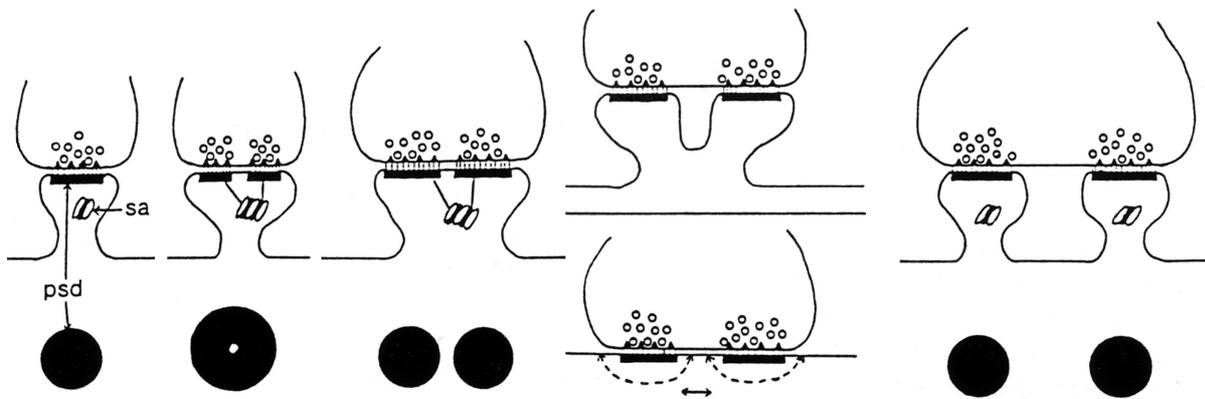


Abbildung 22: Splitting-Modell nach Carlin und Siekevitz (1983). Eine kleine nicht-perforierte Synapse (die PSD ist eine durchgehende Fläche) vergrößert sich zu einer perforierten Synapse, die zunächst nur eine kleine Perforation hat. Die perforierte Synapse wird dann größer und weist getrennte PSD-Flächen auf. Anschließend teilt sich die Synapse und es entsteht zunächst ein „branched“ Spine. Dieser kann sich dann in zwei separate Spines, die einen gemeinsamen Bouton als Präsynapse besitzen, teilen. Er kann sich aber auch erst in den Schaft zurückziehen, so daß eine perforierte Schafsynapse entsteht. Aus dieser perforierten Schafsynapse können sich dann wiederum zwei neue Spinesynapsen bilden.

Nach diesem Modell würden perforierte Synapsen nur eine Zwischenstufe in einem Kreislauf zur Bildung neuer Synapsen darstellen. Sie würden also lediglich als ein Erneuerungsmechanismus für die nicht-perforierten Synapsen fungieren. Die dominante Position läge somit bei den nicht-perforierten Synapsen. Diese Hypothese würde zwar beschreiben, warum perforierte Synapsen größer als nicht-perforierte Synapsen sind, sie wird aber der Funktion perforierter Synapsen bei aktivitätsabhängigen Vorgängen nicht gerecht, da die Effizienz dieser Synapsen nicht berücksichtigt wird. Gegen diese Hypothese spricht auch, daß bislang keine

Beweise erbracht werden konnten, die zeigen, daß perforierte Synapsen sich zu nicht-perforierten teilen. Bei den zahlreichen Untersuchungen, die bislang durchgeführt wurden, hätte die Teilung der perforierten Synapsen (synapse-splitting) statisch gesehen erfaßt werden müssen. Da es auch im heutigen Zeitalter der Wissenschaft immer noch nicht möglich ist, ein Monitoring ultrastruktureller Verbindungen durchzuführen, sind morphologische Untersuchungen jedoch weiterhin durch die Tatsache limitiert, daß nur Momentaufnahmen von Strukturen und keine Zeitabfolgen aufgenommen werden können. Man könnte daher argumentieren, daß dieses „synapse-splitting“ so schnell abläuft, daß es schwierig ist, diesen Vorgang zu erfassen. Dann müßte man aber zumindest im Gewebe vermehrt verzweigte (branched) Spines, die den gleichen Bouton als Präsynapse haben, finden. Diese konnten ebenso nicht gefunden werden (Sorra et al., 1998). Außerdem müßte man, wenn perforierte Synapsen die Vorstufen von nicht-perforierten sind, in Zeiten hoher synaptischer Aktivität eine Zunahme perforierter Synapsen sehen. Untersuchungen im Hippocampus an 15 Tage alten Tieren, wo die Synaptogenese sehr stark ist, zeigten jedoch keine Zunahme an perforierten Synapsen. Es konnte lediglich eine leichte Zunahme der nicht-perforierten gesehen werden (Itarat und Jones, 1992, 1993; Sorra et al., 1998). Aufgrund der hier aufgeführten Argumente erscheinen diese Splitting-Modelle als sehr unwahrscheinlich.

Geinisman et al. (1993) entwickelten ein weiteres Modell, wonach bereits bestehende nicht-perforierte synaptische Verbindungen in Abhängigkeit von Aktivität in perforierte umgewandelt werden (s. Abbildung 23). Da es verschiedene Formen der Perforation gibt (s. 1.3.1), werden auch in diesem Modell mehrere Zwischenstufen durchlaufen. Aus einer nicht-perforierten Synapse wird zunächst eine „fenestrierte“ perforierte Synapse gebildet, die dann in eine „hufeisenförmige“ übergeht, bis letztendlich einzelne, segmentierte PSDs vorliegen. Insgesamt können sechs verschiedene Intermediärzustände durchlaufen werden, je nachdem ob im postsynaptischen Spine ein Spinule vorliegt oder nicht. Eine Erweiterung dieses Modells (Geinisman et al., 1996) sieht vor, daß perforierte Synapsen auf Spines sich auch wieder in den Schaft zurückziehen können.

Neu an dem Geinisman-Modell ist, daß perforierte Synapsen keine Intermediate zur Herstellung neuer Synapsen mehr darstellen, sondern wichtige Ultrastrukturen sind, die aktivitätsabhängig gebildet werden. Die perforierten Synapsen haben in diesem Modell die dominante Stellung. Ferner kommt es nicht zu einem Splitting, wodurch die Anzahl der Synapsen vergrößert wird, sondern nur zu einer internen Umstrukturierung bei der die Anzahl der Synapsen konstant bleibt. Dieses Modell steht daher in Einklang mit Studien, die keine Veränderung der Synapsenzahlen sehen (Lee et al., 1980; Chang und Greenough, 1984; Desmond und Le-

vy, 1986 a/b, 1988, 1990; Schuster et al., 1990; Geinisman et al., 1991, 1993, 1996; Hosowaka et al., 1995; Buchs und Muller, 1996).

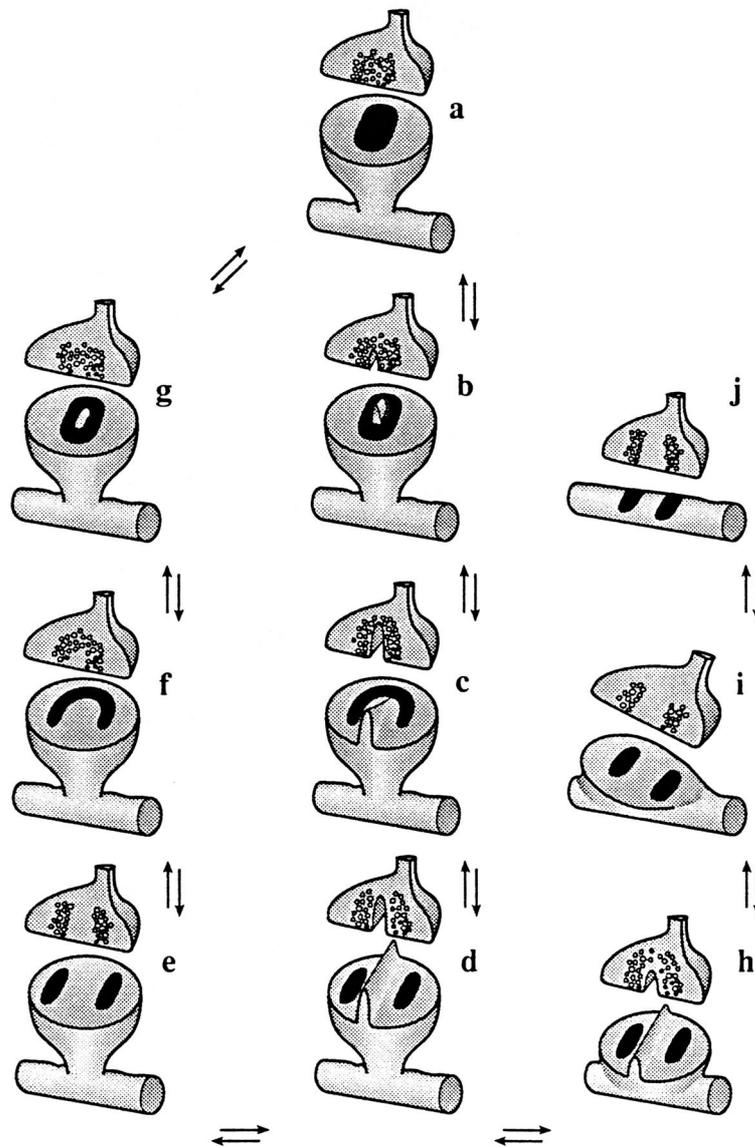


Abbildung 23: Modell zur Bildung perforierter Synapsen nach Geinisman et al. (1996). Bei einer nicht-perforierten Synapse (a) wird durch ein Spinule ein Loch in der PSD (b) und dann eine hufeisenförmige Perforation gebildet (c), bis sich die PSD komplett teilt (d). Aus dieser segmentierten Spinesynapse kann eine äquivalente PSD-Form ohne Spinule entstehen (e), die sich in eine hufeisenförmige (f) und dann weiter in eine fenestrierte (g) umwandeln kann. Auf der anderen Seite kann aus der segmentierten Spinesynapse mit Spinule (d) eine segmentierte Schaftsynapse entstehen, indem sich der Spine in den Schaft zurückzieht. Es entsteht dabei erst ein Spine ohne Hals (h), anschließend eine Zwischenform, bei der sich der Spine schon zur Hälfte in den Schaft gezogen hat (i) und letztendlich eine perforierte Schaftsynapse (j).

Dieses Modell wird zwar meiner Vorstellung der Funktion perforierter Synapsen gerecht, aber es enthält genau wie auch die vorherigen Modelle eine Reihe von Unstimmigkeiten. Kontrovers sind z.B. die Spinules, die in diesem Modell zur Perforation von Synapsen führen, denn Spinules sind nicht spezifisch für perforierte Synapsen. Sie kommen nur zu 33% bei perforierten Synapsen vor (Sorra et al., 1998). Des Weiteren konnte nie die Umwandlung von einer PSD-Form in eine andere gezeigt werden. Dieses interne Remodelling ist daher genauso kritisch, wie das Splitting bei den anderen Modellen zu betrachten.

#### **4.1.5 Molekulare Mechanismen der Synapsenperforation**

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sind NMDA-Rezeptoren und die Serinprotease tPA wichtige Faktoren bei der Bildung der Perforation. In diesem Abschnitt soll daher auf die Wirkungsweise dieser Komponenten bei den Mechanismen der Perforation eingegangen werden.

##### **4.1.5.1 tPA**

Mit dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß die Serinprotease tPA eine wichtige Rolle bei der Bildung perforierter Synapsen spielt. Denn durch tPA-Inhibitoren konnte der durch Picrotoxin bedingte Anstieg der perforierten Synapsen selektiv geblockt werden.

tPA spielt auch eine wichtige Rolle bei synaptischer Plastizität und die Expression wird nach Applikation von Forskolin (einem Aktivator der cAMP-abhängigen Zykklase), cAMP und nach Induktion von LTP (Qian et al., 1993) hochreguliert. Erhöhte tPA-Gehalte hat man auch im Cerebellum nach intensivem, motorischen Lernen gefunden (Seeds et al., 1995). Ebenso konnte gezeigt werden, daß tPA Knock-out Mäuse kein L-LTP (Frey et al., 1996; Huang et al., 1996) zeigen. Die Expression von tPA ist somit aktivitätsabhängig und scheint genau wie bei den perforierten Synapsen eine essentielle Rolle bei der LTP zu spielen. Die Tatsache, daß tPA an beiden Vorgängen beteiligt ist erscheint sehr plausibel, da das Auftreten perforierter Synapsen und LTP eng miteinander verknüpft sind oder sich sogar gegenseitig bedingen.

Es stellt sich nun die Frage, wie tPA an der Bildung perforierter Synapsen mitwirken könnte. Die elektrophysiologischen Messungen zeigen, daß tPA nicht durch Modulation der Spontanaktivität der Neurone agiert (siehe auch Baranes et al., 1998; Griesinger und Müller, 1998). Es müssen folglich rein proteolytische Prozesse ablaufen. Es ist bekannt, daß tPA die Adhäsionsfähigkeit von Neuriten verringert und Moleküle der extrazellulären Matrix schneidet (Seeds et al., 1990, Sumi et al., 1992). Da tPA in einigen synaptischen Boutons vorkommt (Griesinger und Schweizer, 1997) und aktivitätsabhängig freigesetzt wird (Gualandris et al.,

1996) wäre es denkbar, daß es an der Synapse Adhäsionsmoleküle, die für den Zusammenhalt der Synapse mit der extrazellulär Matrix beteiligt sind, oder sogar Zelladhäsionsmoleküle im synaptischen Spalt schneidet und dadurch die Bildung der Perforation ermöglicht. In der Tat konnte gezeigt werden, daß tPA eine hochkonservierte Sequenz in der extrazellulären Domäne von neuronalen Zelladhäsionsmolekülen (NCAMs) erkennt, die zur Abspaltung eines spezifischen 75 kDa Fragmentes führt (Hoffman et al., 1998a/b). Endo et al. (1998) stellten fest, daß das tPA-Plasminsystem das embryonale NCAM (s. 4.1.5.3) innerhalb einer Stunde schneidet und der Vorgang durch den Plasmininhibitor-1 selektiv blockiert werden kann. Hoffman et al. (1998a) kamen zu der Erkenntnis, daß durch tPA-Inhibition keine 75 kDa-Fragmente mehr nachgewiesen aber auch kein LTP mehr induziert werden kann. Dies deutet daraufhin, daß das Schneiden von NCAMs, ein entscheidender Schritt bei der LTP-Induktion und auch bei der Bildung perforierter Synapsen ist.

NCAM-Fragmente wurden jedoch auch bereits nach 30 Sekunden Stimulation von NMDA-Rezeptoren mit NMDA gefunden (Hoffman et al., 1998a/b). Da dieser Fragmentierungsvorgang durch APV selektiv geblockt werden kann, wird die proteolytische Aktivität von tPA offensichtlich nur über den NMDA-Rezeptor reguliert. Wie dieser Regulierungsmechanismus verläuft ist nicht bekannt. Hoffman et al. (1998b) schlugen vor, daß durch den Influx von Calciumionen in die Postsynapse Second-Messenger Kaskaden aktiviert werden, welche die Zelladhäsionsmoleküle für eine Spaltung zugänglicher machen könnten. Auf der anderen Seite könnte tPA erst durch die Aktivierung des NMDA-Rezeptors sekretiert werden. Dann müßte jedoch eine Korrespondenz zwischen post- und präsynaptischer Seite in Form eines retrograden Messengers vorliegen. Dieser könnte wiederum durch den Einfluß von Calciumionen durch die NMDA-Rezeptoren aktiviert werden.

