

DISSERTATION

Die Rolle des Spine-Apparats bei der Ausprägung funktioneller Plastizitätsmechanismen an der hippocampalen Moosfasersynapse

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,

im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Urban Maier

Hamburg, Juni 2017

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Thomas G. Oertner

Institut für Synaptische Physiologie

Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Christian Lohr

Abteilung Neurophysiologie

Zoologisches Institut

Universität Hamburg

Datum der mündlichen Prüfung:

30. August 2017

Die Forschungsarbeit zur vorliegenden Dissertation wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Michael Frotscher († 27.05.2017) im Institut für Strukturelle Neurobiologie am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) durchgeführt.

Rückfragen bitte an: urban.maier@zmnh.uni-hamburg.de

& für
AnneEdda

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation mit dem Titel **"Die Rolle des Spine-Apparats bei der Ausprägung funktioneller Plastizitätsmechanismen an der hippocampalen Moosfasersynapse"** eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Hamburg, den 04. Juni 2017

.....

(Unterschrift)

Zusammenfassung

In der Neurobiologie ist es allgemeiner Konsens, dass der Hippocampus funktionell in die Lern- und Gedächtnisprozesse des Gehirns involviert ist. Innerhalb des hippocampalen Netzwerks spielt die Moosfasersynapse (MF-Synapse) eine wichtige Rolle in der Verarbeitung, Speicherung und dem Abrufen von Informationen (Lisman, 1999). Sie weist im Vergleich zu anderen Synapsen des zentralen Nervensystems einige Besonderheiten bei der Ausprägung von Kurz- und Langzeitplastizitätsmechanismen (STP, LTP) auf. Eine zentrale Rolle für die LTP-Induktion an der hippocampalen MF-Synapse spielt der vorübergehende Anstieg der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration (Williams und Johnston, 1989; Zalutsky und Nicoll, 1990; Kapur et al., 1998; Yeckel et al., 1999). Bis heute konnte jedoch nicht zweifelsfrei geklärt werden, in welchem Maße der Mechanismus der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung (CiCR) aus den internen Speichern des endoplasmatischen Retikulums (ER) zur Ca^{2+} -Kinetik in den dendritischen Spines der MF-Synapse beiträgt.

Die stapelförmige Anordnung der ER-Zisternen in Spines telencephalischer Neurone stellt eine besondere Struktur des ERs dar, den sogenannten Spine-Apparat. Diese Organelle ist ein regelmäßiger Bestandteil der komplexen MF-Spines (Excrescenzen). Der Verlust des Synaptopodin-Gens hat zur Folge, dass hippocampale Neurone keine Spine-Apparate mehr ausbilden. Synaptopodin-defiziente Mäuse (Knock-out, KO) weisen in Folge dessen eine Reihe von Defiziten bei Lern- und Gedächtnisaufgaben auf. Dabei wurde bereits auf eine funktionelle Verbindung des Spine-Apparats als intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher und dessen Einfluss auf die Ausprägung von LTP verwiesen (Deller et al., 2003). Die genaue Funktion der Spine-Apparat-Organelle ist jedoch bis heute enigmatisch. Aus diesem Grund lag der Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung intrazellulärer Ca^{2+} -Signale an hippocampalen MF-Synapsen von Wildtyp (WT) und KO-Mäusen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Zwei-Photonen Ca^{2+} -Messungen die Ca^{2+} -Antworten in Spines und Dendriten gepatchter Mooszellen (MCs) in organotypischen entorhino-hippocampalen Schnittkulturen untersucht. Der postsynaptische Ca^{2+} -Influx wurde in dieser Experimentreihe durch Serien zurückpropagierender Aktionspotentiale (bAPs) und der damit einhergehenden Aktivierung der spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle (VGCCs) evoziert. Dabei zeigte sich einerseits eine signifikant gesteigerte Kinetik der Ca^{2+} -Antworten in WT-Spines im Vergleich zu KO-Spines, wogegen die Ca^{2+} -Antworten in den Dendriten beider Genotypen identisch ausfielen. Zudem konnten wir durch die

Ryanodin-vermittelte Blockade des CiCR erstmals die mechanistische Verbindung zwischen dem Spine-Apparat und einer gesteigerten Funktion des CiCR nachweisen.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht, ob die Präsenz eines Spine-Apparats und die damit einhergehende dynamische Steigerung der postsynaptischen Ca^{2+} -Antworten, möglicherweise Einfluss auf die LTP-Mechanismen an der individuellen MF-Synapse hat. Dazu musste ein neuer methodischer Ansatz zur gepaarten Ableitung individueller MF-Synapsen entwickelt werden (Geiger und Jonas, 2000), der es zusätzlich erlaubte, die evozierten Ca^{2+} -Antworten im postsynaptischen Spine zu erfassen. Mit Hilfe der "Shadowpatching"-Methode (Kitamura et al., 2008) gelang es, die MF-Boutons an fluoreszenz-markierten Excrescenzen von MCs optisch zu identifizieren und erfolgreich zu patchen. Die Identifizierung sowie die anschließende gezielte Stimulation des präsynaptischen MF-Boutons, in Kombination mit der Zwei-Photonen Ca^{2+} -Messung im postsynaptischen Spine und der somatischen Whole-Cell Patch-Clamp-Ableitung der postsynaptischen MC, eröffnete uns die Möglichkeit, die Eigenschaften einzelner identifizierter MF-Synapsen zu studieren. Durch die kombinierte prä- und postsynaptische Stimulation war es uns möglich, LTP an diesen Synapsen zu induzieren. Wir gaben dem neuen Ansatz deshalb den Namen **iPot** (individuelle **P**otenzierung).

Unsere Ergebnisse konnten zeigen, dass MF-Synapsen in Abhängigkeit ihrer Aktivitätsgeschichte in heterogenen Zuständen anzutreffen sind und dementsprechend unterschiedlich auf die Induktion von LTP reagieren. Anhand des präliminären Datensatzes der Synaptopodin-defizienten MF-Synapsen ergaben sich zudem weiterführende Hinweise auf eine mögliche Beeinträchtigung der retrograden Signalwege an der MF-Synapse, die bei repetitiver MF-Stimulation für die Induktion präsynaptischer LTP-Mechanismen relevant sein könnten (Yeckel et al., 1999; Maruo et al., 2016).

Summary

The general consensus among neuroscientists is that the hippocampus is functionally involved in the cognitive processes of learning and memory. Within the hippocampal network, the mossy fiber synapse (MF-synapse) plays an important role in the processing, storage and retrieval of the information flow (Lisman, 1999). Compared to other central synapses, the MF synapse shows a number of unique characteristics in the expression of short-term and long-term plasticity mechanisms (STP, LTP). One central aspect in the postsynaptic induction of LTP at MF-synapses is the transient increase of the postsynaptic Ca^{2+} concentration (Williams und Johnston, 1989; Zalutsky und Nicoll, 1990; Kapur et al., 1998; Yeckel et al., 1999). Until now, however, it could not be conclusively clarified to what extent the mechanism of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CiCR) from the internal stores of the endoplasmic reticulum (ER) contributes to Ca^{2+} kinetics in dendritic spines of the MF synapse.

The so-called spine apparatus, a form of stacked ER, can be found in spines of telencephalic neurons. It represents a regular component in complex MF spines (excrescences). Hippocampal neurons lacking the gene for synaptopodin do not longer form spine apparatuses. As a result, synaptopodin-deficient mice show a number deficits in learning and memory tasks compared to wild-type mice. In addition, a functional link between the Spine apparatus as intracellular Ca^{2+} store and the expression of LTP was already proposed (Deller et al., 2003). However, the exact function of the spine-apparatus organelle is yet to be fully unraveled. Therefore, this work focuses on the investigation of intracellular Ca^{2+} signals on hippocampal MF synapses of wild-type and mutant mice.

The first part of this thesis discusses Ca^{2+} kinetics in MF spines and adjacent dendrites of patch-clamped mossy cells in organotypic entorhino-hippocampal slice cultures using two-photon Ca^{2+} imaging. In these experiments, the postsynaptic Ca^{2+} influx was evoked by a series of backpropagating action potentials (bAPs) and the associated activation of voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCCs). We observed a significant difference in the kinetics of the Ca^{2+} responses in spines of wild-type compared to spines of synaptopodin-deficient mossy cells, while dendritic Ca^{2+} responses did not differ between genotypes. Thus, by blocking the CiCR with ryanodine we revealed a mechanistic link between the spine apparatus and the enhanced function of the CiCR.

Based on these results, the second part of this work focuses on whether the presence of a spine apparatus and the accompanying dynamic increase in postsynaptic Ca^{2+} is potentially linked to LTP at individual MF synapses. Therefore, we developed a novel approach in order to perform

paired-recordings of individual MF synapses (Geiger und Jonas, 2000) whilst detecting Ca^{2+} responses in the postsynaptic spine. Further, the so-called shadowpatching technique (Kitamura et al., 2008) enabled us to identify and patch individual MF boutons presynaptic to the fluorescence-labelled excrescences of mossy cells.

The combination of fluorescence-based identification and direct patch-clamp stimulation of the presynaptic MF bouton in combination with the two-photon Ca^{2+} imaging in the postsynaptic spine and whole-cell patch-clamp recordings of the postsynaptic mossy cell, allowed us to interrogate individual identified MF synapses. We named this novel approach to study LTP induction at individual MF synapses by combined pre- and postsynaptic stimulation: **iPot** (individual **p**otentiation).

Our results indicated that MF synapses are found in heterogeneous synaptic states depending on previous activity. Therefore, the induction of LTP was differentially expressed within these synapses. Preliminary data from synaptopodin-deficient MFs suggest an impairment of the retrograde signalling pathways at the MF synapse, which may be relevant for the induction of presynaptic LTP mechanisms in response to repetitive MF stimulation (Yeckel et al., 1999; Maruo et al., 2016)

Eidesstattliche Erklärung	I
Zusammenfassung	II
Summary	IV
1 Einleitung	1
1.1 Die hippocampale Formation.....	1
1.1.1 Die Anatomie des Hippocampus	1
1.1.2 Der trisynaptische Schaltkreis.....	2
1.1.3 Die hippocampale MF-Projektion	4
1.1.4 Die Lamellenhypothese	5
1.1.5 Das inhibitorische hippocampale Netzwerk	6
1.2 Die hippocampale MF-Synapse.....	8
1.3 Die hippocampale Mooszelle.....	10
1.4 Die Spine-Apparat Organelle.....	12
1.4.1 Die enigmatische Funktion des Spine-Apparats.....	13
1.4.2 Entwicklung der Spine-Apparat Organelle.....	13
1.4.3 Struktur-Funktionsanalyse des Spine-Apparats	14
1.4.4 Synaptopodin – ein Spine-Apparat assoziiertes Protein.....	14
1.4.5 Synaptopodin-defiziente Neurone bilden keine Spine-Apparate.....	15
1.4.6 Synaptopodin-defiziente Mäuse zeigen Defizite in Lern- und Gedächtnisprozessen	16
1.5 Calcium in Neuronen	17
1.5.1 Calcium als ubiquitärer Signalstoff.....	17
1.5.2 Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern	19
1.6 Plastizitätsmechanismen an der MF-Synapse	21
1.6.1 Kurzzeitplastizitätsmechanismen an der MF-Synapse.....	21
1.6.2 Langzeitplastizitätsmechanismen an der MF-Synapse.....	21
2 Fragestellung	23
2.1 Teil I	23
2.2 Teil II.....	26
3 Material und Methoden	27
3.1 Präparation und Kultivierung von organotypischen Schnittkulturen.....	27
3.1.1 Versuchstierzucht und Bestimmungen	27
3.1.2 Das organotypische Schnittkulturmodell.....	27
3.1.3 Dissektion des Hippocampus und Präparation der Schnittkulturen.....	28

3.1.4	Rezepte – organotypische Schnittkulturen.....	30
3.1.4.1	Präparationsmedium	30
3.1.4.2	Inkubationsmedium	30
3.2	Elektrophysiologie.....	32
3.2.1	Slice-Chamber.....	32
3.2.2	Das Patch-Clamp-Verfahren.....	33
3.2.3	Erfassung der elektrophysiologischen Startparameter	35
3.2.4	Erfassung der Zell- und Spinemorphologie.....	35
3.2.5	Rezepte – Patch-Clamp-Verfahren	36
3.2.5.1	ACSF-Pufferlösung.....	36
3.2.5.2	Kaliumgluconat-haltige Intrazellulärlösung.....	37
3.2.5.3	HEPES-basierte Extrazellulärlösung.....	37
3.3	Zwei-Photonen Calcium-Messung auf Einzelspinneniveau.....	38
3.3.1	Grundlagen der Fluoreszenzanregung.....	38
3.3.2	Aufbau des Zwei-Photonen Mikroskops	41
3.3.3	Verwendung von Ca ²⁺ -Indikatoren.....	42
3.3.4	Die duale Indikator-Methode.....	44
3.4	Untersuchung des CiCR an der hippocampalen Moosfasersynapse.....	47
3.4.1	Methodisches Konzept.....	47
3.4.2	Versuchsablauf.....	47
3.4.3	Modellierung und Datenanalyse.....	50
3.4.3.1	Zelluläres Modell der evozierten CaTs.....	50
3.4.3.2	Mathematische Modellierung der evozierten CaTs.....	51
3.4.4	Quantifizierung und Statistik.....	53
3.5	Methoden zur Untersuchung individueller Moosfasersynapsen.....	54
3.5.1	Identifizierung von unmarkierten MF-Boutons in hippocampalen Schnittkultur.....	54
3.5.2	Patchen identifizierter MF-Boutons.....	57
3.5.3	„bouton-attached“-Konfiguration zur Langzeitableitung	59
3.5.4	Einzelsynapsenableitung	60
3.6	Durchführung der iPot-Experimente	63
3.6.1	Parameter der entorhino-hippocampalen Schnittkulturen	64
3.6.2	Modellierung und Analyse der postsynaptischen Signale (EPSPs + CaTs).....	64
3.6.3	Statistik.....	65
4	Ergebnisse.....	66
4.1	CiCR an der Moosfasersynapse	66
4.1.1	Calcium-Antworten in Spines und Dendriten von Mooszellen.....	66
4.1.2	Effekt von Ryanodin auf die Calciumkinetik in Spines und Dendriten:	67
4.1.3	Ryanodin egalisiert die Unterschiede zwischen den Genotypen	70
4.2	Validierung der iPot-Methode zur Untersuchung einzelner MF-Synapsen.....	71

4.2.1	Identifizierung und Stimulation der MF-Boutons.....	71
4.2.2	Evoziert die Bouton-Stimulation der iPot-Methode synaptische Ereignisse?	73
4.2.3	Physiologische Kinetik evozierter Antworten.....	74
4.2.4	Umfang des gewonnenen Datensatzes:.....	77
4.3	Untersuchung individueller MF-Synapsen.....	78
4.3.1	Funktionelle Heterogenität individueller MF-Synapsen.....	78
4.3.2	Repräsentiert die Heterogenität der individuellen MF-Synapsen wirklich die Variabilität zwischen Synapsen?.....	81
4.3.3	Potenzierung individueller MF-Synapsen	83
4.3.4	Die Heterogenität der synaptischen Zustände spiegelt die Heterogenität der Glutamatfreisetzung an den präsynaptischen Boutons wieder	85
4.3.5	Einfluss der Potenzierung auf die Heterogenität der Glutamatfreisetzung an den präsynaptischen Boutons.....	85
5	Diskussion	89
5.1	Teil I: Welche Rolle spielen der Spine Apparat und der CiCR an der MF-Synapse? .	89
5.1.1	Überblick.....	89
5.1.2	CiCR an der MF-Synapse	90
5.1.3	Einfluss des Spine-Apparats auf die postsynaptische Ca ²⁺ -Dynamik.....	91
5.1.4	Nebenbefunde.....	91
5.1.5	Diskussion alternativer Methoden zur Untersuchung des CiCR.....	93
5.2	Teil II - LTP an der MF-MC-Synapse.....	95
5.2.1	Methoden zur gepaarten Ableitung	95
5.2.2	Erprobung alternativer Verfahren zur Untersuchung individueller Synapsen.....	97
5.2.3	Funktionelle Heterogenität individueller MF-Synapsen.....	99
5.2.4	Die Heterogenität der Glutamatfreisetzung der präsynaptischen Boutons spiegelt die Heterogenität der synaptischen Zustände wieder.....	101
5.2.5	Heterogene Plastizität der MF-Synapsen.....	101
5.2.6	Beeinträchtigung der postsynaptischen LTP-Induktion in Synaptopodin-defizienten MF-MC-Synapsen.....	102
5.2.7	Ausblick.....	104
6	Anhang.....	105
6.1	Abkürzungen.....	105
6.2	Tabellen: CiCR an der Moosfasersynapse.....	107
6.3	Übersicht der untersuchten MF-Synapsen	108
6.4	Korrelationen	110
7	Literaturverzeichnis	111
8	Danksagung.....	121

1 Einleitung

1.1 Die hippocampale Formation

1.1.1 Die Anatomie des Hippocampus

Die besondere Zytoarchitektur des Hippocampus und seine zentrale Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen machen ihn zu einer der am intensivsten untersuchten Hirnregionen. Er gehört phylogenetisch zu den ältesten Strukturen des Gehirns (Archicortex) und ist Teil des limbischen Systems. Unter histologischen Aspekten wird er zum sogenannten Allocortex gezählt, der im Vergleich zum Neocortex nur drei anstatt sechs Schichten aufweist.

