

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_A-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_A-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.