In Anbetracht der Tatsache, daß der NMDA-Rezeptor genau wie tPA eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Perforation und bei LTP spielt, erscheint ein Zusammenspiel der NMDA-Rezeptoren und tPA als nicht unwahrscheinlich.

Das Schneiden der Zelladhäsionsmoleküle durch tPA ist möglicherweise ein für die Bildung der Perforation wichtiger Faktor. Es ist zwar bekannt, daß durch tPA auch verschiedene Wachstumsfaktoren wie z.B. der Hepatozytenwachstumsfaktor HGF (Naldini et al., 1995; Thewke und Seeds, 1996), extrazelluläre Wachstumsfaktoren, wie TGF- $\beta$  (transforming growth factor; Brauer and Yee, 1993), IGF (insulin-like growth factor; Campbell et al., 1992) oder bFGF (basic fibroblast growth factor; Sankela und Rifkin, 1990) oder sogar intrazelluläre Signalkaskaden (Pittman et al., 1989; Verall und Seeds, 1989) aktiviert werden, aber es

liegen keine Hinweise vor, daß diese Faktoren im Zusammenhang mit der Bildung perforierter Synapsen stehen. Sie spielen vermutlich eher eine Rolle beim Neuritenwachstum.

#### 4.1.5.2 NMDA-Rezeptoren

Wie eben bereits im Zusammenhang mit tPA diskutiert und wie die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, spielen die NMDA-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Bildung perforierter Synapsen. Die Beteiligung des NMDA-Rezeptors an Prozessen der synaptischen Plastizität wurde ebenso in Studien über LTP (Artola und Singer, 1987; Collingridge et al., 1993; Harris et al., 1984), Kindling (Peterson et al., 1984; Slater, 1995) sowie räumlichem Lernen (Morris et al., 1986) gezeigt.

Wie könnten NMDA-Rezeptoren an der Bildung perforierter Synapsen beteiligt sein? Da der NMDA-aktivierte Strom hauptsächlich von Calciumionen getragen wird, ist eine weitere Beteiligung des NMDA-Rezeptors vermutlich primär auf die intrazelluläre Zunahme von Calciumionen zurückzuführen (Alford et al., 1993; Perkel et al., 1993). Es liegen Hinweise vor, daß der Einfluß von Calciumionen in die Postsynapse, die Aktivierung bislang nicht aktiver Synapsen (silent synapses) sowie die Insertion neuer AMPA-Rezeptoren in die PSD bedingt. Bindung der Calciumionen mittels EGTA (1,2-Bis-(2-aminoethoxy ethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) oder Blockade der NMDA-Rezeptoren mit APV verhinderten diesen Vorgang (Liao et al., 1995; Durand et al., 1996).

Ferner werden durch den Einstrom von Calciumionen Proteinkinasen in der PSD, wie z.B. PKC oder die CaMK II aktiviert. Substrate dieser Enzyme sind u.a. zahlreiche Zytoskelettproteine, wodurch Veränderungen in der Postsynapse bewirkt werden können (Coss und Perkel, 1985; Fifkova, 1987; Fifkova und Moralis, 1991; Harris und Kater, 1994; Segal, 1995a). Es wird angenommen, daß die Zytoskelettproteine Actin (Crick, 1982), Myosin (Morales und Fifkova, 1989), Spektrin und die Mikrotubuli assoziierten Proteine (Aoki und Siekevitz, 1985, 1988; Lynch und Baudry, 1987) sowie Calpain (Lynch und Baudry, 1987) an der Veränderung der Spinekonformation beteiligt sind. Siman et al. (1984) beobachteten, daß Spektrin, ein Hauptbestandteil des Zytoskeletts und ein Aktin/Calmodulinbindendes Protein durch die Calcium-aktivierte Protease Calbindin I degradiert wird. Sie nahmen an, daß durch diesen Mechanismus die Struktur des Zytoskeletts anhaltend verändert werden könnte. Da durch solche Proteolyse die Starrheit eines Spines herabgesetzt wird, könnten dadurch Veränderungen in der Spineorientierung, die wiederum mit Modifikationen synaptischer Verbindungen einhergehen könnten, bewirkt werden (Hosowaka et al., 1995). Ebenso wurde gezeigt, daß die PKC an der schnellen und reversiblen Bildung von Spinules mitbeteiligt ist (Weiler et al., 1991).

Der NMDA-Rezeptor ist somit an der Regulation proteolytischer Aktivitäten, die zur Fragmentierung von Zelladhäsionsmolekülen führen, an der Aktivierung bereits vorhandener Rezeptoren und der Insertion neuer Rezeptoren in die PSD, am Umbau der PSD und der Anpassung des postsynaptischen Zytoskeletts an die neue PSD-Form involviert.

#### 4.1.5.3 Zelladhäsionsmoleküle

Wie bereits im Kontext mit tPA gezeigt, spielen Zelladhäsionsmoleküle bei der Bildung von Perforationen eine wichtige Rolle (Mayford et al., 1992). Dies erscheint plausibel, da Zelladhäsionsmoleküle für den Zusammenhalt der Zellen untereinander sowie für die Verbindung der Zellen mit dem internen Zytoskelett verantwortlich sind. Sie bestimmen im Endeffekt die Struktur des Gewebes. Zelladhäsionssysteme könnten somit als Faktoren betrachtet werden, die bei der Übersetzung der genetischen Information in die komplexe dreidimensionale Anordnung von Zellen im Gewebe helfen (Gumbiner, 1996).

Wie könnten Zelladhäsionsmoleküle an der Bildung der Perforation mitwirken? Da bei der Bildung von Perforationen zusätzliches Vesikelmaterial in Prä- und Postsynapse eingebaut werden muß, könnten die Verbindungen der Zelladhäsionsmoleküle zwischen der Prä- und Postsynapse gelockert werden und die Zelladhäsionsmoleküle auseinander gleiten, um Platz für das neue Membranmaterial zu schaffen. In diesem Zusammenhang wurde in verschiedenen Studien die Funktion des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM eingehender untersucht. Das besondere an NCAM ist, daß es verschiedene Formen von diesem Molekül gibt, die unterschiedliche Funktionen haben. In der Entwicklung wird NCAM mit einem linearen Homopolymer bestehend aus negativ geladenen N-Acetylneuraminsäureresten (polysialic acid; PSA), das an die fünfte Immunglobulin-domäne gebunden ist, exprimiert (Finne et al., 1983), während im Alter diese sialisierte Form zunehmend durch die nicht-sialisierte ersetzt wird (Edelman, 1986). Da gerade in der Entwicklung verstärkt synaptische Kontakte auf- und umgebaut werden, könnte PSA-NCAM an diesen Prozessen beteiligt sein. Es konnte auch tatsächlich gezeigt werden, daß durch die PSA-Kette aus sterischen Gründen die homophile Bindung von NCAM beeinflußt wird, wodurch die Adhäsionskraft um Faktor 3-4 abnimmt (Crossin et al., 1984; Hoffman und Edelman, 1983). Der PSA-Rest fungiert also praktisch als Inhibitor der Zelladhäsion bzw. zur Auflockerung bestimmter Strukturen (Rutishauser et al., 1988; Acheson et al., 1991).

Interessanter Weise wird die Expression von PSA-NCAM in Abhängigkeit von Aktivität reguliert. Es konnte gezeigt werden, daß die Expression durch TTX inhibiert und durch Bicuculline oder hohe Konzentrationen an Kalium beschleunigt wird (Doherty et al., 1990; Kiss

et al., 1993, 1994; Muller et al., 1996). Ferner konnte gezeigt werden, daß diese Sialisierung reversibel ist und innerhalb einer Stunde erfolgt (Kiss et al., 1994). Neben diesem Sialisierungsmechanismus kann PSA-NCAM auch durch regulierte Exozytose an die Zelloberfläche gebracht werden (Kiss et al., 1994). Dies ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß PSA-NCAM sowohl prä- als auch postsynaptisch nachgewiesen werden konnte (Muller et al., 1996; Schuster et al., 1998).

Ferner ist eine verstärkte Zunahme an PSA-NCAM nach LTP-Induktion festgestellt worden (Fazeli et al., 1994; Becker et al., 1996; Muller et al., 1996; Kramer et al., 1997; Schuster et al., 1998) und es konnte gezeigt werden, daß durch Inhibition von NCAM durch Antikörper oder Abspaltung des PSA-Restes durch das Enzym Endoneuraminidase (Endo-N) die Induktion von sowohl LTP als auch LTD reversibel geblockt wird (Lüthi et al., 1994; Muller et al., 1996). Da PSA-NCAM eine essentielle Rolle bei der Induktion von LTP spielt und LTP wiederum mit der Bildung von perforierten Synapsen verbunden ist, könnte man postulieren, daß durch die Expression von PSA-NCAM die Bildung perforierter Synapsen und die Induktion von LTP erst ermöglicht wird. Dies könnte wie folgt ablaufen: In Abhängigkeit von Aktivität wird verstärkt PSA-NCAM exprimiert, entweder durch *de novo* Synthese oder durch die Umwandlung von NCAM in die sialisierte, embryonale Form. Da durch PSA-NCAM die Adhäsion der Zelladhäsionsmoleküle verringert wird, wird die Struktur zwischen Prä- und Postsynapse aufgelockert. Infolgedessen kann Membranmaterial, das zur Bildung der Perforation führt, eingebaut werden. Anschließend werden die neu geformten Strukturen wieder stabilisiert, indem PSA-NCAM wieder zu NCAM umgewandelt wird. Dieser Mechanismus ist noch stark vereinfacht. Vermutlich kann nur durch die Auflockerung der Zelladhäsionsmoleküle infolge der Expression von PSA-NCAM und dann durch ein zurecht Schneiden dieser Moleküle mittels des tPA/Plasminsystems, die Bindung zwischen Prä- und Postsynapse ausreichend gelöst werden. Erst nach diesen Schritten kann dann das zur Perforation benötigte Membranmaterial eingebaut werden. Für ein Zusammenspiel zwischen dem tPA-Plasminsystem und PSA-NCAM spricht auch die Tatsache, daß PSA-NCAM in der Entwicklung und in der frühen postnatalen Phase stark exprimiert wird, genau zu einem Zeitpunkt, wo auch die tPA-Aktivität sehr groß ist.

Ebenso ist es nicht auszuschließen, daß infolge der aktivitätsabhängigen Expression von PSA-NCAM durch homophile und heterophile Interaktionen auch noch zusätzlich intrazelluläre Mechanismen und Second-Messenger Kaskaden angeschaltet werden, die wichtig bei der Umstrukturierung der PSD sein könnten (Schuch et al., 1989; Klinz et al., 1995; Williams et al., 1995).

Zelladhäsionsmoleküle wären nach dieser Hypothese somit nicht nur an elementaren entwicklungsbedingten, strukturellen Veränderungen wie z.B. Zell-Zell-Interaktionen einschließlich Zellmigration, Axonwachstum, bei der Wegfindung, dem Auswachsen (sprouting) und Regenerierung beteiligt (Edelman, 1986; Rutishauser et al., 1988; Rougon et al., 1993; Doherty et al., 1995; Keynes und Cook, 1995) sondern auch an der Bildung von perforierten Synapsen. Es wurde bereits spekuliert, ob Zelladhäsionsmoleküle sogar generell bei struktureller Plastizität eine wichtige Rolle spielen (Bailey und Kandel, 1993; Rougon et al., 1993; Doherty et al., 1995).

#### 4.1.5.4 Membranmaterial

Es stellt sich nun die Frage, wo das für die Bildung der Perforation benötigte Membranmaterial herkommen könnte. Eine Möglichkeit wäre, daß zur Bildung der Perforation einfach Vesikelmembranmaterial in die PSD eingebaut wird (Maletic-Savatic et al., 1995; Spacek und Harris, 1997; Lledo et al., 1998). Wie bei der Exozytose von Vesikeln, könnten dabei die Adhäsionsmoleküle, welche die Prä- und Postsynapse miteinander verbinden, zur Seite gleiten, um den Vesikeln die Fusion mit der Plasmamembran zu ermöglichen. Dieser Mechanismus würde dann auch erklären, warum die Bildung perforierter Synapsen in Abhängigkeit von Aktivität verläuft. Das Ausmaß der Perforation würde von der Anzahl der freigesetzten Vesikel abhängen. Je nach Anzahl der freigesetzten Vesikel könnte eine einfache Perforation in Form eines Loches in der PSD, eine Hufeisenform oder komplett getrennte PSDs entstehen. Shupliakov et al. (1997) konnten in der Tat zeigen, daß durch massive Stimulation in Gegenwart eines den Recyclingmechanismus der Vesikel blockierenden Agens, sich die Ultrastruktur der Synapse stark veränderte. Die präsynaptische Plasmamembran nahm zu und es kam sogar zur Fragmentierung der aktiven Zone durch Bildung von Membraninvaginationen. Da in Abhängigkeit von Aktivität zusätzliche Glutamatrezeptoren in die PSD eingebaut und „silent synapses“ aktiviert werden (Liao et al., 1995, Isaak et al., 1996, Durand et al., 1996) könnte auf diesem Weg, das neu eingebaute Vesikelmembranmaterial mit Rezeptoren ausgestattet werden.

Dieser einfache Vesikelmembraneinbau, würde mit dem schnellen Zeitverlauf der Bildung perforierter Synapsen übereinstimmen und die Beteiligung von Zelladhäsionsmolekülen, tPA und NMDA-Rezeptoren erklären. Infolge von Kurzzeitstimulation könnten zunächst einfache Perforationen gebildet werden. Diese perforierten Synapsen wären dann geringfügig größer als die nicht-perforierten (Itarat und Jones, 1992, 1993). Bei länger anhaltenden aktivitätsab-

hängigen Prozessen könnten dann infolge von Proteinbiosynthese komplexere, größere perforierte Synapsen entstehen.

#### 4.1.6 Modell der Synapsenperforation

Basierend auf den hier vorgestellten Ergebnissen und den aus der Literatur bekannten Daten soll nun ein neues Modell für den Mechanismus der Synapsenperforation vorgeschlagen werden (s. Abbildung 24):

##### 1. Präsynaptische Mechanismen:

- Durch Induktion von Aktivität wird über einen Exozytosemechanismus die Konzentration von PSA-NCAM in der Präsynapse erhöht. Ferner wird ein Teil des nicht-sialisierten NCAMs sialisiert. Durch diese Prozesse werden die Verbindungen sowohl an, als auch zwischen Prä- und Postsynapse aufgelockert.
- Des Weiteren wird tPA aktivitätsabhängig freigesetzt. tPA bewirkt die Bildung der Protease Plasmin, welche sowohl PSA-NCAM als auch NCAM-Moleküle an der spezifischen Serinproteasenbindungsstelle schneidet. Durch die Herstellung kleinerer Zelladhäsionsfragmente kann ein struktureller Feinumbau, der sowohl an der Prä- als auch an der Postsynapse zu Perforationen führt, erfolgen.
- Durch den Einbau von Vesikelmembranmaterial, das bei der Exozytose von Transmittern frei wird, können in Prä- und Postsynapse Perforationen entstehen. Dieser Vorgang kann, genau wie die Exozytose der Vesikel sehr schnell verlaufen. Je nachdem wo und wieviel Vesikelmaterial eingebaut wird, entstehen unterschiedliche Formen der Perforation.