Die „hippocampale Formation“ setzt sich aus mehreren Unterstrukturen zusammen: dem Gyrus Dentatus (Dentate Gyrus, DG), dem Hippocampus proper (auch Ammonshorn oder *lat.* Cornu Ammonis, CA), dem Subiculum und Parasubiculum sowie dem Entorhinalen Kortex (enthorhinal cortex, EC). Der Gyrus Dentatus besteht seinerseits aus den Schichten: ‚Stratum moleculare‘, ‚Stratum granulosum‘ und dem ‚Hilus‘. Der Hippocampus proper umfasst die Schichten: ‚Stratum oriens‘, ‚Stratum pyramidale‘ sowie ‚Stratum radiatum‘.

Aus dem Studium einer beachtlichen Fülle von Golgi- und Nissel-gefärbten Hirnschnitt-Präparaten schlussfolgerte Santiago Ramón y Cajal bereits im Jahre 1911, dass die Nervenzellen über ihre feinen Nervenfasern vernetzt sind (Ramón y Cajal, 1911). Auf geniale Weise verstand er es, die verschiedenen hippocampalen Zellbänder zueinander korrekt in Bezug zu setzen und verwies bereits auf deren gerichtete Verschaltung miteinander. Trotz der zur damaligen Zeit limitierten, rein morphologischen Untersuchungsmöglichkeiten konnten viele der von Cajal postulierten zellulären Schaltkreise mit Hilfe moderner elektronenmikroskopischer und elektrophysiologischer Verfahren bestätigt werden. In einer seiner berühmtesten Zeichnungen stellte Cajal den sogenannten „trisynaptischen Schaltkreis“ innerhalb der hippocampalen Formation dar wobei er bereits die Projektionsrichtung der hintereinander verschalteten Afferenzen mit Pfeilen andeutete (Abbildung 1).

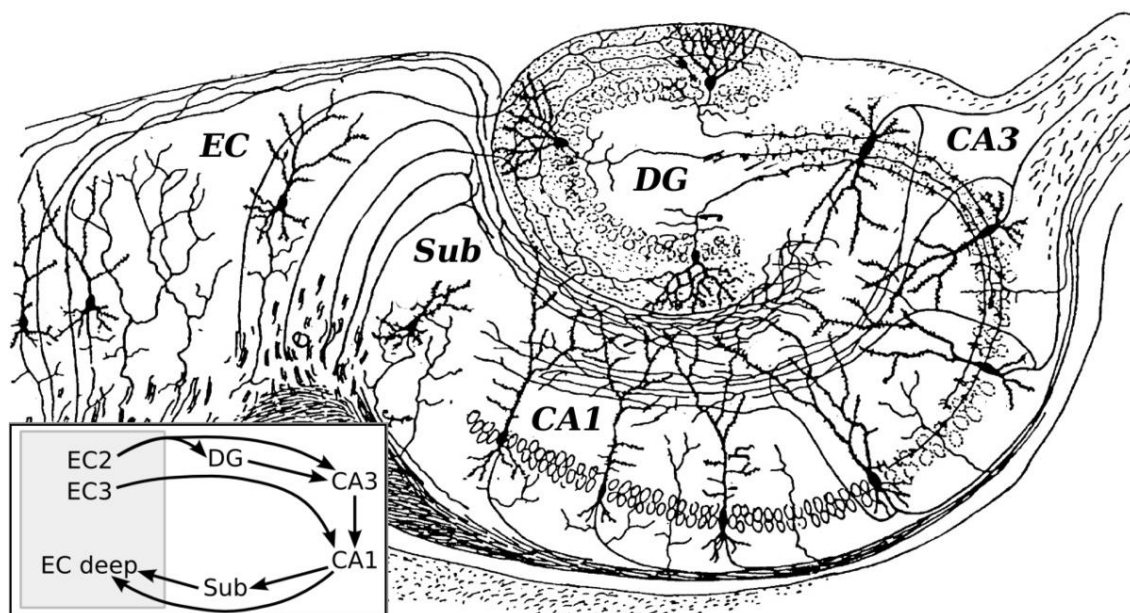


Abbildung 1: Organisation hippocampaler Neurone und ihrer Verbindungen nach Santiago Ramón y Cajal (1911). Schematische Darstellung der exzitatorischen Projektionsbahnen der Prinzipalzellen innerhalb des hippocampalen Netzwerks (links unten). Der erstmals von Cajal beschriebene trisynaptischen Schaltkreis umfasst die drei synaptischen Verschaltungen zwischen dem entorhinalen Kortex (EC) und dem Gyrus Dentatus (DG), von dort über die MF-Projektion zur CA3-Region und über die Schaffer-Kollateralen weiter zur CA1-Region geleitet. Das Subiculum (Sub) stellt die Ausgangsregion des Hippocampus dar und wird maßgeblich von CA1-Pyramidenzellen innerviert. (Quelle: Ramón y Cajal, 1911)

1.1.2 Der trisynaptische Schaltkreis

Dieser Schaltkreis beschreibt die trisynaptische Signalkette, welche im EC beginnt und sich bis zur CA1-Region des Hippocampus proper vorsetzt. Ein Großteil der exzitatorischen Eingänge in den Hippocampus gelangen über den sogenannten ‚tractus perforans‘ (oder perforant path = PP) in den Gyrus Dentatus (Andersen et al., 1971). Diese Fasern werden von Schicht-2-Neuronen des EC ausgesendet und innervieren im ersten Verschaltungsschritt die GCs des Gyrus Dentatus. Die Axone der GCs werden als „Moosfasern“ (MFs) bezeichnet, was wiederum auf die Beschreibungen von Cajal zurückgeht. Die unmyelinisierten MFs bilden riesige Boutons aus, welche die proximalen Apikaldendriten der CA3-Pyramidenzellen innervieren. Diese ca. 100 µm schmale Projektionsschicht ist optisch als helles Band identifizierbar, welches in der CA3-Region direkt an das sogenannte ‚Stratum pyramidale‘ anschließt und deshalb die Bezeichnung ‚Stratum lucidum‘ (lat.: lucidus = hell, leuchtend) trägt. Es bildet eine Unterordnung des Stratum radiatum des Hippocampus. Die MF-Synapsen zwischen GCs und CA3-Pyramidenzellen stellen die zweite Station der exzitatorischen trisynaptischen Verschaltung dar. Die CA3-Pyramidenzellen verschalten die exzitatorischen Signale anschließend über die Projektionsbahn der ‚Schaffer-Kollateralen‘, auf die apikalen und

basalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen. Von dort werden die exzitatorischen Signale ins Subiculum und zurück in den entorhinalen Kortex geleitet. GCs, hiläre MCs (Details siehe 1.3, Seite 10 ff.) sowie CA3- und CA1-Pyramidenzellen repräsentieren die Prinzipalneurone des Hippocampus, die im ausdifferenzierten Stadium ihrer Entwicklung Glutamat als Neurotransmitter freisetzen (Abbildung 1). Der aktuelle Forschungsstand eröffnet ein deutlich komplexeres Bild einer genetisch vorprogrammierten zellulären und synaptischen Organisation des Trisynaptischen Schaltkreises und damit auch ein weitergehendes Verständnis seiner Funktion bei Lern- und Gedächtnisprozessen. Mit Hilfe der gezielten Visualisierung genetischer Marker konnte gezeigt werden, dass sich dessen Prinzipalzellen während der frühen Entwicklungsphasen anhand spezifischer Expressionsmuster in heterogene Subpopulationen unterteilen lassen. Erstaunlicherweise treten synaptische Verbindungen innerhalb dieser Subpopulationen signifikant häufiger auf (Deguchi et al., 2011; Moser, 2011). Diese Befunde suggerieren, dass sich die Anatomie der seriellen Projektion aus mehreren parallel verlaufenden genetisch homogenen Schaltkreisen zusammensetzt (Abbildung 2). Neuere Studien konnten weitere genetische Subtypen von Neuronen identifizieren indem sie jeweils das komplette Transkriptom zur genetischen Differenzierung heranzogen (Lake et al., 2016).

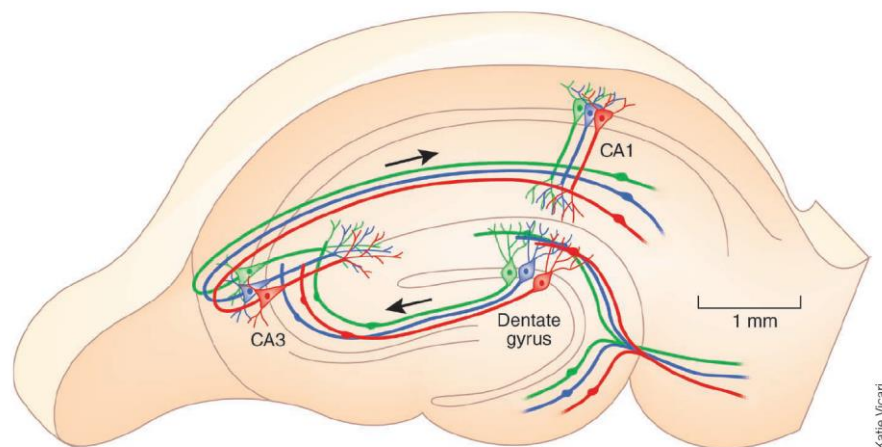


Abbildung 2: Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass sich der Trisynaptische Schaltkreis des Hippocampus in distinkte intrinsische Netzwerke unterteilt. Durch differenzierte genetische Expressionsmuster entstehen zelluläre Subpopulationen innerhalb der Prinzipalzellen. Synaptische Kontakte werden vermehrt mit Zielzellen der entsprechenden genetischen Unterpopulation ausgebildet (Quelle: Moser, 2011).

1.1.3 Die hippocampale MF-Projektion

Die unmyelinisierten MFs der GCs des Gyrus Dentatus verzweigen sich auf ihrem Weg zur CA3-Region mehrfach und bilden dabei synaptische Kontakte mit insgesamt vier verschiedenen Zielzelltypen aus (Henze et al., 2000). Die GCs leiten somit ihre Aktivität an das exzitatorische und das inhibitorische Netzwerk des Hippocampus weiter (Frotscher, 1989). Die MF-Projektion überträgt auf ihrem Weg von DG ins Stratum lucidum, die Information über eine sich ständig ändernden externen Umwelt, aus dem EC in den Hippocampus (Duffy et al., 2013; Danielson et al., 2017; GoodSmith et al., 2017; Senzai und Buzsaki, 2017). Dabei handelt es sich vor allem um sensorische Eingänge der visuellen, auditorischen und olfaktorischen Zentren.

Zu den exzitatorischen Zielzellen gehören die MCs des Hilus sowie die CA3-Pyramidenzellen. Durchschnittlich innerviert eine MF im Hilus 7 bis 12 MCs und etwa 15 CA3-Pyramidenzellen im Stratum lucidum. Zu den inhibitorischen Zielzellen der MF-Projektion gehören unter anderem die Korbzellen (basket cell) im Hilus und in der CA3-Region (Frotscher, 1989). Die Anzahl der von der MF innervierten Interneurone übersteigt die der exzitatorischen Prinzipalzellen um etwa den Faktor vier bis sechs (Acsady et al., 1998).

Die Quantifizierung der hippocampalen Prinzipalzellen ergab bei der Ratte pro Hemisphäre etwa 1 Millionen GCs und 300000 CA3-Pyramidenzellen. Demnach konvergieren im Durchschnitt etwa 20-40 Moosfaserterminalen auf eine CA3-Pyramidenzelle (Amaral et al., 1990; Acsady et al., 1998; Rolls et al., 1998).

Die Prinzipalzellen des trisynaptischen Schaltkreises bilden rekurrente (feed-back) und assoziative Verschaltungen untereinander aus und innervieren zusätzlich große Interneuronen-Netzwerke (siehe 0, Seite 6 ff.). Die Molekularschicht des DG weist zudem eine Schichtenspezifität der einlaufenden Terminalen auf. Dabei ist die äußere Molekularschicht (outer molecular layer, OML) überwiegend das Zielgebiet entorhinaler Fasern. Die assoziativen und kommissuralen Afferenzen der MCs innervieren hingegen die distalen Dendritenbereiche der inneren Molekularschicht (inner molecular layer = IML) (Buckmaster et al., 1992).

Einige Fasern des Tractus perforans der entorhinalen Schicht-2-Neuronen umgehen die Verschaltung auf den Gyrus Dentatus und innervieren stattdessen direkt die distalen Apikaldendriten der CA3 Pyramidenzellen. Sie ziehen innerhalb des sogenannten ‚Stratum lacunosum-moleculare‘ entlang des supra-pyramidalen Blatts des Gyrus dentatus in Richtung der CA3 Pyramidenzellen. Des Weiteren formen die stellaren Schicht-3-Neurone aus dem

entorhinalen Kortex synaptische Kontakte auf den distalen Apikaldendriten der CA1 Pyramidenzellen des *Stratum radiatum*.

1.1.4 Die Lamellenhypothese

Bei genauerer Betrachtung zeigt sich, dass die topologische Struktur des trisynaptischen Netzwerks in flachen aneinandergereihten Lamellen angelegt ist. Diese erstrecken sich jeweils transversal zur Längsachse des Hippocampus (Blackstad et al., 1970). Die Fasern unterschiedlicher Zellpopulationen des entorhinalen Kortex innervieren zielgerichtet nur jeweils spezifische Bereiche des Gyrus Dentatus (Hjorth-Simonsen und Jeune, 1972). Vor allem die Cytoarchitektur und das Verschaltungsmuster der GCs des Gyrus Dentatus (Blackstad et al., 1970; Claiborne et al., 1986; Acsady et al., 1998; Ropireddy und Ascoli, 2011) sowie die der Korbzellen (Interneurone) (Struble et al., 1978; Freund und Buzsáki, 1996; Sik et al., 1997; Amaral und Lavenex, 2007) und der CA1-Pyramidenzellen (Amaral et al., 1991; Amaral und Lavenex, 2007) entsprechen einer lamellar angeordneten Topologie. Diese Erkenntnisse stützten die sogenannte „Lamellen-Hypothese“ (Andersen et al., 1969). Neben den zahlreichen anatomischen Belegen konnte auf funktioneller Ebene gezeigt werden, dass nach fokaler Stimulation von entorhinalen Fasern eine lamellar verteilte Population an GCs erregt wurde (Lomo, 1971).

Die „Lamellen-Hypothese“ sollte jedoch nicht als funktionelles Dogma einer zweidimensionalen Verschaltungstopologie im Hippocampus verstanden werden, da augenscheinlich die Zytoarchitektur einiger Prinzipalzellen des hippocampalen Netzwerks die strikt lamellare Ordnung bereits verletzt. Fokussiert man sich jedoch nicht auf die rein strukturellen Merkmale der Zellen, sondern betrachtet die physiologische Funktion ihrer Projektion, findet man wiederum Anhaltspunkte für eine lamellare Organisation auf funktioneller Ebene (Amaral und Witter, 1989). Beispiele für weitreichende Projektionen sind etwa die longitudinal verlaufenden Axone der Schicht-2-Neurone des entorhinalen Kortex (Tamamaki und Nojyo, 1993), die autoassoziativen Fasern der CA3-Pyramidenzellen sowie die assoziativen Fasern der MCs im Hilus (Amaral und Witter, 1989; Soltesz et al., 1993; Buckmaster et al., 1996).

1.1.5 Das inhibitorische hippocampale Netzwerk

Die Notwendigkeit einer ausgeklügelten inhibitorischen Kontrolle des hippocampalen Netzwerks wird vor allem bei der Betrachtung der exzitatorischen Rückkopplungsschaltkreise deutlich. Die Erregung der GCs wird unter anderem auf die hilären MCs weitergeleitet. Die MFs der GCs bilden dabei sehr starke Verbindungen mit den MCs aus (siehe 1.2, Seite 8). Diese innervieren wiederum über rekurrente exzitatorische Verbindungen die proximalen Dendriten von GCs (Jackson und Scharfman, 1996) und lokale inhibitorische Interneurone (Seress und Ribak, 1984). Ein weiteres Beispiel für ein aufgeschaltetes neuronales Netzwerk stellt das auto-assoziative CA3-CA3-Netzwerk dar.

Interneurone kontrollieren die Aktivität der exzitatorischen Prinzipalzellen wiederum durch die Ausbildung komplexer aufgeschalteter und rückgekoppelter Verbindungen (feed forward- und feedback-Schaltkreise) im hippocampalen Netzwerk (Freund und Buzsáki, 1996). Die meisten Interneurone übertragen an ihren Synapsen den inhibitorischen Neurotransmitter GABA (γ -Aminobuttersäure). Das reine Zahlenverhältnis von exzitatorischen Prinzipalzellen zu den inhibitorischen Interneuronen liegt im Hippocampus in etwa bei 9:1.

Das funktionelle Zusammenspiel des inhibitorischen und exzitatorischen Netzwerks im Hippocampus konnte in einem eindrucksvollen Experiment veranschaulicht werden. Die Erregung einer einzelnen GC evozierte dabei in der postsynaptischen CA3-Pyramidenzelle eine starke Hyperpolarisation. Dieser netto-inhibitorische Effekt trat in der Pyramidenzelle überraschenderweise nur in Antwort auf einzelne Aktionspotentiale auf. Steigerte man jedoch die Stimulationsfrequenz, überwog schließlich die Exzitation (Mori et al., 2004).

Eine *in vivo*-Studie am Hippocampus der Ratte konnte zeigen, dass sich die Exzitation nach fokaler Stimulation des Tractus perforans nicht entlang der gesamten septo-temporalen Achse des Hippocampus ausbreitet, sondern auf eine schmale Lamelle des Gyrus Dentatus begrenzt blieb. Mit Hilfe zweier Ableitelektroden konnten die Forscher funktionell voneinander getrennte Bereiche identifizieren und beschrieben dies durch den physiologischen Effekt der lateralen Inhibition. Dieser steht in direktem Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der Temporallappenepilepsie. Den Forschern gelang es, durch die fokale Applikation von Bicucullin (GABA-Blocker) eine lokale Disinhibierung im Gyrus Dentatus der Ratte hervorzurufen. Eine erneute Stimulation des Tractus perforans evozierte dann epileptiforme Aktivität innerhalb einer Lamelle. Wurde Bicucullin injiziert, war der Effekt der Disinhibierung so stark, dass sich die evozierte epileptiforme Aktivität sogar über große Bereiche des Gyrus

dentatus ausbreiten konnte, was folglich zur Auflösung der funktionellen Trennung einzelner Lamellen führte (Sloviter und Brisman, 1995).