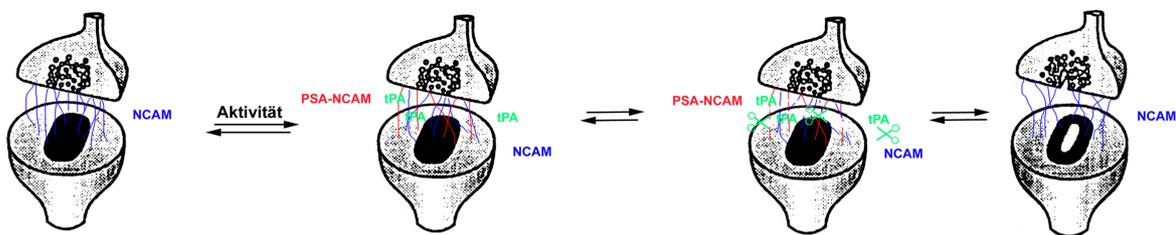


Abbildung 24: Modell zur Entstehung perforierter Synapsen. Induktion von Aktivität führt zur Expression von PSA-NCAM und zur Exozytose von tPA. tPA aktiviert die Protease Plasmin, welche dann Zelladhäsionsmoleküle schneidet und dadurch den zur Bildung der Perforation erforderlichen Einbau von Vesikelmembranmaterial ermöglicht.

## 2. Postsynaptische Mechanismen:

- Durch den Einfluß von Calciumionen durch NMDA-Rezeptoren werden sekundäre Reaktionskaskaden aktiviert, die das Zytoskelett auf die Insertion von neuem Membranmaterial vorbereitet und entsprechend der Perforation moduliert. Ferner werden nicht-aktive Glutamatrezeptoren aktiviert. Des weiteren wird ein für das tPA/Plasmin-System geeignetes Milieu zur Spaltung der Zelladhäsionsmoleküle geschaffen. Diese Vorgänge können bereits durch Kurzzeitstimulation hervorgerufen werden.
- Bei langfristiger Stimulation wird durch Calcium-aktivierte Reaktionskaskaden der Umbau einfacher perforierter Synapsen zu komplexen, größeren Synapsen vorgenommen, indem die PSD vergrößert und weitere Rezeptoren eingebaut werden.

Mit diesem Modell kann die schnelle aktivitätsabhängige Entstehung der perforierten Synapsen durch einfache, elementare Vorgänge erklärt werden. Es zeigt das Zusammenspiel verschiedener Faktoren, wie die Beteiligung des NMDA-Rezeptors, der Serinprotease tPA und den Zelladhäsionsmolekülen. Des weiteren unterstreicht es die außerordentliche Dynamik synaptischer Prozesse. Es sind sicherlich noch eine Vielzahl weiterer Prozesse an der Entstehung perforierter Synapsen beteiligt, deren Aufdeckung und Verständnis noch weiterer Forschungsarbeit bedarf.

## **4.2 Spine- und Schaftsynapsen**

### **4.2.1 Entstehung von Schaft- und Spinesynapsen**

In der Kultur ist das Verhältnis von Schaft- und Spinesynapsen ein wichtiger Aspekt, da es sich gravierend von dem im Slice oder *in vivo* Bedingungen unterscheidet. Während im intakten Gewebe hauptsächlich Spinesynapsen vorliegen, sind in der Kultur Schaftsynapsen vorherrschend (Schikorski und Stevens, 1997; Boyer et al., 1998). Das Verhältnis zwischen Spine- und Schaftsynapsen beträgt in etwa 1:3. Zu Beginn der Kultivierung sind Schaftsynapsen dominant. Spinesynapsen sind noch sehr klein und einfach. Auffällig ist auch der große Anteil an Filopodien (Papa et al., 1995). Mit zunehmendem Alter der Kulturen nimmt auch der Anteil an Spinesynapsen zu und der der Schaftsynapsen entsprechend ab. In diesem Zuge verschwinden dann auch die Filopodien. In dem hier vorliegenden Kultursystem waren nach 12 DIC 65% aller Synapsen Schaftsynapsen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen von Boyer et al. (1998) und Fiala et al. (1998).

Da im Laufe der Entwicklung Schaftsynapsen ab- und Spinesynapsen zunehmen, wurde postuliert das Spinesynapsen aus Schaftsynapsen herauswachsen (Cotman et al., 1973; Pokorny

und Yamamoto, 1981). Dieser Gedanke ist gestützt von der Tatsache, daß im Hippocampus (Cotman et al., 1973; Pokorny und Yamamoto, 1981; Schwartzkroin et al., 1982; Steward und Falk, 1991; Harris et al., 1992; Boyer et al., 1998), aber auch in anderen Gehirnregionen in den ersten zwei postnatalen Wochen der Entwicklung die Schaftsynapsen dominieren (Jurasca und Fifkova, 1979; Miller und Peters, 1981; Mates und Lund, 1983; Landis, 1987). Dies würde auch mit meinen Beobachtungen übereinstimmen, denn sehr auffällig ist, daß Spinesynapsen aus Schaftsynapsen auswachsen und die PSD der Schaftsynapse verwenden (s. Abbildung 25).

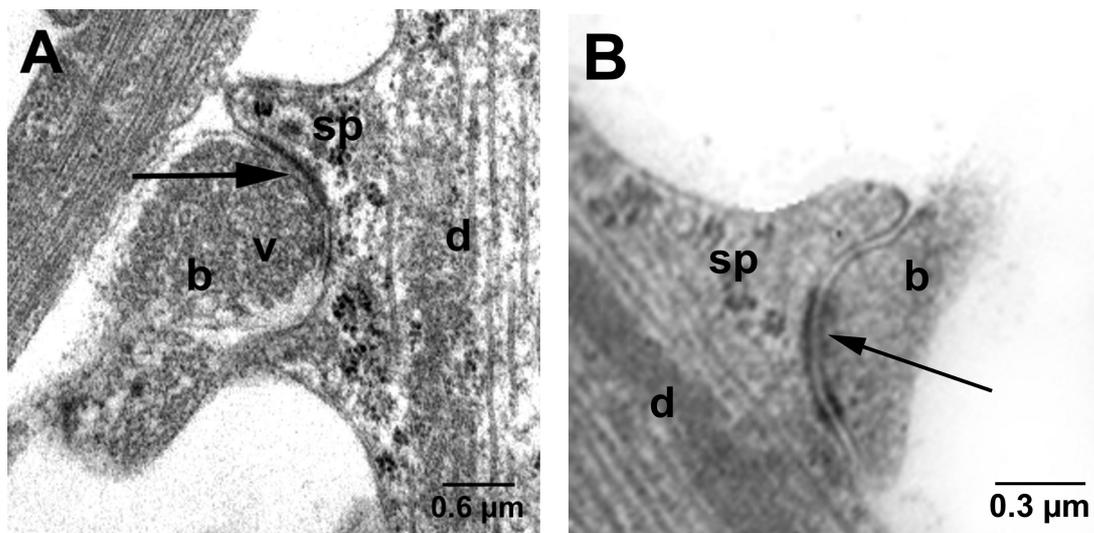


Abbildung 25: Bildung von Spinesynapsen. Spinesynapsen (sp) wachsen direkt aus Schaftsynapsen aus und verwenden die PSD (siehe Pfeilspitze) der Schaftsynapse.

Wenn Spinesynapsen aus Schaftsynapsen auswachsen stellt sich die Frage, welche Rolle Filopodien haben. Dailey und Smith (1996) postulierten, daß Filopodien die Vorläufer für die Bildung von Schaftsynapsen sein könnten. Diese Hypothese könnte wahr sein, da Filopodien in der Synaptogenese in verschiedenen Gehirnarealen sowohl von Neuronen mit Spines (Lund et al., 1977; Miller und Peters, 1981; Markham und Fifkova, 1986) als auch von Neuronen ohne Spines gebildet werden (Lund et al., 1977; Ulfhake und Cullheim, 1988; Wong et al., 1992; Linke et al., 1994). Sie scheinen somit nicht als Vorstufen für Spinesynapsen ausschlaggebend zu sein.

Wie könnten Filopodien an der Entwicklung von Schaftsynapsen beteiligt sein? Fiala et al. (1998) schlugen vor, daß Filopodien eine besonders spezialisierte Oberfläche für die Bildung von Synapsen haben könnten. Synapsen könnten dann insbesondere an der Basis dieser gebildet werden und sich dann in Schaftsynapsen umwandeln. In dem Fall, daß Filopodien Synapsen an ihrer Spitze bilden, könnten sich die Filopodien zurück in den Schaft ziehen, und die

entsprechende Präsynapse mit zum Schaft ziehen. Dieser Vorgang könnte möglich sein, da Filopodien sehr dynamische Systeme sind, die wie *in vitro* beobachtet wurde, expandieren und retraktieren (Dailey und Smith, 1996; Ziv und Smith, 1996). Andererseits könnten durch die Bewegung von Aktinfilamenten, die für die Expansion und Retraktion der Filopodien verantwortlich sind (Fischer et al., 1998; Smith, 1988; Sheetz et al., 1992) auch Membrankomponenten entlang des Filopodiums transportiert werden (Smith, 1994), so daß Synapsen von der Spitze zur Basis des Filopodiums verschoben werden könnten, woraus dann letztendlich Schaftsynapsen entstehen könnten. Die entsprechenden Präsynapsen würden bei diesem Vorgang mitgezogen werden. Dies würde dann auch die Tatsache erklären, daß Axone im frühen Stadium der Entwicklung noch relativ verflochten und wirr angeordnet sind und erst mit der Ausdifferenzierung der Spines mit adultem Gewebe, wieder geradliniger und geordneter in ihrem Verlauf werden (Shepard und Harris, 1998).

Filopodien könnten somit die Vorläufer von Schaftsynapsen und diese wiederum die Vorstufen von Spinesynapsen sein. Diese Hypothese könnte auch Gültigkeit für die perforierten Synapsen haben. Betrachtet man die Verteilung perforierter Spine- und Schaftsynapsen, so könnte man vermuten, daß perforierte Schaftsynapsen die Precursor für perforierte Spinesynapsen sind. Dafür spräche auch die Tatsache, daß Langzeitstimulation vor allem zur Bildung perforierter Schaftsynapsen führt (s. 4.2.3).

#### **4.2.2 Verhältnis von Spine- und Schaftsynapsen in Abhängigkeit von Aktivität**

Interessant ist die Auswirkung von Kurz- und Langzeitstimulation auf die Anzahl der Spinesynapsen. Durch Kurzzeitstimulation ist im Vergleich zu den Kontrollen keine Zunahme der Spinesynapsen festzustellen. Erst nach 3 Tagen tritt eine leichte, jedoch nicht signifikante Zunahme ein. Kurzzeitstimulation hat somit keinen Einfluß auf die Bildung von Spinesynapsen. Erst durch Langzeitstimulation können diese gebildet werden. Da die Bildung von Spines abhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration und der Proteinbiosynthese ist (Papa und Segal, 1996) und Proteinbiosynthese nur nach Langzeitstimulation erfolgt (Bliss und Collingridge, 1993; Huang et al., 1996) stehen diese Ergebnisse in Einklang miteinander.

Vergleicht man jedoch diese Daten mit denen anderer Untersuchungen, so stellt man fest, daß die in der Literatur beschriebenen Effekte von Picrotoxin oder LTP auf die Anzahl der Spinesynapsen kontrovers sind. In organotypischen Kulturen aus dem somatosensorischen Cortex der Maus wurde die Spinedichte auf Pyramidenzellen durch Picrotoxin Stimulation erhöht (Annis et al., 1994). Papa und Segal (1996) zeigten, daß die Spinedichte in dissoziierten hippocampalen Kulturen durch Picrotoxinapplikation innerhalb 24 Stunden sogar um >60% an-

stieg. Hingegen fanden Collin et al. (1997) in Slicekulturen keine signifikanten Veränderungen. Muller et al. (1993) stellten sogar eine leichte Abnahme fest. Nach LTP-Induktion wurde in einigen Studien eine signifikante Zunahme in der Anzahl der stubby Spines und der Schaftsynapsen gesehen (Lee et al., 1980; Chang und Greenough, 1984; Chang et al., 1991). Trommald et al. (1990, 1995) sahen eine Zunahme der Spinedichte an dendritischen Segmenten im Gyrus dentatus 30 Minuten nach LTP-Induktion. Geinisman et al. (1996) stellten nach 13 Tagen der LTP nur eine signifikante Zunahme der Schaftsynapsen fest. Diese kontroversen Ergebnisse könnten vor allem durch die unterschiedlichen Präparationen, aber auch durch verschiedene Auswertungsmethoden zurückzuführen sein.

Inhibition synaptischer Aktivität durch Langzeitapplikation von TTX führte zu einer signifikanten Abnahme an Spinesynapsen. 90% aller Synapsen wurden direkt auf dem Schaft gebildet. Es lagen nur Filopodien und kleine dünne Spines, jedoch keine ausdifferenzierten komplexen Spines vor. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen von Papa und Segal (1996), Kossel et al. (1997) und Collin et al. (1997).

Das Verhältnis von Spine- und Schaftsynapsen ist folglich stark aktivitätsabhängig. Induktion von Aktivität führt primär zur Bildung von Spinesynapsen, während Inhibition elektrischer Aktivität in einem sehr frühen Kultivierungsstadium sich auf die Synaptogenese der Spines auswirkt wodurch verstärkt Schaftsynapsen gebildet werden. Geinisman et al. (1996) stellten fest, daß 13 Tage nach LTP-Induktion die Anzahl perforierter Schaftsynapsen um 28% zunahm. Da die Potenzierung bereits schwächer als in den ersten Tagen war, könnte die verstärkte Bildung der Schaftsynapsen nach einem der TTX-Behandlung analogen Mechanismus verlaufen. Auch hier würde durch abnehmende Aktivität die Anzahl der Schaftsynapsen erhöht werden. Sowohl Spine- als auch Schaftsynapsen sind somit dynamische Strukturen, die unter ständiger afferenter Kontrolle stehen.

### **4.2.3 Anteil perforierter Synapsen an Spine- und Schaftsynapsen**

Bislang wurde der Anteil perforierter Synapsen und das Verhältnis von Spine- und Schaftsynapsen in Abhängigkeit von Aktivität betrachtet. Ein weiterer interessanter Aspekt ist daher der Anteil perforierter Synapsen an Spine- und Schaftsynapsen. In der Kontrolle sind 4% aller Spinesynapsen und 17% aller Schaftsynapsen perforiert. Die meisten perforierten Synapsen sind somit Schaftsynapsen. Nach Stimulation mit Picrotoxin verändert sich dieses Verhältnis. Bereits durch Kurzzeitstimulation steigt der Anteil der perforierten Spinesynapsen auf 14% und der der Schaftsynapsen auf 28% an. Durch Langzeitstimulation wird hingegen nur ein minimaler weiter Anstieg der perforierten Spinesynapsen bewirkt. Hingegen nehmen die per-

forierten Schaftsynapsen um weitere 10% zu. Es werden folglich 95% aller perforierten Spinesynapsen bereits durch 15-minütige Stimulation gebildet, während durch Langzeitstimulation primär die Zunahme perforierter Schaftsynapsen bewirkt wird.

Kurzzeitstimulation führt zur Bildung perforierter Spine- und Schaftsynapsen. Da infolge von Langzeitstimulation keine weitere Zunahme der perforierten Spinesynapsen erfolgt kann offensichtlich nur ein ganz bestimmter Prozentsatz aller Spines perforiert sein. Dies gilt auch für die Schaftsynapsen. Genau wie es ein definiertes Verhältnis von Spine- und Schaftsynapsen in Kultur gibt, scheint auch der Anteil der perforierten Synapsen an Spine- und Schaftsynapsen bestimmten Gesetzmäßigkeiten zu unterliegen. Infolge von Kurzzeitstimulation kann somit nur ein entsprechender Anteil der Spines perforiert werden, da ein bestimmtes Verhältnis zwischen perforierten und nicht-perforierten Synapsen vorliegen muß. Durch Langzeitstimulation werden dann verstärkt perforierte Schaftsynapsen gebildet, die als Precursor für perforierte Spinesynapsen dienen könnten. Dies würde in Übereinstimmung mit der Hypothese zur Bildung von Spinesynapsen stehen. Auf der anderen Seite könnte analog zu Geinisman et al. (1996) durch lange Stimulation verstärkt die Bildung von Schaftsynapsen eingetreten sein.

#### 4.2.4 Aktivitätsabhängige Veränderung der Synapsendichte

Viele Studien haben nach LTP-Induktion keine Veränderung in der Gesamtzahl der Synapsen gesehen (Lee et al., 1980; Chang und Greenough, 1984; Desmond und Levy, 1986 a/b, 1988, 1990; Schuster et al., 1990; Geinisman et al., 1991, 1993, 1996; Hosowaka et al., 1995; Buchs und Muller, 1996). Ob die, in dieser Arbeit durch Stimulation hervorgerufenen Veränderungen durch interne Umstrukturierungen (Remodelling) verursacht wurden oder ob durch *de novo* Synthese die Synapsenanzahl zugenommen hat, kann nicht beurteilt werden. Es können nur Aussagen über das Verhältnis der Synapsentypen zueinander gemacht werden, da die Quantifizierung von Synapsen in Kultur aufgrund der wesentlich geringeren Synapsendichte gegenüber dem normalen Gewebe sehr aufwendig ist. Da morphologische Veränderungen wie z.B. die Perforation von Synapsen jedoch bereits nach Kurzzeitstimulation auftraten, hat vermutlich nach kurzer Stimulation ein synaptisches Remodelling stattgefunden. Durch längere Stimulation könnte es dann infolge von Proteinbiosynthese, die für Synaptogenese erforderlich ist, zur Bildung neuer Synapsen gekommen sein.

### 4.2.5 Funktion von Spines

Wie in 4.2.1 erläutert, werden Synapsen in Kultur entweder auf Spines oder direkt am Schaft gebildet. In jungen Kulturen dominieren die Schaftsynapsen. Erst mit zunehmendem Alter differenzieren sich die Kulturen weiter aus und die Anzahl der Spinesynapsen nimmt zu (Papa et al., 1995). Um der Frage nachzugehen, warum in Kultur sowohl Schaft- als auch Spinesynapsen vorliegen, soll im folgendem Abschnitt auf die Funktion dieser verschiedenen postsynaptischen Partner, insbesondere auf die der Spines eingegangen werden.

Über die Funktion von Spines wird schon seit langem diskutiert. Nach Cajal (1906), vergrößern Spines die Dendritenoberfläche, um genügend Platz für Synapsen zu schaffen. Harris et al. (1988) konnten aber mittels Computersimulation zeigen, daß ohne Spines weniger als 50% der Dendritenoberfläche mit Synapsen bedeckt ist, somit eine Platzfrage sehr unwahrscheinlich ist. Ebenso ist vermutet worden, daß Spines die Wahrscheinlichkeit „en passant boutons“ zu bilden, erhöhen würden. Allerdings gibt es bereits Beispiele, wo Spines nicht zu diesem Zweck verwendet werden (Nicol und Walmsly, 1991).

In den letzten Jahren verfestigte sich immer mehr die Meinung, daß Spines in Plastizität involviert sind. Es wurde eine große Anzahl morphologischer Veränderungen infolge tetanischer Reizung festgestellt (Fifkova und van Harrefield, 1977; Chang und Greenough, 1984, Lee et al., 1980 ; Desmond und Levy, 1988; Trommald et al., 1995). Eine mögliche Funktion der Spines in Bezug auf plastische Veränderungen ist die Beeinflussung der Amplitude des EPSPs durch Variation des Spinehalswiderstandes. Eine Zunahme des Halswiderstandes durch Abnahme des Halsdurchmessers könnte zu einer Abnahme der synaptischen Effizienz führen (Pongrazs, 1985; Lisman, 1989).

Des weiteren denkt man, daß Spines eine Kompartimentalisierung biochemischer Prozesse bewirken könnten (Gamble und Koch, 1987; Wickens, 1988; Koch und Zador, 1993; Svoboda et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, daß Spines zur Kompartimentalisierung von Calcium dienen (Guthrie et al., 1991; Müller und Connor, 1991; Segal, 1995; Connor et al., 1994; Spacek und Harris, 1997). Calcium spielt eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Genexpression nach Einwirkung synaptischer Aktivität (Rosen et al., 1995; Finkbeiner und Greengard, 1996). Durch tetanische Reizung kann in Spineköpfen eine Konzentration von 20-40  $\mu\text{M}$  Calcium erreicht werden (Petrozi et al., 1995). Erst nach 100 ms fällt sie auf die ursprüngliche Konzentration von weniger als 1  $\mu\text{M}$  wieder ab (Segal, 1995b). In vielen Untersuchungen wurden hohe Konzentrationen von Calcium und seinen Präzipitaten im SER und im Spineapparat gefunden (Fifkova et al., 1983; Andrews und Reese, 1990; Buchs et al., 1994). Ebenso hat man den Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ )-Rezeptor an den Membranen des SER in

Spines und Dendriten entdeckt (Mignery et al., 1989; Villa et al., 1992). Aktivierung dieses Rezeptors könnte zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führen. Da insbesondere die großen Spines viel SER besitzen, sind diese die besten Kandidaten für die Speicherung von Calcium. Erreicht Calcium eine hohe Konzentration, was sehr leicht ist, da große Spinesköpfe nur ein Volumen von  $0.2\mu\text{m}^3$  haben (Harris und Stevens, 1989), könnten Proteinkinasen aktiviert werden, die spezifische Proteine phosphorylieren (Rosen et al., 1995) wodurch Veränderungen in der Spinemorphologie bewirkt werden können (Coss und Perkel, 1985; Fifkova et al., 1987; Moralis und Fifkova, 1991; Harris und Kater, 1994; Segal, 1995a). Bei hohen Calciumkonzentrationen könnte es zur Wiederaufnahme von Calcium ins SER kommen, bis eine normale Calciumkonzentration wieder erreicht wird.

Ferner wird diskutiert, ob ein Zusammenhang zwischen der Induktion von LTP und dem Vorkommen von Spines besteht. Denn mit zunehmender Spinedichte und Reife der Spines nimmt die Möglichkeit LTP zu induzieren und aufrecht zu erhalten, zu (Collin et al., 1997). Boyer et al. (1998) vermuten, daß es schwieriger ist LTP in dissoziierten Neuronen als in Slicekulturen zu induzieren, da diese erheblich mehr Schaftsynapsen haben.

Spines haben somit gegenüber den Schaftsynapsen einen größeren modulatorischen Einfluß auf die postsynaptischen Signale. Es sind komplexere, plastischere Strukturen, die sich mit ihrer Morphologie an die neuronale Aktivität des Systems adaptieren können und vielleicht sogar essentiell für die Induktion höherer Aktivitätszustände sind. Ebenfalls könnten sie eine protektive Funktion haben, indem sie den Dendriten vor zu hohen Calciumkonzentrationen schützen. Schaftsynapsen könnten entsprechend als einfachere, direktere Synapsen angesehen werden (Rall und Rinzel, 1973, Peters, 1976). Da junge Kulturen noch nicht vollständig ausdifferenziert sind, ist daher vermutlich auch der Anteil an den einfachen Synapsen wesentlich höher als *in vivo*.

### 4.3 Aktivitätsabhängige Veränderungen synaptischer Parameter

Nach dem „ultrastrukturellen Größenprinzip“ (Pierce und Lewin, 1994) stehen die Charakteristika eines Boutons (die Anzahl der Vesikel, der Perforationen und die Fläche der PSD sowie das Mitochondrienvolumen) in einem linearen Verhältnis zum Boutonvolumen. Ebenso stehen im Hippocampus und im Cerebellum die Größe eines Spines im engen Zusammenhang mit der Größe der Präsynapse. Prä- und postsynaptische Spezialisierungen sind folglich aufeinander abgestimmt. Im Mittel hat ein  $1\mu\text{m}^3$  großer Bouton 0.9 aktive Zonen von  $0.12\mu\text{m}^2$  Fläche, Mitochondrien mit einer Fläche  $0.21\mu\text{m}^2$  sowie 900 Vesikel (Harris und Stevens, 1988, 1989). Diese Beobachtungen stimmen mit den hier vorliegenden Messungen überein.

Bouton- und Mitochondrienflächen stehen im Verhältnis 1:10 zueinander. Infolge der unterschiedlichen Stimulationen liegen jedoch keine signifikanten Größenunterschiede vor. Dies ist aber auf die Tatsache zurückzuführen, daß bei allen Messungen die Daten perforierter und nicht-perforierter Synapsen gemittelt wurden. Auf der anderen Seite kann man auch argumentieren, daß die durch 15-minütige Stimulation gebildeten perforierten Synapsen wahrscheinlich noch sehr klein sind, so daß der Unterschied gegenüber den nicht-perforierten nur sehr gering ist. Betrachtet man den Assoziationsindex, der das prozentuale Verhältnis zwischen PSD-Länge und gesamter Kontaktzone beschreibt, erkennt man in Abhängigkeit der Stimulationsdauer eine ansteigende Tendenz, die vermutlich auf die Zunahme der perforierten Synapsen zurückzuführen ist.

#### 4.4 Ausblick

Das in dieser Arbeit entwickelte Modell zur Entstehung perforierter Synapsen kann als Ausgangspunkt zur weiteren Erforschung grundlegender Zusammenhänge zwischen den, an der Perforation beteiligten Faktoren verwendet werden. Hier bieten sich verschiedene Möglichkeiten an, z.B. müßte zunächst tPA durch Immunogoldlabeling und anschließender Elektronenmikroskopie auf ultrastruktureller Ebene lokalisiert werden. Diese genaue Lokalisation würde zum besseren Verständnis der Wirkungsweise von tPA beitragen und vielleicht auch die Frage beantworten, warum einige Boutons tPA negativ sind und ob sich diese Boutons in der Ultrastruktur von tPA-positiven unterscheiden. Da die Freisetzung von tPA möglicherweise abhängig von der Aktivierung der NMDA-Rezeptoren ist, könnte durch Co-Lokalisationsstudien weiter überprüft werden, ob tPA in Boutons nur in Verbindung mit einer bestimmten Anzahl NMDA-Rezeptoren an der Postsynapse vorkommt. Diese Untersuchungen würden dann ein Zusammenspiel von tPA und NMDA-Rezeptoren bestätigen. Darüber hinaus wäre zu prüfen, ob es auch zu einer Hochregulierung der perforierten Synapsen kommt, wenn man Kulturen direkt mit tPA versetzt. In diesem Kontext müßte auch untersucht werden, in wie weit dadurch die Expression der Zelladhäsionsmoleküle verändert wird. Die Verteilung von NCAM und PSA-NCAM müßte zunächst immunzytochemisch am konfokalen Lasermikroskop lokalisiert werden. Anschließend müßte dann untersucht werden, ob infolge von entweder tPA-, NMDA- oder Picrotoxinapplikation die Expression dieser Zelladhäsionsmoleküle verändert wird. Parallel dazu müßte kontrolliert werden, ob die Expression von tPA in den Boutons durch Picrotoxinapplikation zunimmt. Zur weiteren Untersuchung der Funktion von tPA bei der Perforation von Synapsen würden sich tPA-Knock-out Mäuse hervorragend eignen. An Kulturen von tPA-Knock-out Mäusen müßte zunächst die Verteilung der

perforierten Synapsen untersucht werden und dann analoge Stimulationsexperimente durchgeführt werden.

Ein großer Fortschritt in der Erforschung der zur Perforation führenden Mechanismen, würde durch neue Verfahren, die ein Monitoring lebender Zellen auf ultrastruktureller Ebene ermöglichen, gemacht werden, denn dadurch würden die sehr zeitaufwendigen und zudem auch nur durch die Wiedergabe einer Momentaufnahme limitierten, elektronenmikroskopischen Untersuchungen abgelöst werden.

## 5 Zusammenfassung

Synapsen sind dynamische Strukturen, die in Abhängigkeit von Aktivität ihre Ultrastruktur verändern können. Diese Modifizierbarkeit synaptischer Verbindungen wird als synaptische Plastizität bezeichnet und als die Basis elementarer Lern- und Gedächtnisprozesse angesehen. Interessante Strukturen im Kontext der synaptischen Plastizität sind die perforierten Synapsen, die eine diskontinuierliche postsynaptische Dichte aufweisen. Man nimmt an, daß diese Synapsen Produkte des synaptischen Remodellings oder Zwischenstufen in einem Prozeß zur Bildung neuer Synapsen sind. Das Auftreten perforierter Synapsen wurde verstärkt nach intensiven Trainings- und Lernprozessen sowie nach Langzeitpotenzierung (LTP, dem vorherrschenden Modell für Lernen und Gedächtnis) beobachtet. Über die Funktion dieser Perforation sowie die Mechanismen, die zur Bildung der Perforation führen, ist bislang noch wenig bekannt. In einem leicht zugänglichen Zellkultursystem hippocampaler Neurone sollten daher, die Entstehung perforierter Synapsen in Abhängigkeit von Aktivität sowie die der Perforation zu Grunde liegenden Mechanismen untersucht werden.