Anschaulich ist dieser Effekt vergleichbar mit der Betätigung des Fortepedals eines Flügels während des Klavierspiels. Dadurch kann der Ton einer angeschlagenen Taste langsam ausschwingen und versetzt die benachbarten Saiten zusätzlich in Schwingung (Obertöne, vgl. translamelläre Exzitation). In der Ausgangslage des Fortepedals unterdrücken die aufliegenden Dämpfer diese „lateralen“ Oberschwingungen (vgl. intakte Inhibition), so dass jeweils nur exakt der Ton der angeschlagenen Saite anschwingt.

1.2 Die hippocampale MF-Synapse

Die ungewöhnlichen Verdickungen der MFs weckten bereits 1911 das Interesse von Santiago Ramón y Cajal, der sie in seinen Zeichnungen als „Boutons“ bezeichnete. Aus der Betrachtung seiner Golgi-gefärbten Hirnschnittpräparate schloss er schon damals, dass die MF-Boutons, die er immer in engem Kontakt zu den Dendriten der Pyramidenzellen vorfand, die synaptischen Kontaktstellen dieser Projektion repräsentierten. Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen erfolgte die Erstbeschreibung dieser Synapse durch Theodor Blackstad und Åsmund Kjaerheim (Blackstad und Kjaerheim, 1961) und eine sehr detaillierte Beschreibung ihrer Ultrastruktur durch L. Hamlyn (Hamlyn, 1961b, 1962).

Daraus geht hervor, dass MF-Boutons eine sehr hohe Anzahl an synaptischen Vesikeln beherbergen. Ein einzelner MF-Bouton kann dabei einen Durchmesser von 4 -10 µm haben und umschließt regelrecht die Spineköpfe der postsynaptischen Excrescenzen (Abbildung 3). Hamlyn verweist schon damals auf die Struktur des Spine-Apparats, die regelmäßig in MF-Synapsen anzutreffen ist.

Ungewöhnlich ist zudem, dass eine einzelne Synapse bis zu 40 Release-Sites (Synaptische Dichten) zur Transmitterfreisetzung aufweisen kann (Chicurel und Harris, 1992). Anhand einer Reihe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen in Kombination mit immunhistochemischen Nachweismethoden konnten in den synaptischen Vesikeln der MF-Boutons eine Vielzahl an Modulator-Substanzen nachgewiesen werden.

Generell lassen sich in den MF-Boutons zwei Sorten an Vesikeln unterscheiden. Neben kleinen, mit Glutamat gefüllten Vesikeln zeigen sich in EM-Aufnahmen große Vesikel mit elektronendichten Kernbereichen (large dense core vesicles, LDCV). Diese speichern unter anderem die Neuropeptide Dynorphin, Enkephalin und Neuropeptid Y sowie den Wachstumsfaktor BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (McGinty et al., 1983; Connor et al., 1997; Yan et al., 1997; Henze et al., 2000; Kobayashi, 2010; Dieni et al., 2012). Die Vesikel der MF-Boutons enthalten zusätzlich größere Mengen des Neuromodulators Zink (Maske, 1955; Vogt et al., 2000) und Adenosin (Moore et al., 2003; Rebola et al., 2005).

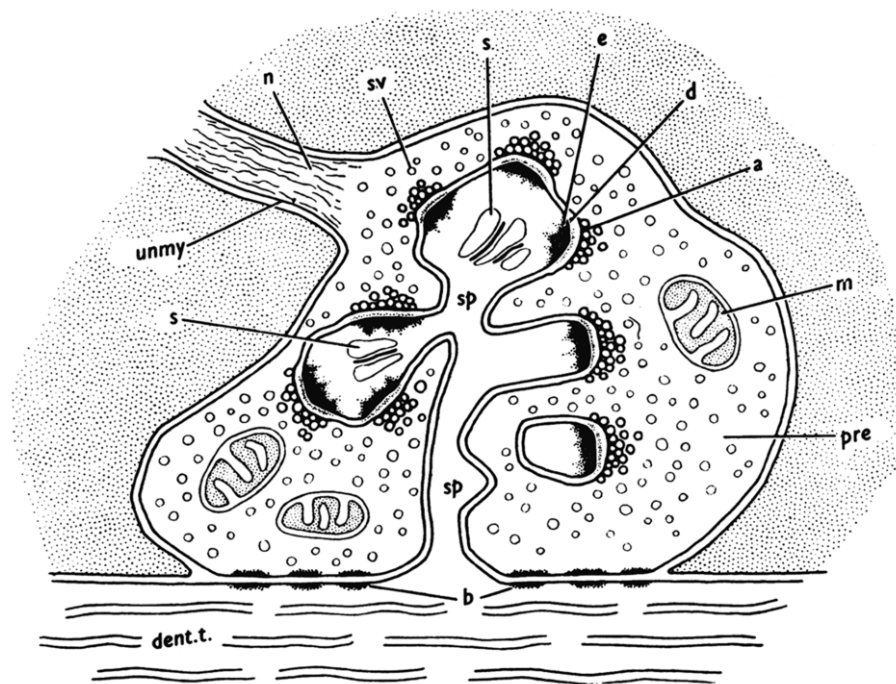


Abbildung 3: Schematische Darstellung der hippocampalen MF-Synapse. Die unmyelinisierte MF (unmy) bildet einem riesigen MF-Bouton. Die Axonterminalen enthalten tausende synaptische Vesikel (sv) und Mitochondrien (m) und umschließen regelrecht die Spineköpfe (sp) der postsynaptischen Excrescenz. Die Spines enthalten regelmäßig einen Spine-Apparat (s) (Quelle: Hamlyn, 1962).

1.3 Die hippocampale Mooszelle

Die MCs repräsentieren den Prinzipalzelltyp der Hilusregion. Im Gegensatz zu den anderen Prinzipalzellen des Hippocampus formen Mooszellen keine dichte Zellschicht, sondern liegen verstreut über den Hilus verteilt. Ihre Dendriten erstrecken sich über den gesamten Hilus. Der Name der „Mooszelle“ (mossy cell, MC) leitete sich von den „krustenartigen“ Ausstülpungen ab, die die ersten 40 – 80 μm der MC-Dendriten regelrecht überziehen und in ihrer Struktur an Moospflanzen erinnern (Amaral, 1978). Diese, oft mehrfach verzweigten, komplexen Spines werden als Excrescenzen bezeichnet und bilden die Zielstrukturen der MF-Projektion (Abbildung 4). MCs sind demnach die ersten Neurone, die die segregierte Information der GCs aus den multisensorischen Eingängen des EC empfangen. MC-Axone formen wiederum weitreichende assoziative und kommissurale Verbindungen (= interhemisphärische Verbindungen). Die Aktivität der GCs innerhalb einer Lamelle wird von den MCs entlang der septo-temporalen Achse über weite Bereiche des hippocampalen Netzwerks translamellär verschaltet (Laurberg und Sørensen, 1981; Frotscher et al., 1991; Buckmaster et al., 1992). Die stark konvergierende MF-Projektion wird somit durch eine hochgradig divergierende Projektion der MCs kontrastiert.

Das weitläufige Netzwerk der MCs bildet unter anderem exzitatorische Rückkopplungsschleifen (feedback-loop) zu GCs in benachbarten Lamellen. Zusätzlich innervieren MCs verschiedene Interneuronentypen des Gyrus Dentatus. Die Aktivierung inhibitorischer Korbzellen hat beispielsweise direkten Einfluss auf die Aktivität der GCs innerhalb einer Lamelle. Die komplexe anatomische Organisation sowie die funktionelle Signalverarbeitung der Hippocampusformation entsprechen demnach beide einer zwei-dimensionalen (innerhalb einer Lamelle) und einer drei-dimensionalen Topologie (entlang der septo-temporale Achse) (Sloviter und Lomo, 2012).

Phylogenetisch lassen sich klare Tendenzen bei der Lage, Größe und Komplexität der dendritischen Fortsätze von MCs ausmachen. So erstrecken sich beispielsweise bei Ratten nur etwa 12% der Gesamtdendritenlänge bis in die Molekularschicht des Gyrus Dentatus. Dort werden sie von den exzitatorischen Fasern des lateralen und medialen Tractus perforans aus dem entorhinalen Kortex innerviert. Dieses Phänomen ist bei Nerzen (*Neovison vison*) mit bis zu 29% bereits stärker ausgeprägt (Blackstad et al., 2016). Beim Menschen erreichen die dendritischen Fortsätze der MCs sehr häufig die Molekularschicht (Frotscher et al., 1991). Diese Befunde sprechen dafür, dass die afferenten Eingänge der MCs mit zunehmender phylogenetischer Nähe zum Menschen komplexer ausgeprägt sind.

Die Anzahl der MCs beträgt bei der Ratte schätzungsweise 30000 Zellen pro Hemisphäre (Buckmaster und Jongen-Relo, 1999). Auf einer einzelnen MC müssten demnach ca. 200-400 Moosfaserterminalen enden (Ribak et al., 1985; Claiborne et al., 1986; Amaral et al., 1990) (Rechnung: $1.000.000 \text{ GCs} * 7 \text{ bis } 12 \text{ MF-Terminalen auf MCs im Hilus} / 30.000 \text{ MCs} = 200-400 \text{ Terminalen/MC}$). Neuere Schätzungen gehen davon aus, dass eine einzelne MC von ca. 100 GCs innerviert wird (Henze und Buzsaki, 2007), also ein Vielfaches der GC-CA3-Verbindungen (vgl. 40-60 MF-Terminalen/CA3-Pyramidenzelle).

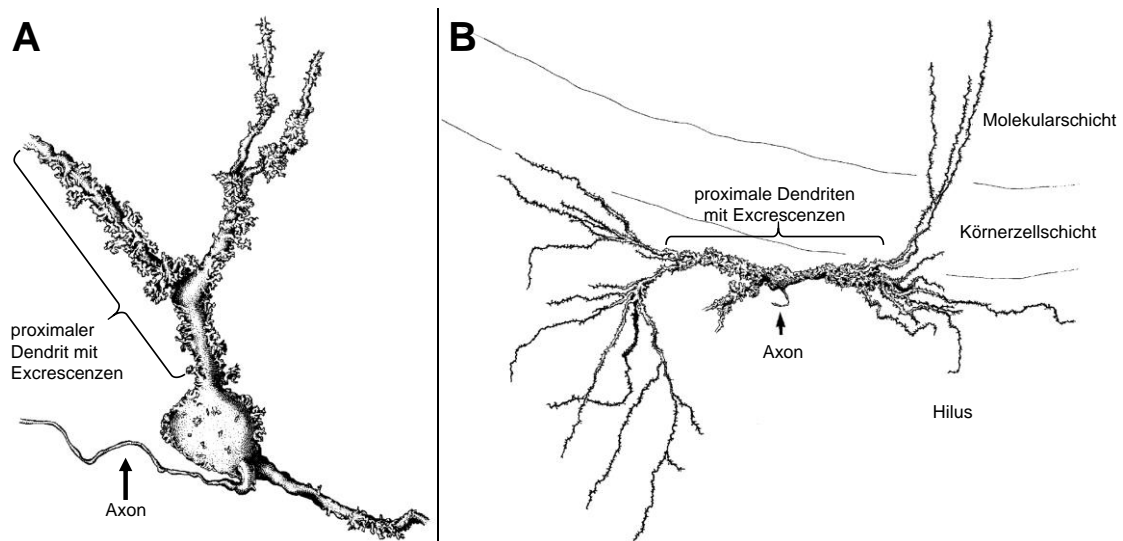


Abbildung 4: Mit Hilfe der „Camera lucida“ angefertigte Tuschezeichnungen hippocampaler MCs von Rhesus Affen. **A** Die MC trägt ihren Namen auf Grund der dichten Ausprägung komplexer Spines (Exzreszenzen) auf ihren proximalen Dendriten, die an „moosartigen Bewuchs“ erinnern (Quelle: Frotscher et al., 1991) **B** Bei Primaten durchlaufen die Dendriten der MCs die Körnerzellschicht und dringen bis in die Molekularschicht vor, wo sie durch Fasern des Tractus perforans innerviert werden. Die anatomische Besonderheit der zunehmend komplexeren afferenten Verschaltung der MCs steigt mit dem phylogenetischen Grad der Spezies erinnern (Quelle: Frotscher et al., 1991).

1.4 Die Spine-Apparat Organelle

Neurone besitzen ein kontinuierliches und stark verzweigtes System aus glattem endoplasmatischem Retikulum (ER). Es erstreckt sich einerseits über das Perikaryon und alle Dendritenfortsätze bis in die dendritischen Spines, andererseits auch über den fein verästelten Axonplexus (Abbildung 5). Im Jahr 1959 beschrieb Edward George Gray mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen erstmals, dass das ER in manchen Spines in Form von stapelförmigen Zisternen vorlag. Diese spezielle Anordnung stellt eine komplexere Konfiguration des ERs dar. Gray nannte diese Struktur daher Spine-Apparat:

„The spine Zytoplasm often contains a structure that does not occur in the dendrite trunk or perikaryon. This is termed a Spine-Apparatus. ... The spine apparatus consists of two, three or more membrane-bound spaces, here referred to as sacs, although they might represent continuous channels.“ (Gray, 1959).

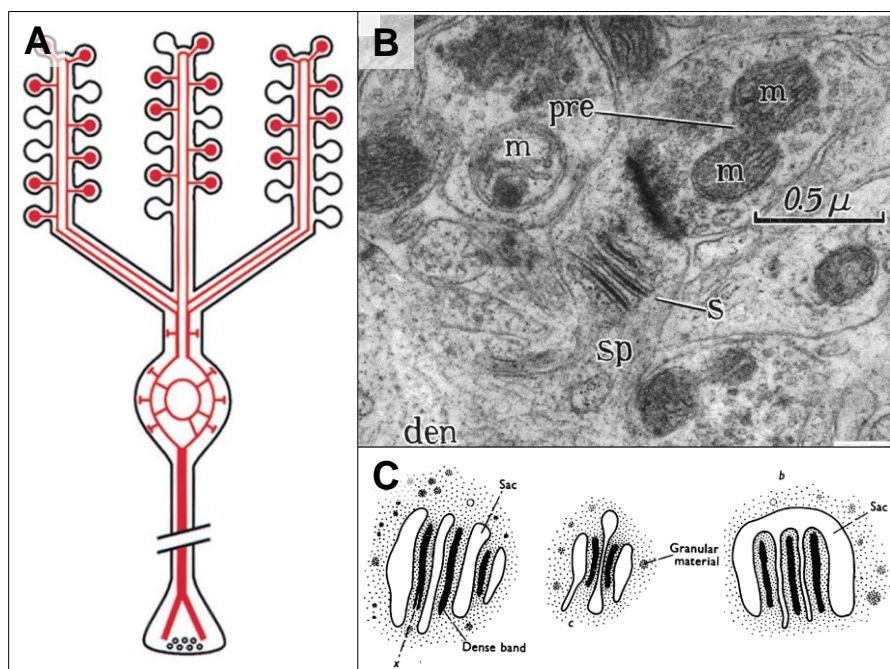


Abbildung 5: **A** Schematische Darstellung des intrazellulären Netzwerkes aus kontinuierlichem Endoplasmatischem Retikulum (ER) eines Neurons. Das ER erstreckt sich innerhalb des Zellkörpers über die Dendriten bis in die dendritischen Spines hinein sowie entlang des gesamten Axons. Einige dendritische Spines verfügen über Zisternen aus ER-Einstülpungen (Quelle: Berridge, 1998). **B** Elektronenmikroskopische Aufnahme kortikaler Neurone (Quelle: Gray, 1959). Der von einem Dendriten (den) abgehende Spinekopf (sp) enthält einen Spine-Apparat (s). Das präsynaptische Element (pre) enthält eine große Zahl an synaptischen Vesikeln und mehrere Mitochondrien (m). **C** Detailzeichnungen zeigen den Spine-Apparat als eine lokale Spezialisierung des ERs in Spines, deren strukturelle Komplexität die einfacher ER-Zisternen übertrifft (Quelle: Gray, 1959). Der Spine-Apparat setzt sich aus mehreren parallel angeordneten ER-Stapeln (sacs) zusammen interkaliert von elektronendichten Banden (dense band).

1.4.1 Die enigmatische Funktion des Spine-Apparats

Der Spine-Apparat wird seit seiner Entdeckung als eigenständige Organelle betrachtet. Er wird nur von bestimmten Neuronen des Vorderhirns und des Hippocampus bei Säugetieren gebildet. Seine Funktion ist bis heute jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Die Vermutung, dass der Spine-Apparat in den Spines von kortikalen Neuronen möglicherweise bei der Regulation von Plastizitätsmechanismen und der neuronalen Verarbeitung von Lern- und Gedächtnisprozessen eine wichtige Rolle spielen könnte, wurde schon kurz nach seiner Entdeckung angestellt. In einer frühen Beschreibung der Ultrastruktur der hippocampalen MF-Synapse, äußerte bereits im Jahr 1962 L. H. Hamlyn folgende interessante Hypothese über die Funktion des Spine-Apparats:

„The dendritic spine apparatus has so far only been seen in the mammalian neocortex and Hippocampus, both of which appear to be structures capable of the most complex neural functions. There is experimental evidence (Stepien, Cordeau & Rasmussen, 1960) that the Hippocampus is associated at least with short term memory. It may be that the changes associated with memory and learning are located in the post-synaptic process and that such changes are in some way mediated by and dependent upon the presence of the dendritic Spine-Apparatus.” (Hamlyn, 1962).