Mit dieser Arbeit konnte das erste Mal gezeigt werden, daß perforierte Synapsen in Primärkultur in Abhängigkeit von Aktivität gebildet werden können. Bereits durch 15-minütige Stimulation mit dem GABA<sub>A</sub>-Antagonisten Picrotoxin, wurde die Anzahl der perforierten Synapsen signifikant erhöht (83%). Längere Stimulation für drei Tage führte zu einer signifikanten Erhöhung von 129%, während durch 8-tägige Stimulation keine weitere Zunahme der Anzahl der perforierten Synapsen erreicht wurde. Die Entstehung perforierter Synapsen erfolgte anfangs sehr schnell und unterlag nach 3 Tagen einer Sättigung. Maximal ein Drittel aller Synapsen waren nach Stimulation perforiert.

Bei der Entstehung perforierter Synapsen spielen sowohl NMDA-Rezeptoren sowie die Serinprotease tPA eine entscheidende Rolle. Eine kompetitive Blockierung der NMDA-Rezeptoren mit dem Antagonisten APV in Gegenwart von Picrotoxin verhinderte eine Zunahme der perforierten Synapsen. Die Anzahl der perforierten Synapsen betrug wie in den mit APV-behandelten Kontrollen 12%. Die Beteiligung der NMDA-Rezeptoren konnte des Weiteren durch eine 15-minütige Stimulation in Medium mit 0 mM Magnesium und 2.5 mM Calcium bestätigt werden. Diese Kurzzeitstimulation führte zu einem signifikanten Anstieg der perforierten Synapsen von 12 auf 25%. Der durch Kurzzeitstimulation mit Picrotoxin bedingte Anstieg der perforierten Synapsen konnte ebenfalls selektiv mit dem tPA-Inhibitor tPA-stop und dem Plasminogeninhibitor PAI-1 geblockt werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein neues Modell für die Entstehung perforierter Synapsen vorgeschlagen: Induktion von Aktivität führt zur Aktivierung der NMDA-Rezeptoren und zur Exozytose von tPA. Durch die NMDA-Rezeptoren können Calciumionen in die Postsynapse fließen, welche dann Second-Messenger Kaskaden aktivieren. Infolge dessen werden die Proteine der Postsynapse, insbesondere die der postsynaptischen Dichte, sowie die des synaptischen Spaltes modifiziert. tPA bewirkt dann über Plasmin die Fragmentierung der Zelladhäsionsmoleküle, die für den Zusammenhalt der Synapse verantwortlich sind. Erst durch diese Auflockerung der synaptischen Struktur kann ein struktureller Umbau erfolgen.

Inhibition der synaptischen Aktivität mit Tetrodotoxin führte hingegen zu keiner signifikanten Erniedrigung der Anzahl der perforierten Synapsen, jedoch zu einer signifikanten Abnahme der Spinesynapsen. Es ist anzunehmen, daß der Ab- und Aufbau perforierter Synapsen unterschiedlichen Mechanismen unterliegt.

Perforierte Synapsen spielen folglich eine elementare Rolle bei der synaptischen Plastizität. Sie werden aktivitätsabhängig gebildet und sind vermutlich gegenüber den nicht-perforierten Synapsen wesentlich effizientere Synapsen, die zur Aufrechterhaltung eines bestimmten zellulären Aktivitätsniveaus beitragen. Dies zeigt, daß im zentralen Nervensystem Struktur und Funktion von Synapsen miteinander korrelieren.

## Summary

Synapses are dynamic structures that undergo activity-dependent changes of their ultrastructure. These changes of synaptic connections are referred to as synaptic plasticity which is the basis of elementary learning and memory processes. Interesting structures in context with synaptic plasticity are the perforated synapse, that show a discontinuity in the post synaptic density. These synapses are thought to be products of the synaptic remodelling or intermediates in the process of development of new synapses. The appearance of perforated synapses has been recognised after intensive training and memory tasks as well as after long-term potentiation (LTP, the predominant model for learning and memory).

The function of the perforations as well as the mechanisms leading to the perforation are hardly known. Therefore, the development of perforated synapses in dependence of activity and the mechanisms underlying the formation of perforations should be investigated in an easy accessible hippocampal cell culture system.

This study has shown for the first time that perforated synapses can be built in primary cell culture in dependence of activity. Short-term stimulation with the GABA<sub>A</sub>-antagonist picrotoxin for 15 minutes caused a significant increase in the number of perforated synapses (83%). Long-term stimulation for 3 days resulted in a significant rise in the number of perforated synapses of 129% whereas stimulation for 8 days did not cause a further increase in the number of perforated synapses. The formation of perforated synapses was very fast in the beginning but saturated after 3 days. A maximal number of 30% of all synapses was perforated following this stimulation.

NMDA-receptors and the serine protease tPA play a significant role in the formation of perforated synapses. Competitive block of the NMDA-receptor channels with the antagonist APV stopped the increase in the number of perforated synapses caused by picrotoxin application. The number of perforated synapses after APV treatment was 12 % similar to the control groups. The involvement of the NMDA-receptor could be further demonstrated by a 15 minute stimulation with medium containing 0 mM Magnesium and 2.5 mM Calcium. This short-term stimulation resulted in a significant increase in the number of perforated synapses from 12 to 25%.

The increase in the number of perforated synapses after short-term picrotoxin treatment could be selectively blocked by the tPA-inhibitor tPA-stop and plasminogen-inhibitor PAI-1.

Based on this data a new model concerning the formation of perforated synapses has been postulated: Induction of activity leads to activation of NMDA-receptors and exocytosis of tPA. Calcium ions can permeate through the NMDA-receptors into the post-synapse and acti-

vate second-messenger cascades that caused modifications of post synaptic proteins, especially of the post synaptic density and the synaptic cleft. tPA activates plasmin that fragments cell adhesion molecules which hold the synaptic cleft together. This loosening of synaptic structure is necessary for structural modifications.

In contrast inhibition of synaptic activity with tetrodotoxin did not cause a decrease in the number of perforated synapses, but a significant decrease in the number of spine synapses. Probably the elimination of perforated synapses underlies different mechanisms than the formation.

Altogether, perforated synapses play a fundamental role in synaptic plasticity. The formation is activity-dependent. Probably perforated synapses are more efficient synapses than non-perforated synapse. They might be necessary for the establishment of a certain cellular activity level. This shows that synaptic structure and function are correlated within the central nerve system.

## 6 Anhang

### 6.1 Zellkultur

#### 6.1.1 Chemikalien/Lösungen

Chemikalien/Lösungen	Hersteller
Fibronectin: 0.001 Vol.-% in HBSS	Sigma / Gibco
Laminin: 0.001 Vol.-% in HBSS	Sigma / Gibco
Poly-L-Lysin : 0.01 Vol.-% in 0.1 mol/l Boratpuffer, pH 8.5	Sigma
Konz. Salpetersäure	Sigma
Papain: 20 u/ml EBSS	Worthington Biochemical, NY
L-Cystein: $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l EBSS	Sigma
EDTA (Titriplex III): $0.5 \cdot 10^{-3}$ mol/l EBSS	Sigma

#### 6.1.2 Beschichtung der Coverslips

- Coverslips in Porzellanracks einsortieren
- Racks in Glasküvetten überführen, über Nacht in konzentrierter Salpetersäure inkubieren
- Racks mit  $H_2O_{bidest.}$  spülen, bis die Säure quantitativ entfernt ist
- Racks bei  $180^\circ C$  über Nacht im Trockenschrank sterilisieren
- Coverslips unter der Sterilbank in 24-Loch-Zellkulturschalen einsortieren
- Coverslips mit sterilfiltrierten Poly-L-Lysin beschichten und über Nacht im Kühlschrank inkubieren
- Poly-L-Lysin-Lösung absaugen, so daß die Coverslips gerade noch bedeckt sind
- Coverslips zur Entfernung des Poly-L-Lysins zweimal mit sterilem Wasser waschen
- Zweite Beschichtung mit Laminin oder Fibronectin für 3 Stunden oder über Nacht
- Absaugen (s.o.), dreimal mit  $H_2O_{bidest.}$  waschen
- Die Platten können anschließend mit sterilem Wasser bedeckt für maximal 2 Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden

#### 6.1.3 Medien

Medien	Hersteller
Earls Buffered Salt Solution (EBSS, Nr. 24010)	Gibco/Life Technologies
Minimal Essential Medium (MEM, Nr. 31095)	Gibco/Life Technologies
Minimal Essential Medium (MEM, Nr. 51200)	Gibco/Life Technologies
Hanks' gepufferte Salzlösung (HBSS, Nr. 14180)	Gibco/Life Technologies

**6.1.4 Medienzusätze**

Zusätze	Hersteller
Pferdeserum, 10 Vol.-% Charge: A 06228-495	Bioter
$3.3 \cdot 10^{-3}$ mol/l Glucose	Sigma
$8.3 \cdot 10^{-7}$ mol/l Insulin	Sigma
$1 \cdot 10^{-3}$ mol/l Natriumpyruvat	Sigma
$3 \cdot 10^{-8}$ mol/l Natriumselenit	Sigma
$2,3 \cdot 10^{-5}$ mol/l Ovalbumin (Hühnereiklar)	Sigma
$2 \cdot 10^{-8}$ mol/l Progesteron	Sigma
$1 \cdot 10^{-4}$ mol/l Putrescin	Sigma
$1.28 \cdot 10^{-6}$ mol/l Transferrin	Sigma
$2.5 \cdot 10^{-6}$ mol/l 1-β-D-Arabinofuranosyl-Cytosin-Hydrochlorid (AraC)	Sigma

**6.1.5 Angesetzte Medien**

Plating-Medium	Neuronenmedium	Neuronenmedium + AraC
MEM, Nr. 31095	MEM, Nr. 31095	MEM, Nr. 31095
Pferdeserum	-	-
Glucose	Glucose	Glucose
-	Insulin	Insulin
-	Natriumpyruvat	Natriumpyruvat
-	Natriumselenit	Natriumselenit
-	Ovalbumin (Hühnereiklar)	Ovalbumin (Hühnereiklar)
-	Progesteron	Progesteron
-	Transferrin	Transferrin
-	-	AraC

### 6.1.6 Präparation der Neurone

#### Vorbereitung:

- steriles Wasser aus zwei Kulturschalen abziehen
- Coverslips mit ca. 300 µl Plating-Medium bedecken, bei 37°C vorinkubieren
- Papain-Aliquot auftauen, mit L-Cystein und EDTA versetzen, 30-45 Minuten bei 37°C im Wasserbad aktivieren
- Greinerröhrchen mit 45 ml Plating-Medium versehen bei 37°C im Wasserbad vorinkubieren

#### Präparation

- 10 postnatale Ratten (P1-3) mit Ether betäuben und dekapitieren
- Gehirne herauspräparieren und in einer sterilen Petrischale mit 25 ml EBSS sammeln
- Hemisphären mit einem angeschliffenen Spatel (3 mm Breite) trennen, Blutgefäße und Pia mater mit Dumont-Pinzetten (Typ 5) entfernen, Hippocampi mit einer mikrochirurgischen Schere aus den Cortexhälften herauspräparieren und sammeln
- Hippocampi mit Pipette in neue EBSS überführen und in ca. 1 cm<sup>2</sup> kleine Würfel schneiden
- Würfel in vorbereitete Papainlösung pipettieren und 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubieren
- Enzymlösung abziehen, durch 5 ml EBSS ersetzen
- Gewebestücke mit feuerpolierten Pasteurpipetten (Öffnungsdurchmesser 0.5 - 1 mm) tritrieren bis trübe Lösung entsteht
- Lösung bei 300 g für 5 Minuten zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zentrifugat mit 5 ml EBSS versetzen, tritrieren, bei 200 g für 5 Minuten zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zellen in 3 ml EBSS aufnehmen, tritrieren, in vorbereitetes Platingmedium geben
- 1 ml Zellsuspension pro Coverslip ausplattieren (entspricht Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>)
- Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubieren

### 6.1.7 Material/Geräte

Material/Geräte	Hersteller
Glasdeckgläser, 12 mm Ø	Assistent
24 Lochschalen für die Zellkultur	Renner GmbH
Wasserbad	GSL
Inkubator	Heraeus
Präparationsbesteck	Aescolap
Sterilfilter	Millipore
Racks	Thomas Scientific
Schwanhalslampe	Zeiss, Deutschland
Lupe	Zeiss, Deutschland

## 6.2 Immuncytochemie

### 6.2.1 Chemikalien/Lösungen

Chemikalien/Lösungen	Hersteller
PBS (Phosphat Buffered Saline): 0.154 mol/l NaCl; $2.7 \cdot 10^{-3}$ mol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ $1.5 \cdot 10^{-3}$ mol/l $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Sigma
Paraformaldehyd, 4 Gew.-% in PBS	Sigma
Natriumborhydridlösung, 1 Gew.-% in pBS	Sigma
Blockerlösung: 10 Vol.-% Pferdeserum, 0.2 Gew.-% Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS	Bioter, Sigma
Carrierlösung: 1 Vol.-% Pferdeserum, 0.2 Gew.-% Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS	Bioter, Sigma
Lucifer Yellow: 0.1 Gew.-% in Häusser-Lösung	Sigma
Ethanol: 10, 20, 40 Vol.-% in PBS	Merck
Mounting Medium	Sigma

### 6.2.2 Antikörper

Antikörper	Konzentration	Hersteller
Maus anti-Synaptophysin	1:1000	Chemicon
Maus anti-GFAP	1:2000	Boehringer Mannheim
Maus anti-GAD	1:2000	BioTrend
Maus anti-MAP 2	1:1000	Boehringer Mannheim
Rabbit anti-tau	1:2000	DAKO
Toto 3	1:10000	Molecular Probes
anti-Maus konjugiert mit Cy2	1:1000	Amersham
anti-Maus konjugiert mit Cy3	1:1000	Amersham

### 6.2.3 Durchführung der Immuncytochemie

#### Vorbehandlung:

- 4% Paraformaldehyd, 10 min
- 1% Natriumborhydrid in PBS
- 4 x 5 min mit PBS waschen
- Entwässerung: 10%, 20%, 40%, 20%, 10% EtOH in PBS, jeweils 5 min
- Blockerlösung, 20 min
- 4 x 5 min. mit PBS waschen

#### Antikörperreaktion:

- primär Antikörper in Carrierlösung, 1.5h oder über Nacht
- 3 x 5 min mit PBS waschen
- sekundär Antikörper in PBS , 1.5h
- 3 x 5 min mit PBS waschen
- eindeckeln mit Mounting Medium

### 6.2.4 Material/Geräte

Material/Geräte	Hersteller
TCS NT konfokalem Lasermikroskop	Leica, Oberkochen
Neofluar oil Objektive	Leica
Axiophot Mikroskop	Zeiss
JVC KY-F30B 3-CCD	JVC
Immersionsöl	Sigma

## 6.3 Elektronenmikroskopie

### 6.3.1 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien/Lösungen	Hersteller
Picrotoxin: 50 µm	Sigma
APV (2-Amino-5-phosphonovaleriansäure): 50 µm	Sigma
Tetrodotoxin: 1 µm	Sigma
tPA-stop: 1 µm	Loxo
PAI-1: 1 µm	Loxo
Glutaraldehyd: 3 Vol.-% in MEM	Fluka
Osmiumtetroxid: 1Vol.-% in PBS	Polysciences
Uranylacetat: 2 Gew.-% in Ethanol	Sigma
Pioloform: 0.2 Vol.-% in Chloroform	Merck
Parladiol: 0.5 Vol.-% in Isoamylacetat	Merck

### 6.3.2 Einbettungsprotokoll

#### Fixierung:

- 3% GA + (Neuronenmedium ohne AraC), 10 min bei 37 °C fixieren
- 3% GA + (Neuronenmedium ohne AraC) + 1% OsO<sub>4</sub>, 30 min bei 37 °C fixieren
- 1% OsO<sub>4</sub> in PBS, 30 min bei 37 °C fixieren
- 4 x mit PBS waschen

Alkoholentwässerungsreihe	Zeit
30 %	10 min
50 %	10 min
70 %	10 min
2 % Uranylacetat in 70 % EtOH 3 x in 70 % EtOH waschen	30 min
90 %	10 min
100 %	10 min
100 % auf Molekularsieb	10 min
100 % auf Molekularsieb	10 min
100 % EtOH auf Molekularsieb/Araldit 1:1	30 min
100 % EtOH auf Molekularsieb/Araldit 1:2	30 min
Araldit pur	30 min

- Deckgläser auf Araldit/Eponträger aufbringen, für 48 h bei 60 °C auspolymerisieren
- Deckgläser mit flüssigem Stickstoff Glas absprengen
- Proben ausschneiden, aufkleben, trimmen und schneiden (Schnittdicke 50 - 60 nm)

### 6.3.3 Einbettungsmedien

#### 6.3.3.1 Aralditeinbettung

##### Komponenten:

- Araldit
- DDSA (2-Dodececenylsuccinicacid)
- Beschleuniger (DMP-30): 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol

Stammlösung (hartes Gemisch): 200 g Araldit + 134 g DDSA

##### Einwaagen:

ml	Araldit	DMP-30
10	10.87 g	0.28 g
20	21.74 g	0.56 g
30	32.61 g	0.84 g
40	43.48 g	1.12 g
50	54.35 g	1.40 g

#### 6.3.3.2 Eponeinbettung

##### Komponenten:

- Epon 812 (Glycidether 100)
- Härter DBA (DDSA = Dodecylbersteinsäureanhydrid)
- Härter MNA (Methylnadicananhydrid)
- Beschleuniger DMP-30 (2,4,6 Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol)

##### Stammlösungen:

Epon 1: 150.5 g Epon 812 + 191.0 g BDA

Epon 2: 361.0 g Epon 812 + 312.0 g MNA

##### Einwaagen:

ml	Epon 1	Epon 2	DMP-30
10	3.24 g	8.44 g	0.15 g
20	6.48 g	16.88 g	0.29 g
30	9.72 g	25.32 g	0.44 g
40	12.96 g	33.76 g	0.58 g
50	16.20 g	42.20 g	0.73 g

### 6.3.4 Gridbefilmung

- Objektträger mit Kernseife einreiben, trocknen lassen, mit Geschirrhandtuch Kernseifefilm entfernen, mit Dust-Off Spray absprühen
- Objektträger in Gefäß mit Befilmungslösung stellen, Lösung ablassen, Objektträger an der Luft trocknen.
- Kanten des Objektträgers mit Skalpell anritzen, langsam in mit Wasser gefüllten Becherglas eintauchen
- Film auf der Wasseroberfläche mit Grids belegen, belegten Film mit Parafilmfolie aufnehmen und trocknen lassen

### 6.3.5 Kontrastierung nach Reynolds

#### Chemikalien:

- 5% Uranylacetat in bidest Wasser
- Lsg. I: Pb(II)-Nitrat: 1.33 g / 15 ml
- Lsg. II: Na-Citrat\*2H<sub>2</sub>O: 1.76 g / 15 ml
- Lsg. I und II zusammengeben und gut homogenisieren
- Homogenisat mit 8 ml 1M NaOH tropfenweise versetzen
- mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 50 ml
- Lsg. anschließend steril filtrieren
- Vor Benutzung abzentrifugieren

#### Durchführung

- Grids 5 min auf Uranylacetat im Dunkeln reagieren lassen
- Waschen: in Wasserbad I 10 x, in Wasserbad II 10 x eintauchen
- 1 min auf Pb-Lsg. reagieren lassen
- Waschen: in Wasserbad II 10 x, in Wasserbad I 5 x eintauchen
- Trocknen

### 6.3.6 Material/Geräte

Material/Geräte	Hersteller
Kupfer Grids (100 und 200 square mesh)	Plano
Dust-off Spray	Falcon
Diamant	Diatome, Schweiz
Reichert Ultracut S Mikrotom	Reichert
CEM 902 A	Zeiss
Kamera SIT 66	Zeiss
ANALYSIS SOFTWARE	Analysis
Petrischalen	Greiner
Rasierklingen	Agar Scientific

## 6.4 Elektrophysiologie

### 6.4.1 Chemikalien/Lösungen

Externe Lösung: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM Hepes, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>,  
10 mM Glukose, 20 mM Sukrose, pH 7.4 eingestellt mit NaOH

Interne Lösung: 120 mM K-Glukonat, 10 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>,  
2 mM ATP, pH 7.3 eingestellt mit KOH

Lucifer Yellow: 120 mM K-Glukonat, 10 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>,  
2 mM ATP, pH 7.3 eingestellt mit KOH, 0.1 Gew.-% Lucifer Yellow

Pharmaka: s. 6.3.1

### 6.4.2 Material/Geräte

Material/Geräte	Hersteller
Inverses Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Mikromanipulator, Verstärker EPC-9	HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland
Pulse + Pulsefit	HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland
Igor	Wavemetrics, Michigan , USA
Pipetten aus dünnwandigen Borsilikatglas GC 150TF	Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, UK
Horizontalen Pipettenziehgerätes	Zeitz, München
Schwingungsgedämpften Tisch	Micro-g <sup>®</sup> , TMC, Spindler&Hoyer, Göttingen

### 6.5 Sonstige Chemikalien und Reagenzien

Hersteller	Stoffname	Gefahrstoffkennzeichnung		
Sigma	Adenosintri- phosphat	-	-	-
Serva	Araldit	X	R 26/38-43	S28.2-37/39
Sigma	APV	X	R 36/37/38	S 26-36
Sigma	Blei(II)nitrat	T	R 61-61-E20/22- 33	S53-45
Merck	Bovine Serum Albumin	-	-	-
Sigma	Calciumchlorid	X <sub>i</sub>	R 36	S 22-24
Merck	Chloroform	X <sub>n</sub>	R 22-38-40- 48/20/22	S 36/37
Sigma	L-Cystein	X <sub>n</sub>	R 22	S 22-24
Serva	DDSA	X <sub>i</sub>	R 36/37	S 26-36
Sigma	Di-Natriumhy- drogenphosphat	-	-	-
Serva	DMP-30	X <sub>n</sub>	R 22-36/38	S 39
Sigma	EDTA	X <sub>R</sub>	R 36-52/53	S 26-31
Merck	Ethanol	F	R 11	S 7-16
Roth	Epon	T	R 5, 24/25, 36/37, 38, 40	S 1, 16, 43
Sigma	Fibronektin	-	-	-
Sigma	Glukose	-	-	-
Fluka	Glutaraldehyd	T	R 25-36/37/38- 42/43	S 36-44
Sigma	Hepes	-	-	-
Sigma	Insulin	-	-	-
Merck	Isoamylacetat	F	R 11	S 16-23-29-33
Sigma	Kaliumchlorid	-	-	-
Sigma	Kaliumdihydro- genphosphat	-	-	-
Sigma	Kaliumgluconat	-	-	-
Sigma	Laminin	-	-	-
Sigma	Magnesiumchlo- rid	-	-	-
Serva	MNA	X	R 26, 36/37/38	S 39
Sigma	Natriumbor- hydrid	F, T	R 15-25-34	S 26-36/37/39- 43-45

Hersteller	Stoffname	Gefahrstoffkennzeichnung		
Sigma	Natriumchlorid	-	-	-
Sigma	Natriumcitrat-dihydrat	-	-	-
Merck	Natriumhydroxid	C	R 35	S 2-26-37/39
Sigma	Natriumhypochlorid	C	R 31-34	S 28-45-50-51
Sigma	Natriumpyruvat	-	-	-
Sigma	Natriumselenit	T	R 23/25-33	S 20/21-28-45
Polysciences	Osmiumtetroxid	T <sup>+</sup>	R 26/27/28-34	S 7/9-26-45
Sigma	Ovalbumin / Huhn	-	-	-
LOXO	PAI-1	-	-	-
Worthington Biochemicals	Papain	X <sub>n</sub>	R 42/43	S 22-36/37/39
Mallinckrodt	Parladion	-	-	-
Sigma	Picrotoxin	T	R26/27/28	S 36/37/39-45
Sigma	Pioloform			
Sigma	Poly-L-Lysin	-	-	S 22-24/25
Sigma	Progesteron	-	R 46-60-63	S 45-36/37/39-3/7/9-22
Merck	Salpetersäure (konz.)	X <sub>n</sub>	R 35	S 23-26-36-45
Sigma	Tetrodotoxin	T	R 26/27/28	S 36/37/38-39-45
Sigma	Transferrin	-	-	-
LOXO	tPA-Stop	-	-	-
Sigma	Uranylacetat	T <sup>+</sup>	R 26/28-33	S 20/21-45

## 7 Literatur

Acheson A, Sunshine JL, Rutishauser U (1991) NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions. *J Cell Biol* 114: 143-53.

Alford S, Frenguelli BG, Schofield JG, Collingridge GL (1993) Characterization of  $Ca^{2+}$  signals induced in hippocampal CA1 neurones by the synaptic activation of NMDA receptors. *J Physiol (Lond)* 469: 693-16.

Altman J (1971) Coated vesicles and synaptogenesis. A developmental study in the cerebellar cortex of the rat. *brain Res* 30: 311-22.

Andrews SB, Leapman RD, Landis DMD, Reese TS (1988) Activity-dependent accumulation of calcium in Purkinje cell dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 85: 1682-5.

Andrews SB, Reese TS (1990) Intracellular structure and elemental analysis in rapid-frozen neurons. *Ann NY Acad Sci* 483:284-94.

Aniksztejn L, Ben-Ari Y (1991) Novel form of long-term potentiation produced by a  $K^{+}$  channel blocker in the hippocampus. *Nature* 349: 67-9.

Annis CM, O'Dowd DK, Robertson RT (1994) Activity-dependent regulation of dendritic spine density on cortical pyramidal neurons in organotypic slice cultures. *J Neurobiol* 25: 1483-93.

Aoki C, Carlin RK, Siekevitz P (1985) Comparison of proteins involved with cyclic AMP metabolism between synaptic membrane and postsynaptic density preparations isolated from canine cerebral cortex and cerebellum. *J Neurochem* 44: 966-78.

Aoki C, Siekevitz P (1988) Plasticity in brain development [see comments]. *Sci Am* 259: 56-64.

Artola A, Singer W (1987) Long-term potentiation and NMDA-receptors in rat visual cortex. *Nature* 330: 649-52.

Bailey CH, Kandel ER (1993) Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* 55: 397-426.

Baranes D, Lederfein D, Huang YY, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1998) Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21: 813-25.

Bartlett WP, Banker GA (1984) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture- I. Synaptic relationships. *J Neurosci* 4: 1954-65.

Bartlett WP, Banker GA (1984) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture- II. Cells which develop without intercellular contacts. *J Neurosci* 4: 1944-53.

Beaulieu C, Colonnier M (1985) A laminar analysis of the number of round-asymmetrical and flat- symmetrical synapses on spines, dendritic trunks, and cell bodies in area 17 of the cat. *J Comp Neurol* 231: 180-9.

Beaulieu C, Kisvarday Z, Somogyi P, Cynader M, Cowey A (1992) Quantitative distribution of GABA-immunopositive and -immunonegative neurons and synapses in the monkey striate cortex (area 17). *Cereb Cortex* 2: 295-309.

Becker CG, Artola A, Gerardy-Schahn R, Becker T, Welzl H, Schachner M (1996) The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res* 45: 143-52.

Bennett MK, Kennedy MB (1987) Deduced primary structure of the beta subunit of brain type II  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase determined by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 84: 1794-8.

Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)* 232: 331-56.

Bliss TVP, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-9.

Bolshakov VY, Golan H, Kandel ER, Siegelbaum SA (1997) Recruitment of new sites of synaptic transmission during the cAMP- dependent late phase of LTP at CA3-CA1 synapses in the hippocampus. *Neuron* 19: 635-51.

Boyer C, Schikorski T, Stevens CF (1998) Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain. *J Neurosci* 18: 5294-300.

Bortolotto ZA, Collingridge GL (1993) Characterisation of LTP induced by the activation of glutamate metabotropic receptors in area CA1 of the hippocampus. *Neuropharmacology* 32: 1-9.

Brauer PR, Yee JA (1993) Cranial neural crest cells synthesize and secrete a latent form of transforming growth factor beta that can be activated by neural crest cell proteolysis. *Dev Biol* 155: 281-5.

Brooks WJ, Petit TL, LeBoutillier JC, Lo R (1991) Rapid alteration of synaptic number and postsynaptic thickening length by NMDA: An electron microscopic study in the occipital cortex of postnatal rats. *Synapse* 8: 41-8.

Buchs PA, Stoppini L, Parducz A, Siklos L, Muller D (1994) A new cytochemical method for the ultrastructural localization of calcium in the central nervous system. *J Neurosci Methods* 54: 83-93.

Buchs PA, Muller D (1996) Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 93: 8040-5.

- Burger PM, Mehl E, Cameron PR, Maycox PR, Baumert F, Lottspeich F, de Camilli P, Jahn R (1989) Synaptic vesicles immunisolated from rat cerebral cortex contain high levels of glutamate. *Neuron* 3: 715-20.
- Campbell PG, Novak JF, Yanosick TB, McMaster JS (1992) Involvement of the plasmin system in dissociation of the insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinol* 130:1401-12.
- Carlin RK, Siekevitz P (1983) Plasticity in the central nervous system: do synapses divide? *Proc Natl Acad Sci (USA)* 80: 3517-21.
- Chang FL, Greenough WT (1984) Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice. *Brain Res* 309: 35-46.
- Chang PL, Isaacs KR, Greenough WT (1991) Synapse formation occurs in association with the induction of long-term potentiation in two-year-old rat hippocampus in vitro. *Neurobiol Aging* 12: 517-22.
- Cohen RS, Blomberg F, Berzins K, Siekevitz P (1977) The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. I. Overall morphology and protein composition. *J Cell Biol* 74: 181-203.
- Collin C, Miyaguchi K, Segal M (1997) Dendritic spine density and LTP induction in cultured hippocampal slices. *J Neurophysiol* 77: 1614-23.
- Collingridge GL, Kehl SL, McLennan H (1993) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol (Lond)* 334: 33-46.
- Connor JA, Miller LD, Petrozzino J, Muller W (1994) Calcium signaling in dendritic spines of hippocampal neurons. *J Neurobiol* 25: 234-42.
- Coss RG, Perkel DH (1985) The function of dendritic spines: a review of theoretical issues. *Behav Neural Biol* 44: 151-85.
- Cotman CW, Matthews DA, Taylor D, Lynch G (1973) Synaptic rearrangement in the dentate gyrus: histochemical evidence of adjustments after lesions in immature and adult rats. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 70: 3473-7.
- Crossin KL, Edelman GM, Cunningham BA (1984) Mapping of three carbohydrate attachment sites in embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 99: 1848-55.
- Dailey ME, Smith SJ (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16: 2983-94.
- Desmond NL, Levy WB (1983) Synaptic correlates of associative potentiation/depression: an ultrastructural study in the hippocampus. *Brain Res* 265: 21-30.
- Desmond NL, Levy WB (1986a) Changes in the postsynaptic density with long-term potentiation in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 253: 476-82.