Eine dem Spine-Apparat sehr ähnliche Struktur aus flachen, lamellenförmigen Zisternen des glatten endoplasmatischen Retikulums findet man im Axoninitialsegment von telencephalischen Prinzipalneuronen (Peters et al., 1968). Auch die Funktion dieser sogenannten ‚cisternal organelle‘ ist bisher unbekannt. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass sie keinen Einfluss auf die Form und Ausbildung von Aktionspotentialen hat (Bas Orth et al., 2007).

1.4.2 Entwicklung der Spine-Apparat Organelle

Ultrastrukturelle Untersuchungen konnten zeigen, dass die Ausbildung der Spine-Apparate offenbar erst im Verlauf des postnatalen Entwicklungsstadiums beginnt. In sogenannten ‚Mushroom‘-Spines von CA1-Pyramidenzellen junger Ratten (postnataler Tag 21 = P21) fand man lediglich in einem von 24 Spines einen Spine-Apparat (Cooney et al., 2002). Studien an noch jüngeren Tieren (P15) kamen sogar zu dem Ergebnis, dass CA1-Spines in diesem frühen Stadium nur unreife Spine-Apparate ausgebildet hatten, die sich nur aus wenigen glatten ER-Zisternen zusammensetzten (‚pre-Spine-Apparatus‘). Hingegen besitzen Neurone von adulten Tieren in der Regel einen weitaus komplexeren Spine-Apparat, bestehend aus mehreren eng gepackten ER-Zisternen (Harris et al., 1992). Die Anzahl und Größe der

ausgebildeten ER-Zisternen war in Neuronen adulter Tiere trotzdem sehr heterogen verteilt. Die zunehmend komplexere Struktur der gefundenen Spine-Apparate korrelierte jedoch mit der steigenden Gesamtfläche der postsynaptischen Dichte (Spacek und Harris, 1997). Anhand der Vermessung von dreidimensional rekonstruierten Spine-Apparaten konnten die Autoren zusätzlich zeigen, dass deren Volumen durchschnittlich nur 2 % - 3,5 % des Volumens eines Spinekopfs entsprach. Jedoch betrug die Membranoberfläche der gefalteten ER-Stapel auf erstaunliche 12 % - 40 % der gesamten Spinemembran. Das Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis dient somit als Maß für die strukturelle Komplexität des Spine-Apparats und korreliert offensichtlich mit dem Entwicklungsstadium der Neurone.

1.4.3 Struktur-Funktionsanalyse des Spine-Apparats

Auf Grund der hohen Ca^{2+} -Konzentration im Inneren des ERs wurde für den Spine-Apparat schon früh eine Funktion als Ca^{2+} -Speicher vermutet. Somit könnte der Spine-Apparat als Ca^{2+} -sezernierende Organelle die lokalen Ca^{2+} -Konzentrationen in einzelnen Spineköpfen während synaptischer Übertragung regulieren (Fifkova et al., 1983), was sich in der funktionellen Konsequenz mit der von Hamlyn im Jahr 1962 aufgestellten Hypothese decken würde. Die Präsenz von glatten Vesikeln in der Nähe der Zisternen des Spine-Apparats galt als Hinweis, dass die Organelle möglicherweise auch als Membranlieferant für das Spinewachstum fungieren könnte. Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Spine-Apparats an der lokalen Synthese von integralen Membran- und Sekretionsproteinen sowie deren posttranslationalen Modifikation, lieferten vor allem die Studien von (Pierce et al., 2000; Pierce et al., 2001). Weitere Arbeiten zum Sekretionsweg von Proteinen in dendritischen Spines zeigten eine Kollokalisierung von AMPA- und NMDA-Rezeptoren mit dem Spine-Apparat. Dies führte zur weiterführenden Hypothese, dass zwischen Spine-Apparat und der synaptischen Dichte ein Transport und Austausch von wichtigen synaptischen Proteinen, beispielsweise von Ionenkanälen, stattfindet (Spacek und Harris, 1997; Nusser et al., 1998; Racca et al., 2000)

1.4.4 Synaptopodin – ein Spine-Apparat assoziiertes Protein

Mittlerweile konnten eine Reihe unterschiedlicher Proteine mit der Struktur und dem Aufbau des Spine-Apparats in Verbindung gebracht werden. Unter ihnen sind F-Aktin und α -Aktinin, die Hauptbestandteile des Spine-Zytoskeletts sowie das Aktin-assoziierte Protein Synaptopodin (Mundel et al., 1997; Deller et al., 2000). Das Protein Synaptopodin verfügt über zwei Mikrofilamentbindungsstellen, wobei die α -Aktinin Bindungsstelle dem C-terminalen

Ende zugewiesen werden konnte. Molekularbiologische Untersuchungen konnten bisher für Synaptopodin keine enzymatische Aktivität nachweisen. Dessen lineare Konformation lässt zusammen mit der Interaktionsfähigkeit mit F-Aktin eher eine strukturgebende Rolle vermuten. Intaktes Synaptopodin lagert sich gezielt an Mikrofilamentstrukturen an, während eine mutierte Version des Proteins, bei der das C-terminale Ende fehlte, diese gerichtete Bindungsaffinität verloren hatte (Kremerskothen et al., 2005).

Untersuchungen auf ultrastruktureller Ebene ergaben, dass Synaptopodin in hippocampalen Neuronen ausschließlich in den Dendriten und Spines lokalisiert ist. Mit Hilfe von immun-histochemischen Verfahren konnte Immunogold-markiertes Synaptopodin nur in Spines nachgewiesen werden, die einen Spine-Apparat beherbergten (Deller et al., 2000). Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass Synaptopodin den Spine-Apparat möglicherweise an das Aktin-Zytoskelett koppelt und er damit auch eine Rolle bei der Aktin-assoziierten Plastizität der Spines (Bewegung und Formveränderung) spielen könnte.

1.4.5 Synaptopodin-defiziente Neurone bilden keine Spine-Apparate

Die Synaptopodin-defiziente Mauslinie wurde ursprünglich zur Untersuchung der Rolle von Synaptopodin auf die Nierenfunktion generiert. Bei der Charakterisierung der Tiere stellte sich unerwarteter Weise kein Nieren-Phänotyp heraus, hingegen wurde auf die starke Expression von Synaptopodin in Neuronen verwiesen (Mundel et al., 1997). Spätere Befunde zeigten auf ultrastruktureller Ebene überraschenderweise, dass Synaptopodin-defiziente Mäuse sowohl keine Spine-Apparate als auch keine ‚cisternal organelles‘ im Axoninitialsegment ausbilden konnten (Deller et al., 2003; Bas Orth et al., 2007). Die entwicklungsbedingte Umwandlung von ER-Membranausstülpungen in die lamellenartige Struktur des Spine-Apparats stellt eine Überführung von einfachen ER-Zisternen in eine strukturell höhere Konformation dar. Das Protein Synaptopodin ist offensichtlich notwendig für diese strukturelle Reorganisation, welche möglicherweise durch die Assoziation zum Aktin-Zytoskelett mit einhergeht. Die Expression von Synaptopodin in hippocampalen Prinzipalzellen beginnt bei Nagern innerhalb der ersten postnatalen Woche und steigert sich parallel zu den Stadien der Spinereifung und Entwicklung des Hippocampus. Ein Vergleich der Ultrastruktur von Synaptopodin-defizienten Spines (KO-Spines) im adulten Zustand mit Spines, die einen Spine-Apparat ausbildeten (WT-Spines), ergab keine Unterschiede.

1.4.6 Synaptopodin-defiziente Mäuse zeigen Defizite in Lern- und Gedächtnisprozessen

In Verhaltensexperimenten zeigten Synaptopodin-defiziente Tiere im sogenannten „radial-arm-maze“-Test deutlich höhere Fehlerraten, was eine verminderte Fähigkeit bei räumlichen Lernaufgaben nahelegt. Im sogenannten „elevated plus maze“-Test hielten sich die Tiere signifikant länger im offenen Bereich des Labyrinths auf, was im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen als weniger ängstliches Verhalten interpretiert wurde. Elektrophysiologische *in vitro*-Ableitungen ergaben zudem eine verminderte Ausprägung von Langzeitpotenzierung an der Schaffer-Kollaterale in der CA1-Region des Hippocampus (Deller et al., 2003).

Unter Betrachtung aller beschriebenen Defizite legt das Fehlen der Spine-Apparat-Organelle in allen Spines telencephalischer Neurone von Synaptopodin-Knockout Mäusen einen funktionellen Einfluss des Spine-Apparats auf die synaptische Plastizität sowie Lern- und Gedächtnisfunktionen nahe. An dieser Stelle sollte noch einmal explizit darauf hingewiesen werden, dass dendritische Spines Synaptopodin-defizienter Neurone häufig einfache Zisternen aus glattem ER aufweisen. Der Synaptopodin-Knockout führt nicht zu einem ER-Knockout in Spines, sondern betrifft bei ansonsten unveränderter Ultrastruktur nur die Ausbildung des Spine-Apparats. Analog dazu ist bekannt, dass z.B. in cerebellären Purkinje-Zellen kein Synaptopodin exprimiert wird. Deren Spines verfügen über ER-Zisternen, bilden aber niemals einen Spine-Apparat aus.

Die Synaptopodin-Knockout Mauslinie stellt damit ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung der molekularen Zusammenhänge zwischen Synaptopodin und der Spine-Apparat-Organelle dar. Obwohl Spines von Synaptopodin-defizienten Tieren nicht dazu in der Lage sind, Spine-Apparate auszubilden, beherbergen sie anstelle des Spine-Apparats i.d.R. einfache ER-Membranfänger (Deller et al., 2007).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollen zu einem besseren Verständnis der Spine-Apparat-Organelle beitragen und fokussieren sich auf die postsynaptischen Ca^{2+} -Dynamik an der hippocampalen MF-Synapse und deren Einfluss auf die Mechanismen der Langzeitplastizität.

1.5 Calcium in Neuronen

1.5.1 Calcium als ubiquitärer Signalstoff

Exzitatorische synaptische Verbindungen hippocampaler Neurone sind häufig an dendritischen Spines lokalisiert. Jeder Spinekopf ist morphologisch durch einen dünnen Spinehals vom Dendriten getrennt, was ihn funktionell zu einem individuellen biochemischen Kompartiment macht. Diese Art der Kompartimentalisierung ermöglicht es Neuronen, die Bedeutung postsynaptischer Signale aus unterschiedlichen Stimulationsquellen zu unterscheiden und in verschiedenartige physiologische Reaktionen umzuwandeln. Dabei interagiert frei diffusible Ca^{2+} -Ionen als ubiquitärer Signalstoff im Cytoplasma dendritischer Spines mit einer Fülle von Struktur-, Signal- und Modulatorproteinen, wie z.B. bei der Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII), die eine zentrale Rolle bei der Induktion synaptischer Langzeitplastizität (LTP) einnimmt. Über die Aktivierung komplexer intrazellulärer Signalkaskaden erfolgt anschließend die Rekrutierung zusätzlicher AMPARs in die Synapse (Malenka, 1999; Lisman et al., 2002; Malenka und Bear, 2004).

Während der basalen synaptischen Übertragung ruft die Aktivierung der glutamatergen AMPA-Rezeptoren (AMPARs) den Hauptanteil der depolarisierenden Ströme in der postsynaptischen Zelle hervor. Gleichzeitig löst das freigesetzte Glutamat einen NMDAR-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in den postsynaptischen Spine aus (Koester und Sakmann, 1998; Yuste et al., 1999; Kovalchuk et al., 2000). Der Anteil der NMDAR-vermittelten Ca^{2+} -Ströme am Nettostrom in das postsynaptische Kompartiment sind im Vergleich zu den AMPAR-vermittelten Na^+/K^+ -Strömen verhältnismäßig gering. Die postsynaptische Spannungsantwort wird demnach maßgeblich durch die Aktivierung vorhandener AMPARs vermittelt, wohingegen der Hauptanteil des postsynaptischen Ca^{2+} -Influx NMDAR-abhängig ist (Mainen et al., 1999; Svoboda und Mainen, 1999; Kovalchuk et al., 2000; Sabatini et al., 2002).

Die Pore des NMDAR ist bei negativen Membranspannungen durch Mg^{2+} -Ionen blockiert. Die Ca^{2+} -Leitfähigkeit des Rezeptors steigt nach der Aktivierung durch Glutamat erst bei gleichzeitiger Depolarisierung der postsynaptischen Membran. Die zurückpropagierende Depolarisationswelle eines APs (backpropagating action potential, bAP) ist beispielsweise in der Lage, den Mg^{2+} -Block des NMDARs effizient zu überwinden. Bei zeitlich korrelierter Aktivität der prä- und postsynaptischen Zelle führt die Kombination aus glutamaterger Aktivierung gemeinsam mit einer hohen Ca^{2+} -Leitfähigkeit zu einem supralinearem Anstieg

der Ca^{2+} -Konzentration im Spine (Yuste und Denk, 1995; Koester und Sakmann, 1998). Diese biophysikalische Eigenschaft des NMDA-Rezeptors verleiht den dendritischen Spines die Eigenschaft eines zeitlichen Koinzidenzdetektors für prä- und postsynaptische Aktivität (Bliss und Collingridge, 1993; Spruston et al., 1995; Yuste und Denk, 1995).

Während der Aufstrichphase unter- und überschwelliger Depolarisationen werden in der postsynaptischen Membran zusätzlich spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle (voltage-gated Ca^{2+} channel, VGCC) aktiviert und sorgen für einen zusätzlichen Ca^{2+} -Influx (Jaffe et al., 1994; Magee und Johnston, 1995). Die Existenz von VGCCs wurde auch an den Excrescenzen der MF-Synapse bestätigt (Jaffe und Brown, 1997).

Die primäre Triebkraft des Ca^{2+} -Influx in die postsynaptische Zelle sind die herrschenden Konzentrationsunterschiede zwischen den extra- und intrazellulären Kompartimenten. Da die absoluten Werte der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nicht direkt messbar sind, gibt es eine Fülle von Schätzungen und Hochrechnungen aus der Literatur (Bygrave und Benedetti, 1996; Sabatini et al., 2001). Im Ruhezustand eines Neurons sorgen die Prozesse der Ca^{2+} -Homöostase aktiv dafür, dass die Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol (± 100 nM) im Vergleich zum Extrazellulärraum (± 2 mM) um mehrere Größenordnungen verringert wird. Unter Energieverbrauch pumpen Plasmamembran-gebundene Ca^{2+} -ATPasen dazu ständig Ca^{2+} -Ionen aus dem Cytosol in den Extrazellulärraum. Zusätzlich befördern ATP-getriebene SERCA-Pumpen (sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) in der Membran des glatten ERs, Ca^{2+} -Ionen ins Innere der internen Speicher. Die Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration innerhalb des ERs ist ebenso nicht direkt messbar, weshalb die Angaben in der Literatur zwischen $100 \mu\text{M}$ bis $800 \mu\text{M}$ schwanken (Feske, 2007). Ältere Studien gehen im Durchschnitt von Werten zwischen $20 \mu\text{M}$ bis 2 mM aus (Bygrave und Benedetti, 1996).

Der Kinetik des NMDAR- und VGCC-vermittelten Ca^{2+} -Influx stehen demnach die aktiven Extrusionsmechanismen der zellulären Ca^{2+} -Homöostase gegenüber. Weitere Einflüsse auf den Verlauf der postsynaptischen Ca^{2+} -Transienten nehmen passive Diffusionsprozesse durch den Spinehals sowie, die Pufferwirkung Ca^{2+} -bindender Proteine im Cytosol (Calmodulin, Calbindin, etc.). Die Zeitkonstanten des Ca^{2+} -Influx sind im Vergleich zur Kinetik der passiven Diffusionsprozesse durch den engen Spinehals sehr schnell (wenige Millisekunden). Nach synaptischer Aktivierung führt das komplexe Zusammenspiel dieser Komponenten umgehend zu hohen Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten zwischen Spines und den angrenzenden Dendritensegmenten. Die Diffusionsbarriere des Spinehalses hat gleichzeitig den Effekt, dass postsynaptisch evozierte Ca^{2+} -Transienten (CaTs) primär unabhängig vom benachbarten

Dendriten und Spines verarbeitet werden können. Am Beispiel von hippocampalen CA1-Pyramidenzellen konnte gezeigt werden, dass nach synaptischer Stimulation die Ca^{2+} -Konzentration im Spinekopf Werte von ca. $30 \mu\text{M}$ erreichten, wogegen sie im benachbarten Dendriten zur gleichen Zeit bei ca. $5 \mu\text{M}$ bis $10 \mu\text{M}$ lagen (Petrozzino et al., 1995). Auf Grund der hohen Dynamik von Influx- und Extrusionsprozessen ist eine amplituden- als auch eine frequenzabhängige Signalcodierung auf Einzelspine-Niveau denkbar (Sabatini et al., 2002).

1.5.2 Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern

Neben dem NMDAR- und VGCC-vermittelten Ca^{2+} -Influx aus dem Extrazellulärraum wurden in hippocampalen Neuronen weitere Mechanismen der Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern des ERs gefunden. Dabei handelt es sich einerseits um die Aktivierung von metabotropen G-Protein-gekoppelten Glutamatrezeptoren (mGluRs), welche über eine Phospholipase C-abhängige Signaltransduktion anschließend die Ca^{2+} -Freisetzung mittels IP_3 -Rezeptoren induziert (Berridge, 1993; Frenguelli et al., 1993). Andererseits wurde in Spines hippocampaler Neurone die Ryanodin-Rezeptor (RyR)-abhängige Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (CiCR) als ein weiterer Mechanismus identifiziert (McPherson et al., 1991; Miller, 1991; Jaffe et al., 1994). RyRs gehören zur Gruppe der Ca^{2+} -sensitiven Ca^{2+} -Kanäle, deren Aktivierung zu einer dynamischen Verstärkung der postsynaptischen Ca^{2+} -Antwort in Spines und Dendriten beiträgt (Lipscombe et al., 1988; Friel und Tsien, 1992; Shmigol et al., 1995). Die Latenzzeit der IP_3 -vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung ist auf Grund der involvierten intrazellulären Signalkaskaden deutlich langsamer als der CiCR.