Desmond NL, Levy WB (1986b) Changes in the numerical density of synaptic contacts with long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus. *J Comp Neurol* 253: 466-75.

Desmond NL, Levy WB (1988) Synaptic interface surface area increases with long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus. *Brain Res* 453: 308-14.

Desmond NL, Levy WB (1990) Morphological correlates of long-term potentiation imply the modification of existing synapses, not synaptogenesis, in the hippocampal dentate gyrus. *Synapse* 5: 139-43.

Diamond MC, Linder B, Johnson B, Bennett EL, Rosenweig MR (1975) Differences in occipital cortical synapses from environmentally enriched, impoverished and standard colony rats. *J Neurosci Res* 1: 109-119.

Doherty P, Cohen J, Walsh FS (1990) Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid. *Neuron* 5: 209-19.

Doherty P, Rowett LH, Moore SE, Mann DA, Walsh FS (1991) Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM and N-cadherin reveals fundamental differences in neuronal responsiveness to CAMs. *Neuron* 6: 247-58.

Doherty P, Fazeli MS, Walsh FS (1995) The neural cell adhesion molecule and synaptic plasticity. *J Neurobiol* 26: 437-46.

Durand GM, Kovalchuk Y, Konnerth A (1996) Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381: 71-5.

Dyson SE, Jones DG (1984) Synaptic remodelling during development and maturation: junction differentiation and splitting as a mechanism for modifying connectivity. *Brain Res* 315: 125-37.

Edelman GM (1986) Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. *Annu Rev Cell Biol* 2: 81-116.

Edwards FA (1995) Anatomy and electrophysiology of fast central synapses lead to a structural model for long-term potentiation. *Physiol Rev* 75: 759-87.

Endo A, Nagai N, Urano T, Ihara H, Takada Y, Hashimoto K, Takada A (1998) Proteolysis of highly polysialylated NCAM by the tissue plasminogen activator-plasmin system in rats. *Neurosci Lett* 246: 37-40.

Fannon AM, Colman DR (1996) A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. *Neuron* 17: 423-34.

Fazeli MS, Breen KC, Errington ML, Bliss TVP (1994) Increase in extracellular NCAM and amyloid precursor protein following induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of anesthetized rats. *Neurosci Lett* 169: 77-80.

Fiala C, Feinberg M, Popov V, Harris KM (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci* 18: 8900-11.

- Fifkova E (1975) Two types of terminal degeneration in the molecular layer of the dentate fascia following lesions of the entorhinal cortex. *Brain Res* 96: 169-75.
- Fifkova E, Van Harreveld A (1977) Long-lasting morphological changes in dendritic spines of dentate granular cells following stimulation of the entorhinal area. *J Neurocytol* 6: 211-30.
- Fifkova E, Anderson CL (1981) Stimulation-induced changes in dimensions of stalks of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Exp Neurol* 74: 621-7.
- Fifkova E, Markham JA, Delay RJ (1983) Calcium in the spine apparatus of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Brain Res* 266: 163-8.
- Fifkova E, Tonks M, Cullen-Dockstader K (1987) Changes in the nuclear pore complexes of the dentate granule cells in aged rats. *Exp Neurol* 95: 755-62.
- Finkbeiner S, Greenberg ME (1996) Ca(2+)-dependent routes to Ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation, and plasticity? *Neuron* 16: 233-6.
- Finne J, Finne U, Deagostini-Bazin H, Goridis C (1983) Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 112: 482-7.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20: 847-54.
- Flegler SL, Heckman JW, Klomparens KL, (1993) *Elektronenmikroskopie*. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Frey U, Muller M, Kuhl D (1996) A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *J Neurosci* 16: 2057-63.
- Gabbott PLA, Stewart MG (1987) Quantitative morphological effects of dark-rearing and light exposure on the synaptic connectivity of layer 4 in the rat visual cortex (area 17). *Exp Brain Res* 68: 103-14.
- Gamble E, Koch C (1987) The dynamics of free calcium in dendritic spines in response to repetitive synaptic input. *Science* 236: 1311-5.
- Geinisman Y, Morrell F, deToledo-Morrell L (1988) Remodeling of synaptic architecture during hippocampal "kindling". *Proc Natl Acad Sci (USA)* 85: 3260-4.
- Geinisman Y, Morrell F, de Toledo-Morrell L (1989) Perforated synapses on double-headed dendritic spines: a possible structural substrate of synaptic plasticity. *Brain Res* 480: 326-9.
- Geinisman Y, deToledo-Morrell L, Morrell F (1991) Induction of long-term potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities. *Brain Res* 566: 77-88.
- Geinisman Y, Morrell F, deToledo-Morrell L (1992) Increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities following hippocampal kindling. *Brain Res* 569: 341-7.

Geinisman Y, Detoledo-Morrell L, Morrell F, Heller RE, Rossi M, Parshall RF (1993) Perforated axospinous synapses with multiple, completely partitioned transmission zones: probable structural intermediates in synaptic plasticity. *Hippocampus* 3: 417-33.

Geinisman Y, Detoledo-Morrell L, Morrell F, Persina IS, Beatty MA (1996) Synapse restructuring associated with the maintenance phase of hippocampal long-term potentiation. *J Comp Neurol* 368: 413-23.

Gray E (1959) Axosomatic and axodendritic synapses of the cerebral cortex. *J Anat* 93: 443-74.

Greenough WT, West RW, DeVoogd TJ (1978) Subsynaptic plate perforations: changes with age and experience in the rat. *Science* 202: 1096-8.

Greenough WT, Hwang HM, Gorman C (1985) Evidence for active synapse formation or altered postsynaptic metabolism in visual cortex of rats reared in complex environments. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 82: 4549-52.

Greenough WT, Black JE, Wallace CS (1987) Experience and brain development. *Child Dev* 58: 539-59.

Griesinger CB, Schweizer M (1997) Differential distribution of tissue plasminogen activator (tPA) in dissociated hippocampal neurones. Light- and Electron microscopical observations. *Soc Neurosci abstracts*.

Gualandris A, Jones TE, Strickland S, Tsirka SE (1996) Membrane depolarization induces calcium-dependent secretion of tissue plasminogen activator. *J Neurosci* 16: 2220-5.

Gulley RL, Reese TS (1981) Cytoskeletal organization of the postsynaptic complex. *J Cell Biol* 91: 298-302.

Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84: 345-57.

Gurd JW, Bissoon N (1990) Phosphorylation of proteins of the postsynaptic density: effect of development on protein tyrosine kinase and phosphorylation of the postsynaptic density glycoprotein, PSD-GP180. *J Neurosci Res* 25: 336-44.

Guthrie PB, Segal M, Kater SB (1991) Independent regulation of calcium revealed by imaging dendritic spines. *Nature* 354: 76-80.

Harris EW, Ganong AH, Cotman CW (1984) Long-term potentiation in the rat hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res* 328: 132-7.

Harris KM, Stevens JK (1988) Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 8: 4455-69.

Harris KM, Stevens JK (1989) Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 9: 2982-97.

- Harris KM, Jensen FE, Tsao B (1992) Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci* 12: 2685-705.
- Harris KM, Kater SB, (1994) Dendritic spines: cellular specialisations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17: 341-71.
- Hebb DO (1949) *The organization of behaviour*. Wiley, New York.
- Hirokawa NK, Sobue K, Kanda K, Harada A, Yorifuji H (1989) The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin I. *J Cell Biol* 108: 111-26.
- Hoffman S, Edelman GM (1983) Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 5762-6.
- Hoffman KB, Larson J, Bahr BA, Lynch G (1998a) Activation of NMDA receptors stimulates extracellular proteolysis of cell adhesion molecules in hippocampus. *Brain Res* 81: 152-5.
- Hoffman KB, Martinez J, Lynch G (1998b) Proteolysis of cell adhesion molecules by serine proteases: a role in long term potentiation? *Brain Res* 811: 29-33.
- Hosokawa T, Rusakov DA, Bliss TV, Fine A (1995) Repeated confocal imaging of individual dendritic spines in the living hippocampal slice: evidence for changes in length and orientation associated with chemically induced LTP. *J Neurosci* 15: 5560-73.
- Huang YY, Bach ME, Lipp HP, Zhuo M, Wolfer DP, Hawkins RD, Schoonjans L, Kandel ER, Godfraind JM, Mulligan R, Collen D, Carmeliet P (1996) Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 93: 8699-704.
- Huettner JE, Baughman RW (1986) Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats. *J Neurosci* 6: 3044-60.
- Ichimura T, Hashimoto PH (1988) Structural components in the synaptic cleft captured by freeze-substitution and deep etching of directly frozen cerebellar cortex. *J Neurocytol* 17: 3-12.
- Isaak JT, Oliet SH, Hjelmstad GO, Nicoll RA, Malenka RC (1996) Expression mechanisms of long-term potentiation in the hippocampus. *J Physiol (Paris)* 90: 299-303.
- Itarat W, Jones DG (1992) Perforated synapses are present during synaptogenesis in rat neocortex. *Synapse* 11: 279-86.
- Itarat W, Jones DG (1993) Morphological characteristics of perforated synapses in the latter stages of synaptogenesis in rat neocortex: stereological and three-dimensional approaches. *J Neurocytol* 22: 753-64.
- Jones DG, Calverley RK (1991) Frequency of occurrence of perforated synapses in developing rat neocortex. *Neurosci Lett* 129: 189-92.

- Jones DG (1993) Synaptic plasticity and perforated synapses: their relevance for an understanding of abnormal synaptic organization. *APMIS Suppl* 40: 25-34.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (1993) *Neurowissenschaften*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Kelly PT, Cotman CW (1978) Synaptic proteins. Characterization of tubulin and actin and identification of a distinct postsynaptic density polypeptide. *J Cell Biol* 79: 173-83.
- Keynes R, Cook GM (1995) Axon guidance molecules. *Cell* 83: 161-9.
- Kleinschmidt A, Bear MF, Singer W (1987) Blockade of "NMDA" receptors disrupts experience-dependent plasticity of kitten striate cortex. *Science* 238: 355-8.
- Kiss JZ, Wang C, Rougon G (1993) Nerve-dependent expression of high polysialic acid neural cell adhesion molecule in neurohypophysial astrocytes of adult rats. *Neuroscience* 53: 213-21.
- Kiss JZ, Wang C, Olive S, Rougon G, Lang J, Baetens D, Harry D, Pralong WF (1994) Activity-dependent mobilization of the adhesion molecule polysialic NCAM to the cell surface of neurons and endocrine cells. *Embo J* 13: 5284-92.
- Klinz SG, Schachner M, Maness PF (1995) L1 and N-CAM antibodies trigger protein phosphatase activity in growth cone-enriched membranes. *J Neurochem* 65: 84-95.
- Koch C, Zador A (1993) The function of dendritic spines: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization. *J Neurosci* 13: 413-22.
- Kossel AH, Williams CV, Schweizer M, Kater SB (1997) Afferent innervation influences the development of dendritic branches and spines via both activity-dependent and non-activity-dependent mechanisms. *J Neurosci* 17: 6314-24.
- Kramer I, Hall H, Bleistein U, Schachner M (1997) Developmentally regulated masking of an intracellular epitope of the 180 kDa isoform of the neural cell adhesion molecule NCAM. *J Neurosci Res* 49: 161-75.
- Krystosek A, Seeds NW (1981a) Plasminogen activator release at neuronal growth cone. *Science* 213: 1532-4.
- Krystosek A, Seeds NW (1981b) Plasminogen activator secretion by granule neurons in culture in developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 78: 7810-4.
- Landis DM (1987) Initial junctions between developing parallel fibers and Purkinje cells are different from mature synaptic junctions. *J Comp Neurol* 260: 513-25.
- Landis DEM, Hall AK, Weinstein LA, Reese TS (1988) The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse. *Neuron* 1: 201-9.
- Lee K, Schottler F, Oliver M, Lynch G (1980) Brief bursts of high frequency stimulation produce two types of structural changes in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 44: 247-58.

Linke R, Soiano E, Frotscher M (1994) Transient dendritic appendages on differentiating septohippocampal neurons are not the sites of synaptogenesis. *Dev Brain Res* 83: 67-78.

Liao D, Hessler NA, Malinow R (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375: 400-4.

Lisman J (1989) A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9574-8.

Lisman JE, Harris KM (1993) Quantal analysis and synaptic anatomy - integrating two views of hippocampal plasticity. *Trends Neurosci* 16: 141-7.

Lledo PM, Zhang X, Sudhof TC, Malenka RC, Nicoll RA (1998) Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. *Science* 279: 399-403.

Lund JS, Boothe RG, Lund RD (1977) Development of neurons in the visual cortex (area 17) of the monkey (*Macaca nemestrina*): a Golgi study from fetal day 127 to postnatal maturity. *J Comp Neurol* 176: 149-88.

Lüthi A, Laurent JP, Müller D, Schachner M (1994) Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature* 372: 777-9.

Lynch G, Baudry M (1987) Brain spectrin, calpain and long-term changes in synaptic efficacy. *Brain Res Bull* 18: 809-15.

Maletic-Savatic M, Lenn NJ, Trimmer JS (1995) Differential spatiotemporal expression of K<sup>+</sup> channel polypeptides in rat hippocampal neurons developing in situ and in vitro. *J Neurosci* 15: 3840-51.

Marham JA, Fifkova E (1986) Actin filament organization within dendrites and dendritic spines during development. *Dev Brain Res* 27: 263-9.

Markus EJ, Petit TL, LeBoutillier JC (1987) Synaptic structural changes during development and aging. *Brain Res* 432: 239-48.

Mates SL, Lund JS (1983) Developmental changes in the relationship between type 2 synapses and spiny neurons in the monkey visual cortex. *J Comp Neurol* 221: 98-105.

Mizutani A, Saito H, Matsuki N (1996) Possible involvement of plasmin in long-term potentiation of rat hippocampal slices. *Brain Res* 739: 276-81.

Mayford M, Barzilai A, Keller F, Schacher S, Kandel ER (1992) Modulation of an NCAM-related adhesion molecule with long-term synaptic plasticity in *Aplysia*. *Science* 256: 638-44.

Mignery GA, Sudhof TC, Takei K, De Camilli P (1989) Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature* 342: 192-5.