In der Literatur existieren zum Teil widersprüchliche Befunde und Interpretationen darüber, welcher Mechanismus vorwiegend für die postsynaptische Ca^{2+} -Antwort in den Spines der MF-Synapsen verantwortlich ist. Einerseits wurde der CiCR anstelle des NMDAR-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms als Hauptquelle identifiziert (Emptage et al., 1999). Andererseits konnte diese Schlussfolgerung in einer Folgestudie jedoch nicht bestätigt werden, woraufhin ein AMPAR-abhängiger VGCC-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom postuliert wurde (Reid et al., 2001).

In Rahmen einer vorausgegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe über die Rolle des Spine-Apparats als Ca^{2+} -Speicher während der synaptischen Transmission an der hippocampalen MF-Synapse konnte mittels pharmakologischer NMDAR-Blockade anschaulich gezeigt werden, dass die NMDARs die Hauptquelle des postsynaptischen

Ca^{2+} -Einstroms waren (Dissertation Tippmann, 2014). Des Weiteren konnte anhand der erhobenen Daten geschlussfolgert werden, dass der AMPAR-abhängige VGCC-vermittelte Ca^{2+} -Influx einen geringen Anteil zum Gesamteinstrom von Ca^{2+} beiträgt. Diese Ergebnisse deckten sich mit früheren Befunden an der Schaffer-Kollateral-Synapse der CA1-Pyramidenzellen (Mainen et al., 1999; Kovalchuk et al., 2000; Sabatini et al., 2002; Nimchinsky et al., 2004).

1.6 Plastizitätsmechanismen an der MF-Synapse

1.6.1 Kurzzeitplastizitätsmechanismen an der MF-Synapse

Ein charakteristisches Merkmal der hippocampalen MF-Synapse ist eine starke Doppelpuls-Faszilitierung (paired-pulse facilitation, PPF) (Schmitz et al., 2001). Die Antwort auf den zweiten Stimulus einer Doppelpuls-Stimulation (PPS) fällt dabei stärker aus als auf den Ersten. Diese Form der Kurzzeitplastizität (short term plasticity, STP) beruht auf der Ca^{2+} -Akkumulierung im präsynaptischen MF-Bouton und der damit verbundenen Steigerung der Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit (release probability, p_R) an den präsynaptischen Dichten (release sites) (Wu und Saggau, 1994). Die effektive p_R einer MF-Synapse ergibt sich demnach aus der kumulativen Wahrscheinlichkeit der p_{R_s} aller vorhandenen Release Sites und ist relativ gering (Reid et al., 2001). Über das Verhältnis der Doppelpuls-Antworten (paired-pulse ratio, PPR) lässt sich der aktuelle Zustand, bzw. die effektive p_R des MF-Boutons bestimmen (Amplitude zweite Antwort / Amplitude erste Antwort). In Antwort auf eine AP-Serie erhöht die Ca^{2+} -Akkumulierung im MF-Bouton sukzessive die p_R und damit die Menge an freigesetztem Transmitter. Daraus leitet sich die Eigenschaft der MF-Synapse als „konditionale Detonatorsynapse“ ab, die bei repetitiver Aktivierung direkt APs in der postsynaptischen CA3-Pyramidenzelle generieren kann (Vyleta et al., 2016).

1.6.2 Langzeitplastizitätsmechanismen an der MF-Synapse

Die anhaltende Veränderung der synaptischen Transmissionsstärke synaptischer Verbindungen ist ein fundamentales Prinzip neuronaler Netzwerke und gilt bis heute als Korrelat für Lern- und Gedächtnisprozesse (Hebb, 1949). In der Fachliteratur unterscheidet man zwischen Hebb'scher Plastizität, die eine koinzidente Aktivierung der prä- und postsynaptischen Zelle erfordert. Dem gegenübergestellt werden Formen nicht-Hebb'scher Plastizitätsmechanismen, deren Induktion entweder von prä- oder postsynaptischer Aktivierung allein abhängig ist (McNaughton und Barnes, 1990). Damit nimmt die biophysikalische Funktion des NMDAR als Koinzidenzdetektor eine zentrale Rolle an Hebb'schen Synapsen ein. Die Plastizitätsmechanismen an der hippocampalen Moosfasersynapse standen in den letzten Jahren im Mittelpunkt vieler Studien, die ein umfassendes Verständnis über die Gemeinsamkeiten und Alleinstellungsmerkmale der MF-Synapse gegenüber anderen intensiv untersuchten Synapsen (z.B. die Schaffer-Kollateral-Synapse, CA3 → CA1), herausarbeiten konnten. Frühe Untersuchungen

an der MF-Synapse zeigten, dass die Induktion von LTP nach tetanischer Stimulation (2x 1s, 100 Hz) NMDAR-unabhängig ablief. Daraufhin wurde ein von der klassischen Hebb'schen Synapse abweichender, rein präsynaptischer LTP-Mechanismus an der MF-Synapse postuliert, der unabhängig von jeglicher postsynaptischer Aktivierung eintritt (Harris und Cotman, 1986; Zalutsky und Nicoll, 1990; Nicoll und Malenka, 1995; Mellor und Nicoll, 2001; Nicoll und Schmitz, 2005; Granger und Nicoll, 2014). Abweichend davon konnten schon damals andere Studien klare Hinweise für Hebb'sches Lernen an der hippocampalen MF-Synapse (Jaffe und Johnston, 1990) und zeigten auf, dass die Form der induzierten Plastizität vom angewandten Stimulationssprotokoll abhängig war, weil die Voraussetzung für die Induktion postsynaptischer LTP-Mechanismen eine effektive Öffnung der Ca^{2+} -permeablen NMDARs und ein damit verbundener, starker postsynaptischer Ca^{2+} -Einstrom sei (Urban und Barrionuevo, 1996; Yeckel et al., 1999). Aktuellere Studien kamen darin überein, dass die Moosfasersynapse eine unerwartete Bandbreite nicht-Hebb'scher und Hebb'scher Plastizitätsmechanismen hervorbringt (Henze et al., 2000; Urban et al., 2001; Nicoll und Schmitz, 2005; Rollenhagen und Lübke, 2010), darunter auch eine Form selektiver NMDAR-Potenzierung (Kerr und Jonas, 2008; Kwon und Castillo, 2008; Rebola et al., 2008), die als eine Art Metaplastizitätsschalter die MF-Synapse für die klassische Form der Hebb'schen Plastizität zugänglich macht (Rebola et al., 2011). Die angewandten Stimulationsprotokolle zur Induktion des NMDAR-abhängigen NMDA-LTP umfassten dabei eine einzige Serie aus 24 Pulsen bei 25 Hz (Kwon und Castillo, 2008), oder 6x 6 Pulse bei 50 Hz (Rebola et al., 2011) und riefen dabei keine präsynaptische Potenzierung hervor. Die ungewöhnliche Bandbreite der parallel existierenden NMDR-unabhängigen und abhängigen Plastizitätsformen macht die MF-Synapse zu einem vielfältigen Forschungsobjekt, das weiterer, tiefergehender Untersuchungen bedarf.

2 Fragestellung

2.1 Teil I

Der aktuelle Forschungsstand bezüglich der Beteiligung des CiCR an den postsynaptischen Ca^{2+} -Antworten der MF-Synapse umfasst teilweise unterschiedliche und sogar widersprüchliche Aussagen. Ein Teil der Studien konnte eine Beteiligung des CiCR an der MF-Synapse ausschließen (Mainen et al., 1999; Kovalchuk et al., 2000; Sabatini et al., 2002). Eine andere Studie verwies wiederum auf dessen maßgebliche Beteiligung (Emptage et al., 1999).

Aus der Studie von Tippmann, 2014 deutete sich unter der Annahme einer mechanistischen Verbindung zwischen dem Spine-Apparat und dem CiCR ein möglicher Einfluss auf die postsynaptischen Ca^{2+} -Antworten an. Im Fall basaler Aktivierung (Einzelpulse, Zwei-Photonen-Glutamat-Uncaging) unterschieden sich die Ca^{2+} -Antworten zwischen Synaptopodin-defizienten- und WT-Excrescenzen nicht voneinander. Hingegen waren die Ca^{2+} -Antworten in den KO-Excrescenzen bei starker Stimulation (Stimulationsserie, 24 Pulse, 25 Hz) signifikant schwächer ausgeprägt. Diese Befunde lieferten uns weitere Hinweise dafür, dass der Spine-Apparat offenbar einen Einfluss auf die postsynaptische Ca^{2+} -Kinetik hat und deckten sich mit älteren Untersuchungen, in denen mit Hilfe unterschiedlicher bAP-Serien stimuliert wurde (Drakew et al., 2007). Da es zwischen den beiden Genotypen keinen Hinweis auf eine unterschiedliche VGCC-, AMPAR- und NMDAR-Ausstattung der Synapsen gab (Deller et al., 2003), kam als möglicher Mechanismus der RyR-vermittelte CiCR in Frage.

Unter Berücksichtigung der widersprüchlichen Befunde sollte im Rahmen des ersten Teils der vorliegenden Arbeit zuerst geklärt werden, **ob der Mechanismus des CiCR an der postsynaptischen Ca^{2+} -Antwort der MF-Synapse beteiligt ist**. Gleichzeitig sollten diese Untersuchungen dazu herangezogen werden, die bis heute enigmatische Funktion des Spine-Apparats näher zu beleuchten. Die lamellenförmige Ultrastruktur des Spine-Apparats repräsentiert, im Vergleich zu den einfachen ER-Zisternen, eine strukturell komplexere Konformation des ERs, die regulärer Bestandteil von MF-Spines ist. Daraus leitete sich die abschließende Frage für den ersten Teil der vorliegenden Studie ab: **Nimmt der Spine-Apparat in seiner Funktion als putativer Ca^{2+} -Speicher Einfluss auf die Dynamik des postsynaptischen CiCR an der hippocampalen MF-Synapse?**

Die stapelförmige oder gefaltete Anordnung von biologischen Strukturen dient in der Natur zur effizienten Oberflächenvergrößerung (Chloroplasten, Mitochondrien, Fotorezeptoren in der Netzhaut, Darmzotten, menschlicher Cortex, u.v.a.m.). Die formulierte Arbeitshypothese zur Rolle des Spine-Apparats basierte dabei analog auf der stapelförmigen Anordnung der ER-Zisternen des Spine-Apparats, die eine strukturell komplexere Organisation des ERs darstellen. In WT-Spines könnte dies möglicherweise auf eine höhere RyR- und SERCA-Ausstattung hindeuten, was einen effizienteren Mechanismus des CiCR zur Folge haben müsste (vgl. Abbildung 6 A, B mit C, D). Synaptopodin-defiziente Spines bilden hingegen keinen Spine-Apparat aus und enthalten dementsprechend einfache ER-Zisternen (vgl. Abbildung 6 A und C). Es handelt sich bei MF-Spines in KO-Tieren ausdrücklich nicht um einen Verlust des ER in Spines.

Um beide Fragestellungen klären zu können, wurde ein methodischer Ansatz gewählt, der mit Hilfe einer einfachen Stimulationsmethode eine reproduzierbare Aktivierung des postsynaptischen Ca^{2+} -Influx gewährleisten konnte (bAP-Serien, VGCC-Aktivierung). Zudem musste eine Vergleichsmessung der Ca^{2+} in den Dendriten durchgeführt werden, um sekundäre Effekte auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung in KO-Zellen auszuschließen.

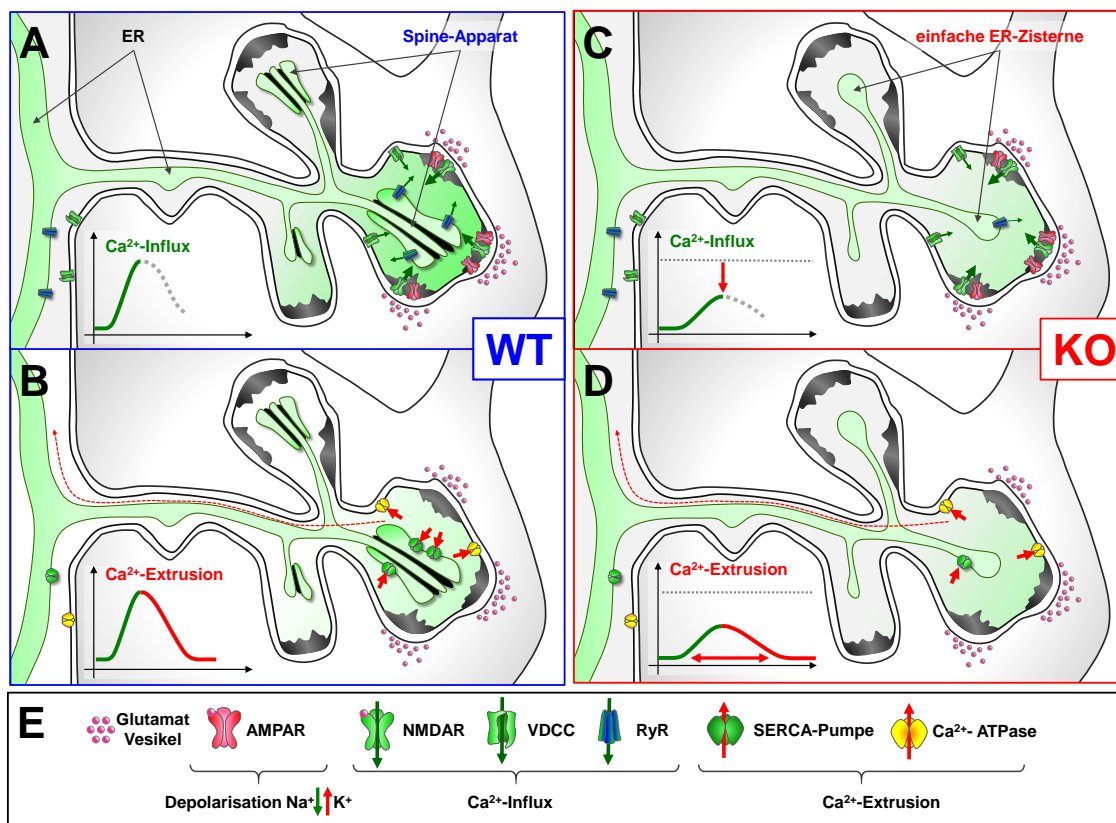


Abbildung 6: Arbeitshypothese zum möglichen Einfluss des Spine-Apparats auf die Dynamik des CiCR an der hippocampalen MF-Synapse. **A** Der Spine-Apparat ist ein regelmäßiger Bestandteil der MF-Synapse. Die Lamellenanordnung der ER-Membran stapelt die Membranoberfläche in den Spines, was möglicherweise mit einer erhöhten RyR-Ausstattung korreliert. Der primäre Ca²⁺-Influx aus dem Extrazellulärraum kann NMDAR- und/oder VDCC-vermittelt sein (E) und evoziert sekundär den RyR-vermittelten CiCR. Der CiCR verstärkt den postsynaptischen Ca²⁺-Influx und damit dynamisch die positive Rückkopplung der Ca²⁺-abhängigen RyR-Aktivierung. **B** Die Extrusion findet unter Energieverbrauch statt und wird hauptsächlich durch die Aktivität der SERCA- und Ca²⁺-ATPasen hervorgerufen (E). Der Diffusionsausgleich in den benachbarten Dendriten nimmt dabei eine untergeordnete Rolle ein. **C** Spines synaptopodin-defizienter Neurone verfügen im Vergleich zu WT-Spines über einfache ER-Zisternen und damit über eine geringere ER-Membranoberfläche. Möglicherweise hat dies auch eine geringere RyR-Ausstattung zur Folge, was wiederum die Kinetik des CiCR negativ beeinflussen würde (siehe Einsatz: geringere Influxrate, max. Amplitude). **D** Analog könnte die postsynaptische Ca²⁺-Kinetik in KO-Spines zusätzlich durch eine geringere SERCA-Ausstattung eingeschränkt sein (siehe Einsatz: niedrigere Extrusionsraten). **E** Legende der beteiligten Ionenkanäle und membrangebundenen ATP-Asen.

2.2 Teil II

Die Induktion postsynaptischer LTP-Mechanismen an der hippocampalen MF-Synapse setzt einen NMDAR-vermittelten, starken postsynaptischen Ca^{2+} -Anstieg voraus (Urban und Barrionuevo, 1996; Yeckel et al., 1999; Kwon und Castillo, 2008; Rebola et al., 2011; Maruo et al., 2016). Im Hinblick auf einen möglicherweise positiven Befund im ersten Versuchsteil drängte sich bezüglich der Plastizitätsmechanismen die Frage auf: **Hat der Spine-Apparat als Modulator des postsynaptischen CiCR in Spines einen Einfluss auf die Ausprägung von LTP an der hippocampalen MF-Synapse?** Die Beantwortung dieser Fragestellung setzte die Entwicklung eines neuen methodischen Ansatzes voraus, der gleichzeitig die Erfassung der AMPAR- und NMDAR-vermittelten postsynaptischen Antworten an individuellen MF-Synapsen gewährleisten konnte. Dazu bedurfte es außerdem zwingend einer langzeitstabilen und reproduzierbaren Stimulationsmethode der präsynaptischen MF-Boutons.

3 Material und Methoden

3.1 Präparation und Kultivierung von organotypischen Schnittkulturen

3.1.1 Versuchstierzucht und Bestimmungen

Die Durchführung aller Tierversuche erfolgte nach Genehmigung der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales, Amt für Gesundheits- und Veterinärwesen der Freien und Hansestadt Hamburg (Tötung zur Organentnahme, ORG-796 und ORG-582). Die Haltung der Synaptopodin-defizienten Zuchtlinie erfolgte am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH). Die Zuchtlinie wurde über mehr als 10 Generationen auf den C57/Bl6-Hintergrund zurückgekreuzt. Verpaarungen erfolgten ab einem Alter von mindestens 8 Wochen und bis zu einem Alter von maximal 30 Wochen. Zur Erzeugung homozygoter Zuchtpaare beider Genotypen wurden heterozygote Tiere verpaart. Die Würfe der homozygoten Zuchtpaare wurden zwischen P3 und P5 (P = postnataler Tag) zur Präparation von Schnittkulturen entnommen. Die Tötung der Tiere zur Organentnahme erfolgte durch Dekapitation mit einer scharfen Präparationsschere.

3.1.2 Das organotypische Schnittkulturmodell

Eine weit verbreitete Methode zur Herstellung und Kultivierung von neuronalen Gewebeschnitten stammt von Luc Stoppini und Dominique Müller aus dem Jahr 1991 (Stoppini et al., 1991). Dabei werden frisch präparierte Gewebeschnitte auf speziellen Membran-Inserts (Millicell® Organotypic Cell Culture Inserts, MERCK Millipore) kultiviert. Die flexible Teflon-Membran ist porös und erlaubt es somit, den Gewebeschnitt an der Grenze zwischen dem Nährmedium und der Atmosphäre (Interface) zu halten. Der Gewebeschnitt wird auf diese Weise permanent von einem hauchdünnen Flüssigkeitsfilm (Nährmedium) benetzt, was gleichzeitig die Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und den konstanten Gasaustausch mit der Inkubator-Atmosphäre (5% CO₂) sicherstellt. Mit Hilfe des neuartigen Interface-Prinzips wurde die Handhabung der Schnittkulturen in der Gewebekultur enorm vereinfacht, so dass sich die Stoppini-Methode alternativ zur „Roller-Tube-Technik“ des Schweizer Neurophysiologen Beat Gähwiler etablierte (Gähwiler, 1981). Es konnte bereits an der Methode Gähwilers gezeigt werden, dass die zelluläre Organisation (Zimmer und Gähwiler, 1984), die Cytoarchitektur sowie die Ultrastruktur synaptischer Verbindungen in neuronalen Gewebeschnitten (Frotscher und Gähwiler, 1988) über einen Inkubationszeitraum

(DIV = days in vitro) von mehreren Wochen erhalten bleiben. Man spricht deshalb auch vom „Organotypischen Schnittkulturmodell“. Allgemein ist eine Inkubationsdauer von mehr als drei Wochen zu empfehlen, um eine vollständige Regeneration des neuronalen Netzwerks vom anfänglichen Dissektionstrauma zu gewährleisten (Gähwiler, 1981). Anhand von Roller-Tube-Kulturen wurde zudem die Ausprägung morphologischer Artefakte durch die läsionsbedingten Reorganisationsprozesse beschrieben. Darunter sind lokale MF-Sprossungen (sprouting) (Frotscher und Gähwiler, 1988), aberrante MF-Projektionen in der Molekularschicht des DG (Caeser und Aertsen, 1991) sowie das Hineinwachsen von GC-Basaldendriten in die Hilusregion (Heimrich und Frotscher, 1991).

Bei der Präparation hippocampaler Schnittkulturen wird der Hippocampus in der Regel vom Cortex abgetrennt, wodurch es zu einer vollständigen Läsion der entorhino-hippocampalen Fasern kommt. Funktionell entspricht das einem kompletten Verlust der exzitatorischen Eingänge in den Hippocampus. Mit Hilfe des Schnittkulturmodells konnte gezeigt werden, dass sich die Deafferenzierung auf die anatomischen Eigenschaften der Körnerzellen des DG auswirkte. Hauptbefunde dieser Untersuchungen waren eine weniger komplexe Verzweigung sowie eine deutliche Verkürzung der Dendriten. Außerdem war unter diesen Umständen die Anzahl der dendritischen Spines der GCs signifikant reduziert (Frotscher, 2000). Diese Befunde legten nahe, dass sich eine Deafferenzierung der entorhinalen Eingänge in der hippocampalen Schnittkultur möglicherweise negativ auf die komplexe Struktur-Funktionsbeziehung der MF-Synapse auswirken kann. Um die Ausbildung einer entorhino-hippocampalen Projektion zu ermöglichen, wurde deshalb eine spezielle Präparationstechnik für sogenannte „entorhino-hippocampaler Komplexkulturen“ angewendet.

3.1.3 Dissektion des Hippocampus und Präparation der Schnittkulturen

Alle Arbeitsschritte der Präparation wurden unter einer Produktschutz-Sterilbank (Horizontal-Laminar-Flow Werkbank, Typ HF, BDK Luft- und Reinraumtechnik) und mit autoklavierten Scheren, Pinzetten, Skalpell und Spateln durchgeführt (Abflammen mit Isopropanol zwischen den Arbeitsschritten). Für die geeignete Beleuchtung und ausreichende optische Vergrößerung des Präparationsguts verwendeten wir ein Stereo-Zoommikroskop (Trinokulares Stereo Zoom Mikroskop SZ61, Olympus, mit Auf- und Schrägfeld-Durchlicht LED-Beleuchtung). In Vorbereitung einer Präparation wurden kleine Kunststoff-Petrischalen (Petrischalen, steril, 35 mm, Greiner Bio-One) mit Präparationsmedium (pH 7,32 – pH 7,36; Rezept siehe 3.1.4.1, Seite 30) befüllt und kalt gestellt (4°C). Zusätzlich wurden im Voraus

6-Well Zellkulturplatten mit Inkubationsmedium befüllt (1,2 ml/Well, pH 7,2 - 7,3; Rezept siehe 3.1.4.2, Seite 30) und zur Equilibrierung des pH-Werts mindesten 20 min vor Gebrauch im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert (Heraeus CO₂ Inkubator BBD 6220, Thermo Scientific).

Jeweils drei Petrischalen mit Präparationsmedium wurden zu Beginn der Präparation einer Maus auf tiefgefrorene Aluminiumblöcke (-20°C) gestellt. Die Maus wurde mit einer Schere dekapitiert, das Gehirn aus dem Schädel entnommen und direkt in eine Petrischale mit kaltem Präparationspuffer überführt. Bei der Dissektion der Hippocampusformation aus den Kortexhemisphären wurde jeweils der am temporalen Pol befindliche entorhinale Cortex zusammen mit dem Hippocampus isoliert. Diese Vorgehensweise ermöglichte die Herstellung von temporalen entorhino-hippocampalen Transversalschnitten von 300 µm Dicke (McIlwain Tissue Chopper, Bachofer Laboratoriumsgeräte). Die Schnittrichtung verlief orthogonal zur septo-temporalen Achse des Hippocampus. Die Schnitte beider Hippocampi konnten anschließend mit feinen Spateln in einem Tropfen Präparationsmedium vom Gewebesneider aufgenommen und zügig in jeweils eine Petrischale mit kaltem Präparationsmedium überführt werden. Die Schnitte wurden mit Hilfe einer sterilen, abgerundeten Glaspipette durch mehrfaches Ein-und-Ausströmen voneinander getrennt und anschließend einzeln auf die Membran-Inserts aufgelegt, welche schließlich in die vorbereiteten 6-Well Zellkulturplatten (Falcon) transferiert wurden. Diese wurden umgehend im Brutschrank inkubiert.

Um Nebenwirkungen zu vermeiden, wurden dem Inkubationsmedium keine Antibiotika zugesetzt. Zudem ist der Wirkungsbereich einzelner Antibiotika beschränkt, da Pilzinfektionen z.B. nicht erfasst werden. Dreimal wöchentlich wurde ein vollständiger Wechsel des Inkubationsmediums mit Hilfe einer Mikrodispensierpipette (SOCOREX, Acura® self-refill 865 Mikrodispensierpipette) vorgenommen.

Die Kultivierung der organotypischen Komplexkulturen war routinemäßig über mehr als 60 Tage möglich. Die Reorganisation des neuronalen Gewebeschnitts während der Inkubationsphase ging in der Regel mit einer deutlichen Reduktion der Schnittdicke einher. Grund dafür waren Absterbe- und Mikroglia-vermittelte Resorptionsprozesse läsionierter Zellen.

Für die Beantwortungen der Fragestellungen dieser Arbeit (siehe 2, Seite 23 ff.) war es von zentraler Bedeutung, dass neben der entorhino-hippocampalen Projektion auch die Ausdifferenzierung der Moosfaserprojektion in den Kulturen gewährleistet war. Aus diesem Grund wurden Schnittkulturen frühestens ab DIV 30 für Experimente entnommen.

3.1.4 Rezepte – organotypische Schnittkulturen

3.1.4.1 Präparationsmedium

Präparationsmedium (100 ml)

Substanz	ml
MEM -Minimum Essential Medium*	50
Aqua ad injectabilia	49
GlutaMax™-I Supplement, 200 mM	1

* MEM zweifach konzentriert angesetzt und steril filtriert;

Lagerung bei 4°C, max. 2 Wochen

3.1.4.2 Inkubationsmedium

Inkubationsmedium (100 ml)

Substanz	ml
MEM -Minimum Essential Medium*	25
Aqua ad injectabilia	21
BME - Basal Medium Eagle	25
Normal Horse Serum (heat inactivated)	25
Glucose 20 % Braun Mini-Plasco® connect	3,125
GlutaMax™-I Supplement, 200 mM	1

* MEM wurde zweifach konzentriert angesetzt und anschließend steril filtriert;

Lagerung bei 4°C, max. 2 Wochen

DISCLAIMER:

Alle LabVIEW-Implementierungen zur Mikroskop-Steuerung, zur Erfassung der elektrophysiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Signale wurden von Dr. Alexander Drakew ausgeführt. Ebenso wurde von ihm das statistische Konzept für die Datenanalyse entwickelt und dessen Implementierung von ihm ausgeführt.

3.2 Elektrophysiologie

3.2.1 Slice-Chamber

Eine notwendige Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit elektrophysiologischer Ableitungen ist eine konstante und gut abgestimmte ACSF-Perfusion (Artificial cerebrospinal fluid) der organotypischen Schnittkultur über die gesamte Dauer eines Experiments. Dessen technische Umsetzung ist jedoch nicht trivial. Wir entwickelten deshalb eine Perfusionskammer, die kompatibel mit den verwendeten Millicell®-Inserts sein sollte. Dazu wurde zuerst ein digitales 3D-Modell der Perfusionskammer (CAD-Modell, Software: SketchUp-Pro 2014, Trimble) entworfen und iterativ an die komplexen räumlichen und technischen Anforderungen angepasst (Elektrophysiologie mit gleichzeitiger Zwei-Photonen-Mikroskopie). Die Fertigung erfolgte anschließend im additiven Stereolithographie-Verfahren (FASTPART Kunststofftechnik GmbH, Wolfener Straße 37, 12681 Berlin, Deutschland). Als Material diente das biokompatible Kunststoffpolymer Watershed® XC 11122 (DSM Somos®) mit medizinischer Produktzertifizierung.

Mittels peristaltischer Pumpen (Typ: Rainin RP-1, Mettler Toledo GmbH, Gießen) wurde der ACSF-Puffer aus einem Vorratsgefäß über integrierte Anschlüsse in die Perfusionskammer gepumpt und nach dem Durchlauf recycelt. Die Perfusionsrate betrug 1 ml/min, der Puffer im Vorratsgefäß wurde kontinuierlich mit Carbogen (Mischgas: 95 % CO₂ + 5 % O₂) begast. Die Temperaturregelung des ACSF-Puffers in der Kammer erfolgte über drei getrennte Heizsysteme: Objektivheizung, Kondensorheizung und einen im Deckel der Perfusionskammer integrierten Heizkreislauf. Die Puffertemperatur wurde in unmittelbarer Umgebung des Gewebeschnitts gemessen (35°C ± 0,5°C) und aufgezeichnet (Universal Präzisionsthermometer P600 mit Pt100 Sensor, Dostmann electronic GmbH, Thermometer-Treiber-Implementierung in LabVIEW; siehe DISCLAIMER, Seite 31). Eine zusätzliche, in den Deckel der Perfusionskammer integrierte Gasleitung gewährleistete die pH-Stabilisierung sowie die optimale O₂-Sättigung des ACSF-Puffers durch über die Pufferoberfläche strömendes, angefeuchtetes Carbogen.

Die Visualisierung (Abbildung 7 A, B) erfolgte mittels Infrarot Gradientenkontrast-Mikroskopie (Dodt und Ziegglängsberger, 1994) in Kombination mit einem hochnumerischen Objektiv (Olympus, LUMFLN, 60x, 1.1 NA water immersion) und einer CCD-Kamera (SensiCam, PCO AG, Kamera-Treiber-Implementierung in LabVIEW; siehe DISCLAIMER, Seite 31).

3.2.2 Das Patch-Clamp-Verfahren

Zur elektrophysiologischen Ableitung wurden Patchpipetten (7 bis 10 M Ω) aus Borosilikatglaskapillaren (Außendurchmesser 2,0 mm, Wandstärke 0,5 mm; Hilgenberg, Malsfeld) gezogen (P-97, Sutter Instrument Co., USA). Die Intrazellulärlösung wurde mit einem Farbstoffaliquot im Verhältnis 10:1 gemischt (Details siehe 0, Seite 44). Dazu verwendeten wir täglich frische Aliquots. Nach der Filtration (Ultrafree Zentrifugenfilter, Porengröße 0,22 μ m, steril, Millipore) wurde mit der auf Eis gelagerten gebrauchsfertigen ICF-Farbstoff-Lösung die Pipetten befüllt (3 μ l, „backfilling“). Um während des Patch-Vorgangs möglichst wenig Hintergrundfärbung des Gewebes zu erreichen, wurde die Pipettenspitze von vorne mit reiner Intrazellulärlösung befüllt.

Zur kontrollierten Bewegung der Patchpipetten verwendeten wir sehr kompakte Piezo-angetriebene Mikromanipulatoren (MM3A-LS, Kleindiek Nanotechnik GmbH, Reutlingen). Das Annähern der Pipettenspitze an den Gewebeschnitt geschah mit angelegtem Überdruck an der Patchpipette (100 – 120 mbar; Pressure Unit, Science Products, Hofheim). Sobald die Pipette die Oberfläche der Schnittkultur berührt hatte, konnte man den sich im Gewebe „druckwellenartig“ ausbreitende ICF-Ausstrom deutlich erkennen. Vor dem Patch-Vorgang wurde das Offset-Potential zwischen Patch- und Badelektrode am Patch-Clamp-Verstärker (ELC-03XS, Patch-Clamp Amplifier, NPI) manuell ausgeglichen und die Patchpipette anschließend dem Soma einer MC angenähert. Der ICF-Ausstrom sollte zu einer deutlich sichtbaren Eindellung der Zellmembran (Abbildung 7 A) führen. Nach Abschaltung des Pipettenüberdrucks kam es zur Anlagerung der Zellmembran an das Pipettenglas (Abbildung 7 B) und dabei in der Regel zur spontanen Ausbildung eines Giga-Ohm-Seals (Hamill et al., 1981). Zur Messung des Seal-Widerstands wurde ein Kontrollspannungspuls von ± 5 mV bei einem Haltepotential von -64 mV angelegt (VC-Modus) und der Zeitverlauf der induzierten Ströme über 20 Wiederholungen gemittelt und analysiert (Seal-Test-Analyse; Implementierung in LabVIEW; siehe DISCLAIMER, Seite 31). Im optimalen Fall wurden nach kurzer Zeit Widerstände im Bereich von 5-10 G Ω erreicht. Seal-Widerstände unter 3 G Ω galten als Abbruchkriterium. Mittels eines kurzen Unterdrucks („kiss“) an der Patchpipette erfolgte die Ruptur der Zellmembran („break-in“) und damit das Erreichen der Whole-Cell-Patch-Clamp-Konfiguration.

Die Digitalisierung der Spannungs- (CC-Modus) und Stromsignale (VC-Modus) des Patch-Clamp Verstärkers erfolgte mittels einer PCI-Karte (Computersteckkarte NI PCI-6251). Die Abtastrate der digitalen Aufzeichnung lag bei 100 kHz (Zeitauflösung = 10 μ s).

Gleichzeitig wurden die Signale auf einem Zwei-Kanal Oszilloskop dargestellt (Two Channel Digital Storage Tektronix Inc., Beaverton OR USA Oscilloscope TDS 1012).

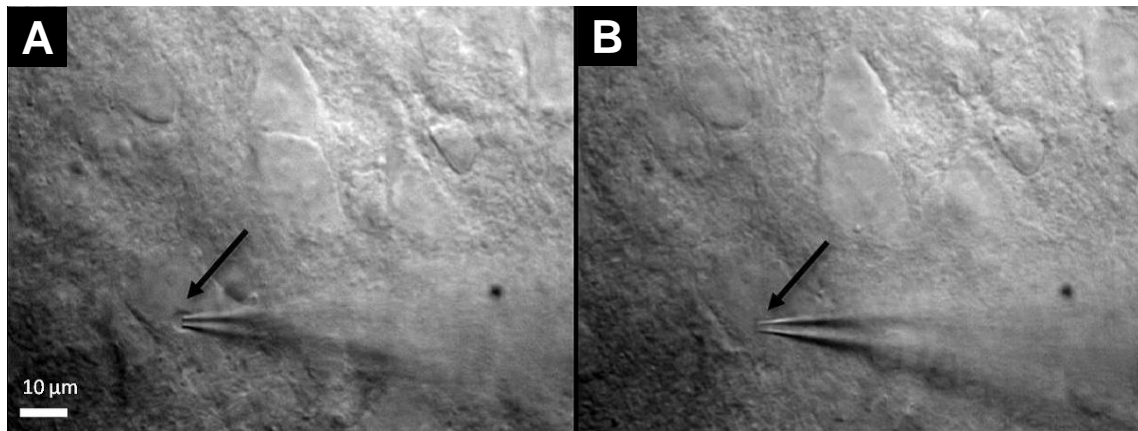


Abbildung 7: Infrarot-Gradientenkontrastmikroskopie zur visuellen Kontrolle des Patch-Vorgangs einer MC in der einer organotypischen Schnittkultur. **A** Patchpipette am Soma einer hippocampalen MC. Angelegter ICF-Ausstrom deltet die Zellmembran ein (Pfeil). **B** ICF-Ausstrom gestoppt, Ausbildung des Giga- Ω -Seals zwischen Zellmembran und Glas-Pipette.