Miller M, Peters A (1981) Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *J Comp Neurol* 203: 555-73.

- Morales M, Fifkova E (1989) Distribution of MAP2 in dendritic spines and its colocalization with actin. An immunogold electron-microscope study. *Cell Tissue Res* 256: 447-56.
- Morales M, Fifkova E (1991) Distribution of acetylated alpha-tubulin in brain. In situ localization and biochemical characterization. *Cell Tissue Res* 265: 415-23.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319: 774-6.
- Müller W, Connor JA (1991) Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic  $\text{Ca}^{2+}$  responses. *Nature*: 354: 73-6.
- Muller D, Buchs PA, Stoppini L (1993) Time course of synaptic development in hippocampal organotypic cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 71: 93-100.
- Muller D, Wang C, Skibo G, Toni N, Cremer H, Calaora V, Rougon G, Kiss JZ (1996) PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* 17: 413-22.
- Müller CM, Griesinger CB (1998) Tissue plasminogen activator mediates reverse occlusion plasticity in visual cortex. *Nat Neurosci* 1: 47-53.
- Naldini L, Vigna E, Bardelli A, Follenzi A, Galini F, Comoglio PM (1995) Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J Biol Chem* 270: 603-11.
- Nicol MJ, Walmsley B (1991) A serial section electron microscope study of an identified Ia afferent collateral in the cat spinal cord. *J Comp Neurol* 314: 257-77.
- Nieto-Sampedro M, Hoff SF, Cotman CW (1982) Perforated postsynaptic densities: probable intermediates in synapse turnover. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 79: 5718-22.
- Numberger M, Draguhn A (1996) Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Palay SL (1956) Structure and function in the neuron. *Neurobiol* 2: 64-82.
- Papa M, Bundman MC, Greenberger V, Segal M (1995) Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *J Neurosci* 15: 1-11.
- Papa M, Segal M (1996) Morphological plasticity in dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 71: 1005-11.
- Pearce IA, Cambray-Deakin MA, Burgoyne RD (1987) Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Lett* 223: 143-7.
- Perkel DJ, Petrozzino JJ (1993) The role of  $\text{Ca}^{2+}$  entry via synaptically NMDA receptors in the induction of long-term potentiation. *Neuron* 11: 817 - 23.
- Peter A, Kaiserman-Abramof I (1969) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The synapses upon dendritic spines. *Z Zellforsch* 100: 487-506.

- Peters A, Feldman M, Saldanha J (1976) The projection of the lateral geniculate nucleus to area 17 of the rat cerebral cortex. II. Terminations upon neuronal perikarya and dendritic shafts. *J Neurocytol* 5: 85-107.
- Peterson DW, Collin JF, Bradford HF (1984) Anticonvulsant action of amino acid antagonists against kindled hippocampal seizures. *Brain Res* 311: 176-80.
- Petit TL (1988) Synaptic plasticity and the structural basis of learning and memory. *Neurology and Neurobiology* 36: 201-34.
- Pierce JP, Lewin GR (1994) An ultrastructural size principle. *Neuroscience* 58: 441-6.
- Pittman RN, Buettner HM (1989) Degradation of extracellular matrix by neuronal proteases. *Dev Neurosci* 11: 361-75.
- Pittman RN, Ivins JK, Buettner HM (1989) Neuronal plasminogen activators: cell surface binding sites and involvement in neurite outgrowth. *J Neurosci* 9: 4269-86.
- Plattner H, Zingsheim HP (1987) *Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie*. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Pokorny J, Yamamoto T (1981) Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. II. Development of ultrastructure in stratum lacunosum and moleculare. *Brain Res Bull* 7: 121-30.
- Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D (1993) Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term-potential. *Nature* 361: 453-7.
- Rall W, Rinzel J (1973) Branch input resistance and steady attenuation for input to one branch of a dendritic neuron model. *J Biophys* 13: 648-89.
- Ramon y Cajal S (1906) *Notas preventivas sobre la degeneracion y regeneracion de las vias nerviosas centrales*. *Invest Biol (Madrid)* 4: 295-301.
- Ratner N, Mahler HR (1983) Structural organization of filamentous proteins in postsynaptic density. *Biochemistry* 22: 2446-53.
- Rauschecker JP, Egert U, Kossel A (1990) Effects of NMDA antagonists on developmental plasticity in kitten visual cortex. *Int J Dev Neurosci* 8: 425-35.
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208.
- Rosen LB, Ginty DD, Grennberg ME (1995) Calcium regulation of gene expression. In: *advances in second messenger and phosphoprotein research* (Means AR ed.) 225-53. New York: Raven.
- Rougon G (1993) Structure, metabolism and cell biology of polysialic acids. *Eur J Cell Biol* 6: 197-207.

Rutishauser U, Acheson A, Hall AK, Mann DM, Sunshine J (1988) The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 240: 53-7.

Sabatini DD, Bensch K, Barnett RJ (1963) Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyd fixation. *J Cell Biol* 17: 19-58.

Saskela O, Rifkin DB (1990) Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J Cell Biol* 110: 767-75.

Schikorski T, Stevens CF (1997) Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 17(15): 5858-67.

Schuch U, Lohse MJ, Schachner M (1989) Neural cell adhesion molecules influence second messenger systems. *Neuron* 3: 13-20.

Schuster T, Krug M, Wenzel J (1990) Spinules in axospinous synapses of the rat dentate gyrus: Changes in density following long-term potentiation. *Brain Res* 523: 171-4.

Schuster T, Krug M, Hassan H, Schachner M (1998) Increase in proportion of hippocampal spine synapses expressing neural cell adhesion molecule NCAM 180 following long-term potentiation. *J Neurobiol* 37: 359-72.

Schwartzkroin PA, Kunkel DD, Mathers LH (1982) Development of rabbit hippocampus: anatomy. *Dev Brain Res* 2: 453-68.

Seeds NW, Haffke S, Christensen K, Schoonmaker J (1990) Cerebellar granule cell migration involves proteolysis. *Adv Exp Med Biol* 265: 169-78.

Seeds NW, Williams BL, Bickford PC (1995) Tissue plasminogen activator induction in Purkinje neurons after cerebellar motor learning. *Science* 270: 1992-4.

Seeds NW, Friedman G, Hayden S, Thewke D, Haffke S, Mc Guire P, Krystosek A (1996) Plasminogen activators and their interaction with the extracellular matrix in neural development, plasticity and regeneration. *Neurosciences* 8: 405-12.

Segal M (1995a) Dendritic spines for neuroprotection: a hypothesis [review]. *Trends Neurosci* 18: 468-71.

Segal M (1995b) Imaging of calcium variations in living dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *J Physiol (Lond)* 486: 283-95.

Shafit-Zagardo B, Kalcheva N, Dickson D, Davies P, Kress Y (1997) Distribution and subcellular localization of high-molecular-weight microtubule-associated protein-2 expressing exon 8 in brain and spinal cord. *J Neurochem* 68: 862-73.

Sheetz MP, Wayne DB, Pearlman AL (1992) Extension of filopodia by motor-dependent actin assembly. *Cell Motil Cytoskeleton* 22: 160-9.

Shepherd GM (1990) *The synaptic organization of the brain* (Shepherd GM, ed) Oxford University Press. New York, Oxford.

Shepherd GM, Harris KM (1998) Three-dimensional structure and composition of CA3-->CA1 axons in rat hippocampal slices: implications for presynaptic connectivity and compartmentalization. *J Neurosci* 18: 8300-10.

Sherrington CS (1906) *The integrative Action of the nervous system*. Yale University Press, New Haven.

Shupliakov O, Low P, Grabs D, Gad H, Chen H, David C, Takei K, De CP, Brodin L (1997) Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* 276: 259-63.

Siekevitz P (1985) The postsynaptic density: a possible role in long-lasting effects in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 82: 3494-8.

Siman R, Baudry M, Lynch G (1984) Brain fodrin: substrate for calpain I, an endogenous calcium-activated protease. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 81: 3572-76.

Sirevaag AM, Greenough WT (1985) Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. II. Synaptic morphometry. *Brain Res* 351: 215-26.

Slater NT, Stelzer A, Galvin M (1985) Kindling-like stimulus pattern induce epileptiform discharges in the guinea pig in vitro hippocampus. *Neurosci Lett* 60: 25-31.

Smith CL (1994) Cytoskeleton movements and substrate interactions during initiation of neurite outgrowth by sympathetic neurons in vitro. *J Neurosci* 14: 384-98.

Smith SJ (1988) Neuronal cytom mechanics: the actin based motility of growth cones. *Science* 242: 708-15.

Sorra KE, Fiala JC, Harris KM (1998) Critical assessment of the involvement of perforations, spinules, and spine branching in hippocampal synapse formation. *J Comp Neurol* 398: 225-40.

Spacek J, Harris KM (1997) Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci* 17: 190-203.

Spacek J, Harris KM (1998) Three-dimensional organization of cell adhesion junctions at synapses and dendritic spines in area CA1 of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 393: 58-68.

Steward O, Falk PM (1991) Selective localization of polyribosomes beneath developing synapses: A quantitative analysis of the relationship between polyribosomes and developing synapses in the hippocampus and dentate gyrus. *J Comp Neurol* 314: 545-57.

Sumi Y, Dent MAR, Owen DE, Seeley PJ, Morris RJ (1992) The expression of tissue and urokinase-type plasminogen activators in neural development suggests different modes of proteolytic involvement in neuronal growth. *Development* 116: 6255-67.

- Suzuki T, Okumura-Noji K, Tanaka R, Ogura A, Nakamura K, Kudo Y, Tada T (1993) Characterization of protein kinase C activities in postsynaptic density fractions prepared from cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. *Brain Res* 619: 69-75.
- Svoboda K, Tank DW, Denk W (1996) Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts. *Science* 272: 716-19.
- Thewke DP, Seeds NW (1996) Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor, its receptor, c-met, and tissue-type plasminogen activator during development of the murine olfactory system. *J Neurosci* 16: 6933-44.
- Trommald M, Vaaland JL, Blackstad T, Andersen P (1990) Neurotoxicity of excitatory amino acids. In A Guidotti and E Costas (eds): *Dendritic spines changes in rat dentate granule cells associated with long-term potentiation*. 163-174, New York: Raven.
- Trommald M, Jensen V, Andersen P (1995) Analysis of dendritic spines in rat CA1 pyramidal cells intracellularly filled with a fluorescent dye. *J Comp Neurol* 353: 260-74.
- Turner RW, Baimbridge KG, Miller JJ (1982) Calcium-induced long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience* 7: 1411-6.
- Uchida N, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ, Takeichi M (1996) The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol* 135: 767-79.
- Ulfhake B, Cullheim S (1988) Postnatal development of cat hind limb motor neurons. II In vivo morphology of dendritic growth cones and the maturation of dendrite morphology. *J Comp Neurol* 278: 88-102.
- Villa A, Sharp AH, Racchetti G, Podini P, Bole DG, Dunn WA, Pozzan T, Snyder SH, Meldolesi J (1992) The endoplasmic reticulum of Purkinje neuron body and dendrites: molecular identity and specialisations for Ca<sup>2+</sup> transport. *Neuroscience* 49: 467-77.
- Villanueva S, Fielder J, Oregio F (1990) A study in rat brain cortex synaptic vesicles of endogenous ligands for N-methyl-D-aspartate receptors. *Neurosci* 37: 23-30.
- Vrensen G, Nunes Cardozo J, Muller L, Vant der Want J (1980) The presynaptic grid: a new approach. *Brain Res* 184. 23-40.
- Vrensen G, Nunes Cardozo J (1981) Changes in size and shape of synaptic connections after visual training: an ultrastructural approach of synaptic plasticity. *Brain Res* 218: 79-97.
- Weiler R, Kohler K, Janssen U (1991) Protein kinase C mediates transient spinule-type neurite outgrowth in the retina during light adaptation. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 88: 3603-7.
- Wesa JF-L, F. Chang; Greenough, William T.; West, Roger W. (1982) Synaptic contact curvature: effects of differential rearing on rat occipital cortex. *Developmental Brain Research* 4: 253-57.
- West RW, Greenough WT (1972) Effect of environmental complexity on cortical synapses of rats: preliminary results. *Behav. Biol.* 7: 279-84.

Wickens J (1988) Electrically coupled but chemically isolated synapses: dendritic spines and calcium in a rule for synaptic modification. *Prog Neurobiol* 31: 507-28.

Williams JHE, Errington ML, Lynch MA; Bliss, TVP (1989) Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 341: 739-42.

Williams EJ, Mittal B, Walsh FS, Doherty P (1995) A  $Ca^{2+}$ /calmodulin kinase inhibitor, KN-62, inhibits neurite outgrowth stimulated by CAMs and FGF. *Mol Cell Neurosci* 6: 69-79.

Wong ROL, Yamawaki RM, Shatz CL (1992) Synaptic contacts and the transient dendritic spines of developing retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci* 4: 1387-97.

Wu K, Siekevitz P (1988) Neurochemical characteristics of a postsynaptic density fraction isolated from adult canine hippocampus. *Brain Res* 457: 98-112.

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

## Lebenslauf

Name: Henrike Neuhoff  
Geburtsdatum und -ort: 29.10.1971  
Geburtsort: Hamburg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

08.1978 - 06.1982 Grundschule An den Teichwiesen in Hamburg  
08.1982 - 06.1991 Gymnasium Buckhorn in Hamburg  
06.1991 Abitur

### Berufsausbildung

08.1988 - 01.1992 Ausbildung zur chemisch-technischen Assistentin an der Gewerbeschule für Chemie, Pharmazie, Agrarwirtschaft in Hamburg

### Studium

04.1992 Zulassung zum ordentlichen Studium an der Universität Hamburg  
04.1992 - 10.1994 Grundstudium  
10.1994 Vordiplom in Lebensmittelchemie  
10.1994 - 10.1996 Hauptstudium mit dem Schwerpunkt: Lebensmittel und Bedarfsgegenstände  
10.1996 Diplom in Lebensmittelchemie  
10.96 – 07.1999 Aufbaustudium Molekularbiologie (Zertifikat)

### Diplomarbeit

08.1995 - 05.1996 Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Lebensmittelchemie, bei Prof. Dr. Dr. H. Steinhart

### Promotion

11.1996 - 07.1999 Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) in der Abteilung für Elektronenmikroskopie/Morphologie bei Dr. M. Schweizer und in der Arbeitsgruppe Elektrophysiologie bei PD Dr. J. Röper

## **Poster**

H. Neuhoff und M. Schweizer (1998)

Perforated synapses increase in number in dissociated cultured hippocampal neurons after global stimulation. In: Preceedings of the 26<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference

H. Neuhoff und M. Schweizer (1998)

Stimulation induced increase of perforated synapses in cultured hippocampal neurons. In: Berlin, Forum of the European Neuroscience

H. Neuhoff und M. Schweizer (1998)

Stimulation of cultured hippocampal neurons leads to an increase in the number of perforated synapses. In: Society for Neuroscience Abstracts

## **Publikation**

H. Neuhoff, J. Roeper und M. Schweizer

Activity-dependent formation of perforated synapses in cultured hippocampal neurons

Eur J Neuroscience: in review.