3.2.3 Erfassung der elektrophysiologischen Startparameter

Vor Beginn eines Experiments wurden routinemäßig das Ruhemembranpotenzial, der Eingangswiderstand (Strom-Spannungs-Kennlinie), die Membranzeitkonstante, die AP-Schwelle sowie die Spontanaktivität für einen Zeitraum von 3 min aufgezeichnet.

Da der Serienwiderstand (= Pipettenwiderstand + Eingangswiderstand + Zellwiderstand) die Qualität der Ableitung empfindlich beeinflussen kann (Filtereffekt, Pipettenartefakt, Offset), wurde vor allen Messungen ein Impedanz-Kompensationsverfahren durchgeführt (Riedemann et al., 2016). Dabei wurde ausgenutzt, dass sich die Impedanzeigenschaften der Zellmembran und der Pipette (Kondensatoren) unter hochfrequenten sinusförmigen Strömen im Amplitudenverhältnis und der Verschiebung des Phasenwinkels zwischen Spannungs- und Stromkurve widerspiegeln (Softwareimplementierung in LabVIEW; siehe DISCLAIMER Seite 31). Mit Hilfe der grafischen Darstellung der Signale als Lissajous-Figuren konnte der Spannungs-Offset und die Phasenverschiebung am Patch-Clamp Verstärker durch den Abgleich der „Pipettenkapazität“ und der „Bridge Balance“ manuell kompensiert werden.

Das Ruhemembranpotenzial (RMP) von MCs lag i.d.R. zwischen -62 mV bis -68 mV (Scharfman und Schwartzkroin, 1988; Kowalski et al., 2010). Geringe Abweichungen von diesem Bereich wurden durch negative Halteströme kompensiert. Verschlechterte sich im Verlauf eines Experiments der physiologische Zustand der Zellen, sodass Halteströme (bei -65 mV) von mehr als -50 pA benötigt wurden, galt dies als Abbruchkriterium.

3.2.4 Erfassung der Zell- und Spinemorphologie

Während der Aufzeichnung der elektrophysiologischen Startparameter konnten sich die Fluoreszenzfarbstoffe zwischen Patchpipette und Cytoplasma equilibrieren. Unter Zwei-Photonen-Anregung wurde eine Übersichtsaufnahme der gepatchten Zelle durchgeführt (FluoView300 Software, Olympus, Hamburg; XYZ-Scan: $512 \times 512 \times 20$ Pixel; resultierende Voxelgröße X, Y: 0,18414 μm , Z: 1,0 μm). Anhand der Aufnahmen wurde anschließend eine geeignete/r Excrescenz/Spine ausgewählt und bei maximaler Auflösung erneut gescannt (10-facher Zoom, XYZ-Scan: $512 \times 512 \times 20$ Pixel, Voxelgröße X, Y: 0,04603 μm , Z: 0,5 μm).

3.2.5 Rezepte – Patch-Clamp-Verfahren

3.2.5.1 ACSF-Pufferlösung

ACSF I (1000 ml)*

Substanz	[mM]	[g/mol]
NaCl	130	58,44
KCl	2,6	74,56
NaH ₂ PO ₄	1,3	137,99
MgCl ₂	1,04	95,21
NaHCO ₃	26	84,01

ACSF II (40 ml)*

Substanz	(mM)	(g/mol)
CaCl ₂	52	147,02
Glucose	650	198,17

* zur besseren Handhabung der getrennten Ansätze wurde die Molarität auf 1040 ml Endvolumen berechnet;

1000 ml ACSF I + 40 ml ACSF II, pH-Wert 7,4; ca. 305 - 315 mOsmol; Lagerung bei 4°C

3.2.5.2 Kaliumgluconat-haltige Intrazellulärlösung

Intrazellulärlösung (Ansatz 100 ml)

Substanz	Lagerung	g/mol]	[mM]	[g/100 ml]	[ml]
K-Gluconat	RT	234,2	133	3,1140	
KCl	RT	74,56	12	0,0895	
HEPES	RT, 4 °C	238,3	10	0,2383	
Na ₂ -Phosphocreatine	-20 °C	255,1	7	0,1786	
Saccharose	RT	342,3	9	0,3081	
GTP	-20 °C	523,2	0,3	0,0157	
ATP	-20 °C	507,2	4	0,2029	
Aqua ad injectabilia	4°C	18			98
KOH (steril)	4°C	56,1	1000		0,7

Nach zügigem Ansetzten wurde der pH-Wert mit 1M KOH- bzw. 1M HCL-Lösung auf 7,25 bis 7,30 adjustiert. Erwartete Osmolarität: 300 – 310 mOsmol/L. Lösung wurde anschließend aliquotiert (je 1 ml) und bei -20°C gelagert.

3.2.5.3 HEPES-basierte Extrazellulärlösung

Substanzen in 100 ml ddH₂O lösen; Lagerung bei 4°C.

Substanz	Lagerung	[g/mol]	[mM]	[g/100 ml]	[ml]
NaCl	RT	58,44	145	0,84738	
KCl	RT	74,56	2,5	0,01864	
MgCl ₂	RT	1 M Stock	1,0		100 µl
CaCl ₂	RT	1 M Stock	2,0		200µl
HEPES	RT	238,3	10	0,2383	

3.3 Zwei-Photonen Calcium-Messung auf Einzelspineniveau

3.3.1 Grundlagen der Fluoreszenzanregung

Die räumliche Ausdehnung dendritischer Spines liegt im Bereich weniger Femtoliter ($1 \text{ fL} = 1 \mu\text{m}^3$). Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung solcher Strukturen in lebendem Gewebe setzt deshalb ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis voraus. Fluoreszenz beruht auf dem Wechsel zwischen verschiedenen elektronischen Zuständen der Farbstoffmoleküle, die durch Absorption bzw. Emission von Photonen induziert werden. Als Lichtquelle werden in der Scanning-Mikroskopie in der Regel Laser eingesetzt, deren Strahl über steuerbare Spiegel abgelenkt und durch hochnumerische Objektive auf einen gewünschten Punkt im Gewebe fokussiert wird.

Betrachtet man den Prozess der „Ein-Photonen-Anregung“, verhält sich die Fluoreszenzemission proportional zur eingestrahnten Anregungsintensität (= Anzahl der Photonen pro Zeit pro Fläche, lineare Fluoreszenzanregung) und ist im Fokuspunkt des Objektivs am höchsten. Die Photonendichte (Photonen pro Fläche) nimmt entsprechend der Aufweitung des Anregungslichtkegels proportional mit der Entfernung zum Fokus ab. Die Anzahl emittierter Photonen pro Querschnittsfläche des Anregungslichtkegels bleibt jedoch konstant (Helmchen und Denk, 2005). Daraus entsteht bei der Ein-Photonen-Anregung der bekannte Sanduhr-Effekt (Abbildung 8 A). Ein Problem bei der linearen Fluoreszenzerzeugung besteht darin, dass die emittierten Photonen aus allen Ebenen des Anregungslichtkegels stammen und somit nicht eindeutig der Fokusebene zugeordnet werden können. Die bildgebende Information aus dem Fokuspunkt des Objektivs tragen nur die dort emittierten Photonen, was eine räumliche Filterung zwingend erfordert. Dazu wird in die Zwischenbildebene (konfokale Ebene) des Detektionsstrahlengangs eine Lochblende (Pinhole) eingesetzt. Je enger das Pinhole eingestellt wird, desto selektiver gelangen nur Photonen aus der Fokusebene des Objektivs in den Detektor. Dabei sinkt jedoch die Photonenausbeute. Um diesen Detektionsverlust auszugleichen, muss wiederum mit höheren Laserintensitäten angeregt werden. Dabei nehmen wiederum die Bleichrate des Fluoreszenzfarbstoffs sowie die phototoxischen Effekte im Gewebe zu. Das Prinzip der linearen Fluoreszenzanregung hat demnach in der Praxis den Nachteil, dass man einen Kompromiss zwischen einem vernünftigen Signal-Rausch-Verhältnis (angemessene räumliche Filterung) und einer sinnvollen Anregungsintensität (vertretbare Schädigungsraten) finden muss.

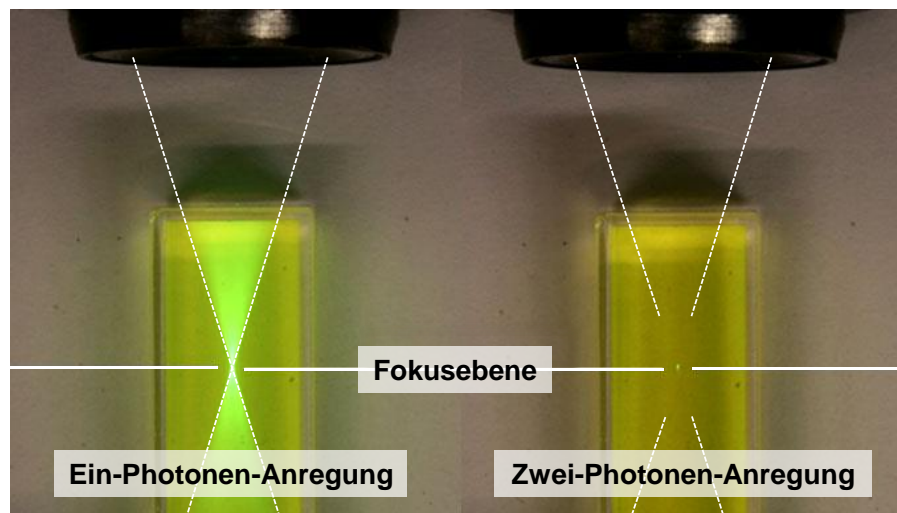


Abbildung 8: Seitenansicht einer mit Farbstoff gefüllten Küvette unter Ein-Photonen- (links) und Zwei-Photonen (rechts) Anregung. Im Anregungslichtkegel nimmt die Photonendichte proportional mit der Entfernung zum Fokus ab. Bei der Ein-Photonen-Anregung (links) verhält sich die Fluoreszenzemission proportional zur eingestrahlten Anregungsintensität (Sanduhr-Effekt). Die Bildinformation soll jedoch nur aus der Fokusebene kommen, weshalb mit Hilfe einer Lochblende räumlich gefiltert werden muss. Bei der Zwei-Photonen-Anregung (rechts) fällt die Wahrscheinlichkeit für Zwei-Photonenabsorptionsprozesse quadratisch mit zunehmendem Abstand zur Fokusebene ab. Die Anzahl der Absorptionsprozesse ist dabei nicht-linear zur Photonendichte. Emittierte Photonen stammen fast ausschließlich aus dem Fokuspunkt des Objektivs (Quelle Foto: modifiziert nach Xu, Biomedical Imaging, Cornell University, <http://xu.research.engineering.cornell.edu/research>).

In lebendem Gewebe kommt es besonders durch die verschiedenen Brechungsindizes der unterschiedlichen optischen Medien (Phasengrenze: Fett – Wasser) zu Streuungseffekten der eingestrahlten Photonen (Rayleigh-Streuung). Für jedes Photon summieren sich diese Ereignisse für die im Gewebe zurückgelegte Strecke auf. Je tiefer die Fokusebene des Objektivs im Gewebe liegt, desto größer sind die Streuverluste des Anregungslichts und der emittierten Fluoreszenz. Zudem steigt der Streuungseffekt proportional zur Energie der verwendeten Anregungswellenlänge (geringere Wellenlänge = höhere Energie \rightarrow stärkere Streuung) und fällt deshalb für das typische Spektrum der Ein-Photonen-Anregung (400 nm – 650 nm) ungünstig aus.

Unter Ausnutzung von nichtlinearen optischen Phänomenen durch die Zwei-Photonen-Anregung konnten die erläuterten limitierenden Faktoren der linearen Fluoreszenzerzeugung umgangen werden (Denk et al., 1990). Die Zwei-Photonen-Absorption ist die Anregung eines Fluorophors durch die gleichzeitige Absorption zweier Photonen (niedriger Energie), sofern diese in der Summe die gleiche Energie besitzen wie bei der Ein-Photonen-Anregung (Göppert-Mayer, 1931; Peticolas und Rieckhoff, 1963). Voraussetzung für den Prozess ist die Absorption beider Anregungsphotonen innerhalb eines Zeitraums von etwa einer Attosekunde (10^{-18} s), was sehr hohe Photonendichten und somit

sehr hohe Intensitäten erfordert. In der Zwei-Photonen-Mikroskopie werden häufig gepulste Titan:Saphir-Laser verwendet, die im sogenannten Modenkopplungsbetrieb in der Lage sind, extrem kurze Lichtpulse (im Bereich von Pico- bis Femtosekunden; 10^{-12} s bis 10^{-15} s) mit einer Repetitionsrate von 1kHz bis zu 3 GHz zu erzeugen. Bei dieser Laserklasse verteilt sich die gesamte Leistung auf die kurzen Einzelpulse, d.h. trotz moderater durchschnittlicher Leistung werden enorm hohe Pulsspitzenleistungen erreicht. Bei einem fokussierten Laserstrahl nimmt die Wahrscheinlichkeit der Zwei-Photonen-Absorptionsprozesse quadratisch mit dem Abstand zur Fokusebene ab (Harvey et al., 2008). Daraus ergibt sich der Effekt, dass eine ausreichend hohe zeitliche und räumliche Photonendichte nur im Fokuspunkt des Objektivs erreicht wird und ober- und unterhalb der Fokusebene jeweils schnell nichtlinear abfällt. Eine effektive Fluoreszenz wird deshalb im Gegensatz zur Ein-Photonen-Anregung nur in der Fokusebene generiert (Abbildung 8 B). Der Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt (σ_{2p} , Goeppert-Mayer [GM]) entspricht der Wahrscheinlichkeit eines Zwei-Photonen-Absorptionsprozesses eines Farbstoffmoleküls bei gegebener Anregungsintensität.

Definition des Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitts σ_{2p} (Goeppert-Mayer):

$$1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s} / \text{Photon} / \text{Molekül}$$

Aufgrund der fokalen Fluoreszenzerzeugung tragen bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie alle erzeugten Fluoreszenzphotonen bildgebende Information. Die erzeugten Fluoreszenzphotonen können bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie sowohl durch das Objektiv (Epi-Fluoreszenz) als auch durch den Kondensator (Trans-Fluoreszenz) gesammelt werden, was die Photonenausbeute drastisch steigert. Zudem kann auf die konfokale Abbildung des Detektionsstrahlengangs über die Scanspiegel auf das Pinhole verzichtet werden (descanned detection), was wiederum zu einer effektiveren Photonenausbeute führt.

Da die Wellenlängen für Zwei-Photonen-Anregung im dunkelroten oder infraroten (IR)-Bereich liegen, treten deutlich auch weniger Streuverluste im Gewebe auf. Hierdurch erhöht sich die optische Eindringtiefe des Anregungslasers erheblich (Denk et al., 1994). Durch die fokale Restriktion der Zwei-Photonen-Anregung sind auch das Bleichen der Farbstoffe sowie phototoxische Effekte außerhalb der Fokusebene minimiert (Zipfel et al., 2003). Die Zwei-Photonen-Mikroskopie eignet sich auf Grund der erläuterten Eigenschaften sehr gut für Aufnahmen in lebendem Gewebe und dabei insbesondere für Fluoreszenzmessungen in kleinen Volumina wie den dendritischen Spines von Neuronen.

3.3.2 Aufbau des Zwei-Photonen Mikroskops

Zur Zwei-Photonen-Anregung verwendeten wir einen Femtosekundenlaser des Typs GigaJet 20C, ein Titan:Saphir-Laser mit einer Pulswiederholrate von 1 GHz, einer spektralen Halbwertsbreite von rund 30 nm und einer Pulsweite von mehreren hundert Femtosekunden (gemessen in der Fokusebene) bei einer festeingestellten Wellenlänge von 805 nm (LASER QUANTUM GmbH, Konstanz). Der Laserstrahl wurde in eine FluoView 300 Scan-Einheit eingekoppelt, die an einem modifizierten BX50WI Mikroskopkorpus (Olympus Europe GmbH) gekoppelt wurde.

Das Mikroskop verfügt über drei Licht-Verstärker-Röhren (photomultiplier = PMT) zur Detektion des Fluoreszenzlichts R3896, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching). Dabei sollten möglichst kurze Detektionswege zwischen der Fokusebene und den PMTs zur maximalen Fluoreszenzausbeute beitragen. Ein PMT diente zur Detektion der roten Fluoreszenz (roter Kanal, Morphologiefarbstoff) durch den Kondensator (Trans-Detektion). Grüne Fluoreszenz wurde sowohl oberhalb des Objektivs als auch unter dem Kondensator detektiert (Epi- und Trans-Detektion). Die vom hochnumerischen Objektiv (Olympus, LUMFLN, 60x, 1.1 NA water immersion) gesammelten Photonen wurden direkt oberhalb des Objektivs von einem dichromatischen Spiegel (Strahlenteiler 680 DCXXR) abgelenkt. Zusätzlich dienten mehrere Farbfilter zur Blockade des Anregungslichts im Detektionsstrahlengang (1. BG39, Bandpass-Glasfilter, Dicke 2 mm, mit anti-reflektierenden Beschichtung, Schott GmbH; 2. Bandpassfilter HQ 510/80, AHF Analystechnik GmbH, wie alle folgenden optischen Filter). Das gefilterte Fluoreszenzlicht wurde schließlich mit Hilfe einer bikonvexen-asphärischen Linse (Brennweite: 29,5 mm, Melles Griot) auf die Photokathodenschicht des oberen PMTs fokussiert. Photonen, die aus der Fokusebene des Lasers nach unten ausstrahlen, wurden durch einen hochnumerischen Ölimmersionskondensator (Olympus BX Series U-UCDB, Universalkondensator, N.A. 1,4) gesammelt. Das Anregungslicht wurde hier ebenfalls mit Hilfe eines Kurzpassfilters (Multiphoton-Emitter, HC-2P Emitter 680/SP) blockiert.

An dieser Stelle wurden die Fluoreszenzphotonen mittels eines dichromatischen Spiegels (Strahlenteiler 560 DCXR) in zwei Farbenkanäle aufgeteilt. Dazu wurden zusätzliche Bandpassfilter für den roten (HQ 610/75), bzw. grünen Kanal (HQ 510/80) vor den jeweiligen PMTs eingebaut. Die PMT-Signale wurden für die quantitative Auswertung der Punkt-Scan-Methode durch ein Datenerfassungsmodul (NI PCI-6132, National Instruments) mit einer Abtastrate von 2,5 MHz digitalisiert.

3.3.3 Verwendung von Ca^{2+} -Indikatoren

Für die Messung von Ca^{2+} -Signalen auf Einzelspinneniveau musste die Auswahl des Ca^{2+} -Indikators einerseits auf die verwendete Detektionstechnik und andererseits auf die erwarteten physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen abgestimmt werden. Neben der physikalischen Spezifikation der Farbstoffe musste zusätzlich auf deren chemische Eigenschaften geachtet werden (Biokompatibilität, Löslichkeitsverhalten, geeigneter pH-Bereich).

Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoffe haben die photophysikalische Eigenschaft, dass die Fluoreszenzausbeute drastisch ansteigt, sobald sich Ca^{2+} an das Fluorophor anlagert. Unter konstanter Anregungsintensität verändert die Anlagerung von Ca^{2+} dessen Quanteneffizienz (Φ), d.h. Verhältnis zwischen der Anzahl absorbierter zu emittierter Photonen pro Molekül ($\Phi \leq 1$). Der Effekt liegt je nach Molekülstruktur des Farbstoffs im Bereich mehrerer Zehnerpotenzen.

Eine weitere wichtige Eigenschaft eines Indikators ist dessen spezifische Ca^{2+} -Affinität. Die Dissoziationskonstante (K_d) beschreibt das Reaktionsgleichgewicht zwischen Assoziations- und Dissoziationsreaktion. Je höher die Affinität des Indikators (A) zum Ca^{2+} (B) ist, desto niedriger ist die Dissoziationskonstante des Indikator- Ca^{2+} -Komplexes (AB). Erreicht die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration die K_d des Indikators, bedeutet dies, dass ist die Hälfte aller Farbstoffmoleküle mit Ca^{2+} gesättigt sind.



Dissoziationskonstante [μM]:

$$K_d = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]}$$

Ein Vorteil von hochaffinen Indikatoren besteht darin, geringe Änderungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration mit gutem Signal-Rausch Verhältnis anzuzeigen. Problematisch ist jedoch, dass sie deshalb zwangsweise einen schmalen dynamischen Bereich aufweisen und schnell Sättigungseffekte auftreten können (Signal-Plateau). Die Kinetik solcher trunkierter Ca^{2+} -Signale ist stark fehlerbehaftet. Zudem puffern hochaffine Indikatoren unspezifisch auch alle anderen intrazellulären Ca^{2+} -Signale; ein Zustand der für die Untersuchung lebender

Neurone über längere Zeiträume hinweg als „unphysiologisch“ anzusehen ist. Indikatoren mit höherer K_d eignen sich deshalb besser, um die physiologische Ca^{2+} -Kinetik von Neuronen vollständig abbilden zu können. Sie weisen einen breiteren dynamischen Bereich auf und beeinträchtigen dabei weniger die intrazelluläre Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktion. Unter vergleichbaren Voraussetzungen (Quanteneffizienz, Anregungsintensität und Farbstoffkonzentration) führt die niedrigere Ca^{2+} -Affinität des Indikators zu einer geringeren Fluoreszenzausbeute und deshalb zwangsläufig zu einem schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Dieser Nachteil sollte möglichst durch eine verbesserte Fluoreszenzdetektion ausgeglichen werden.

3.3.4 Die duale Indikator-Methode

Die Messung intrazellulärer Ca^{2+} -Signale mittels Ca^{2+} -Indikatoren unterliegt einer Reihe chemischer und physikalischer Einflussfaktoren sowie natürlichen biologischen Schwankungen. Beispielsweise verändern bereits kleine Temperatursprünge die Dissoziationskonstanten der Indikatormoleküle signifikant (Woodruff et al., 2002). Zusätzlich weist die Quanteneffizienz der Fluorophore in wässrigem Milieu ein pH-Optimum auf. Damit geht einher, dass stabile Messbedingungen zwingende Voraussetzung für die experimentelle Reproduzierbarkeit sind. Das basale Ca^{2+} -Niveau, besonders in kleinen zellulären Kompartimenten, unterliegt jedoch selbst im Ruhezustand eines Neurons einer Reihe intrazellulärer Prozesse, welche es kontinuierlich verändern. Zur Bestimmung eines evozierten Ca^{2+} -Anstiegs benötigt man zur Vergleichbarkeit der Messungen jedoch ein möglichst konstantes Referenzsignal. Auf Grund der natürlichen Schwankungen des basalen Ca^{2+} -Niveaus haben Ryohei Yasuda und Kollegen im Jahr 2004 ein Verfahren vorgestellt, das auf der gleichzeitigen Messung eines Ca^{2+} -sensitiven Indikators im Verhältnis zu einem Ca^{2+} -insensitiven Referenzfarbstoff beruht (Yasuda et al., 2004). Sie konnten damit zeigen, dass sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Ca^{2+} -Messung signifikant verbessert. Zur Quantifizierung müssen beide Fluoreszenzfarbstoffe in einem stabilen Konzentrationsverhältnis im Cytoplasma gelöst sein.

Die Rohdatenaufnahme in Abbildung 9 zeigt wie das basale Ca^{2+} -Signal ($\text{grün}_{\text{BASAL}}$) während der gezielten Stimulation einer gepatchten MC transient ansteigt (ΔG). Zur Quantifizierung der CaTs wird die absolute Fluoreszenzänderung des grünen Signals mit dem roten Signal des Referenzfarbstoffs (R) ins Verhältnis gesetzt ($\Delta G/R$).

Synthetische Ca^{2+} -Indikatoren basieren auf komplexen aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen, deren physikalische und chemische Eigenschaften durch unterschiedliche Substituenten (Fluor, Methyl, Chlor, etc.) gezielt verändert und auf den jeweiligen Anwendungsbereich angepasst werden können. Beispielsweise basiert die Serie der Fluo[®]- Ca^{2+} -Indikatoren (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) teilweise auf der Klasse der Rhodamine (Summenformel: $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_3$). Die Farbstoffe weisen bei der Anlagerung von Ca^{2+} -Ionen eine sehr hohe Änderung ihrer Quanteneffizienz auf. Ihr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis macht sie damit zu beliebten Indikatoren für die schnellen intrazellulären Ca^{2+} -Antworten in Neuronen.

Neben den stetigen Weiterentwicklungen synthetischer Ca^{2+} -Indikatoren lieferte die Entwicklung genetisch kodierter Ca^{2+} -Sensoren einen fundamental neuen Ansatz zur

zellulären Ca^{2+} -Messung (Miyawaki et al., 1997). Eine hinreichend schnelle und Ca^{2+} -affinere Variante wurde erstmals von Junichi Nakai 2001 unter dem Namen „GCaMP“ vorgestellt (Nakai et al., 2001). Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus verstärkt-grün fluoreszierendem Protein (enhanced green fluorescent protein = EGFP), Calmodulin und der Ca^{2+} /Calmodulin-bindenden Myosin-leichte-Ketten-Kinase (M13). Die Funktionsweise beruht auf einer Ca^{2+} -abhängigen Interaktion des Calmodulin-M13-Komplexes, der eine Konformationsänderung innerhalb des EGFPs induziert, wodurch dessen Quanteneffizienz erhöht wird. Vor allem die Sensibilität und Aktivierungskinetik der genetisch kodierten Ca^{2+} -Sensoren wurden im Laufe der letzten Jahre konsequent weiterentwickelt (Chen et al., 2013). Somit unterscheiden sich die Anwendungsbereiche von synthetischen und genetisch kodierten Ca^{2+} -Indikatoren nicht mehr voneinander. Jedoch müssen synthetische Farbstoffe zur Visualisierung der zellulären Ca^{2+} -Antworten mit Hilfe invasiver Methoden in die Zellen eingebracht werden (z.B. mittels Patch-Pipette). Genetisch kodierte Indikatoren können hingegen relativ leicht mit Hilfe von Viren- oder Plasmid-Transfektionsmethoden in einer größeren Anzahl Neurone exprimiert werden. Die Messung der zellulären Ca^{2+} -Antworten verläuft anschließend rein Licht-gesteuert, also nicht-invasiv. Deshalb eignet sich der Einsatz genetisch kodierten Ca^{2+} -Indikatoren besonders gut für repetitive Langzeitmessungen spezifischer Neurone bzw. Spines *in vitro* und *in vivo*. Die Expression des Fusionsproteins variiert dabei jedoch zwischen den einzelnen transfizierten Neuronen. Wir haben uns für die geplanten Experimente gegen den Einsatz genetisch kodierter Ca^{2+} -Indikatoren entschieden, da dies einen zusätzlichen Transfektionsschritt im Voraus erfordert hätte. Da in unserem Fall keine mehrtägigen Messreihen an den gleichen Neuronen vorgesehen waren, konnte auf diese zusätzliche Belastung der Zellen verzichtet werden. Zudem war unklar inwieweit die permanente Expression von Ca^{2+} -Indikator, auf Grund der Pufferwirkung, die zellulären Prozesse der Ca^{2+} -Homöostase über längere Zeiträume hinweg beeinflusst. Die Patch-Clamp-vermittelte Applikation der Farbstoffe diente somit als *ad hoc* Messung der CaTs mit Hilfe der dualen Indikator Methode.

Im Hinblick auf die geplanten Experimente wurden deshalb eine Reihe synthetischer Ca^{2+} -Indikatoren und Referenzfarbstoffe in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen getestet (Daten nicht gezeigt!). Bei allen Experimenten dieser Arbeit wurde der Ca^{2+} -Indikator Fluo-4FF (Fluo-4FF Pentapotassium Salt, cell impermeant, Molecular Probes, Emissionsmaximum ≈ 516 nm; $800 \mu\text{M}$) in Kombination mit Alexa 594 (Alexa Fluor® 594 Dextran, 10 kDa; Anionic, Molecular Probes, Emissionsmaximum ≈ 617 nm, $40 \mu\text{M}$) als Referenzfarbstoff und gleichzeitig als Indikator der Zellmorphologie verwendet. Die gewählte

Anregungswellenlänge von 805 nm entsprach dem Zwei-Photonen-Absorptionsmaximum von Fluo-4FF, dessen nominelle K_d im Puffer bei 9,7 μM liegt. Bei jeder Einzelmessung wurde eine zusätzliche Offset-Korrektur aller Farbkanäle durchgeführt, indem das zuvor ermittelte Hintergrundsignal (zellulären Eigenfluoreszenz) subtrahiert wurde. Die Signalerfassung der Ca^{2+} -Antworten erfolgte kontinuierlich an einem Fokuspunkt. Das fokale Volumen des fokussierten Laserstrahls entspricht etwa dem Volumen eines Spines.

Duale Indikator-Methode zur Ca^{2+} -Quantifizierung: $\Delta[\text{Ca}^{2+}] = \frac{\Delta G}{R} = \frac{\text{grün} - \text{grün}_{\text{BASAL}}}{\text{rot}}$

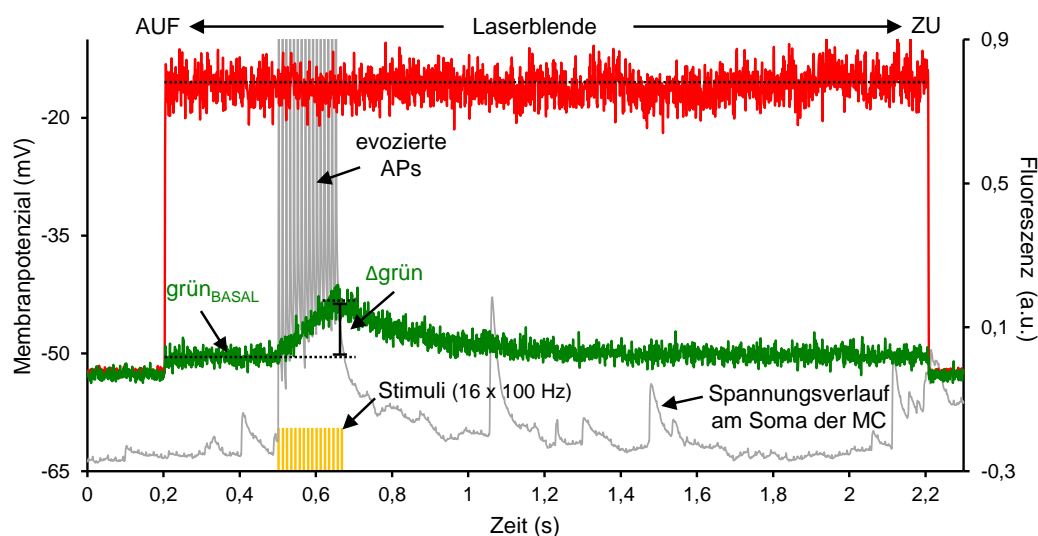


Abbildung 9: Rohdatenaufzeichnung der absoluten Fluoreszenzänderung im Spine einer MC zur Quantifizierung des Ca^{2+} -Signals mittels der dualen Indikator Methode nach Yasuda et al., 2004. Grün: summiertes Fluoreszenzsignal des Ca^{2+} -Indikators Fluo-4FF. Rot: Fluoreszenzsignal des Ca^{2+} -insensitiven Referenzfarbstoffs Alexa 594. Bestimmung des basalen Ca^{2+} -Niveaus ($\text{grün}_{\text{BASAL}}$, Mittelwert) nach dem Öffnen der Laserblende (0,2 - 0,5 s). Anschließende Stimulation der gepatchten MC (gelbe Striche: 16 Strompulse, 100 Hz) evoziert APs (graue Kurve: Verlauf der Membranspannung) sowie einen deutlichen CaT im Spine (ΔG). Die Anstiegsphase des Ca^{2+} -Signals beginnt exakt mit dem ersten und endet mit dem letzten Stimulus. Parallel zeigt die Fluoreszenz des Referenz-Farbstoffs keine Änderung (rot, gestrichelte schwarze Linien: Mittelwerte).

3.4 Untersuchung des CiCR an der hippocampalen Moosfasersynapse

3.4.1 Methodisches Konzept

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob und in welchem Maß der RyR-vermittelte CiCR als Mechanismus zur postsynaptischen Ca^{2+} -freisetzung an der hippocampalen Moosfasersynapse eine Rolle spielt. Dazu wurden unter Anwendung des Whole-Cell-Patch-Clamp-Verfahrens und mit Hilfe der Zwei-Photonen Ca^{2+} -Messung die CaTs in Spines und Dendriten von MCs untersucht. Zur physiologischen Aktivierung des CiCR wurden Serien zurückpropagierender APs evoziert, die sehr verlässlich zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (VGCCs) führten. Die Patchpipette diente gleichzeitig zur Applikation der benötigten Farbstoffe.

Die Ca^{2+} -Antworten wurden in denselben Spines, bzw. Dendriten jeweils vor und nach der Ryanodin-vermittelten Blockade des CiCR untersucht wurden. Dieses Vorgehen ermöglichte ein statistisch effizientes paariges Testen des Ryanodin-Effektes. Die Analyse der Ca^{2+} -Antworten in Spines und Dendriten Synaptopodin-defizienter MCs sollte darüber hinaus Aufschluss über die mögliche Rolle des Spine Apparats als Modulator der postsynaptischen Ca^{2+} -Dynamik geben.

3.4.2 Versuchsablauf

In der Hilusregion einer entorhino-hippocampalen Schnittkultur (> 28 DIV) wurde das Soma einer vermeintlichen MC gepatcht und einer routinemäßigen Erfassung der aktiven und passiven Membraneigenschaften unterzogen (Details siehe 3.2.2, Seite 33 ff.). Da die Somata von MCs und Interneuronen in ihrer Größe und Lage im Hilus weitestgehend ähneln, musste mittels der AP-Form eine erste Identifizierung des Zelltyps erfolgen. Eine spezifische Eigenschaft hilärer Interneurone sind ausgeprägte AP-Nach-Hyperpolarisationen und galten als Abbruchkriterium. Mit Hilfe der routinemäßigen Dokumentation der Zell- und Spinemorphologie unter Zwei-Photonen Anregung (Details siehe 3.2.4, Seite 35 ff.) konnte eine endgültige Bestätigung des Zelltyps erbracht werden. Zellen ohne deutlich ausgeprägte Excrescenzen wurden nicht untersucht. Schließlich wurden an einer identifizierten MC eine geeignete Excrescenz und der daran angrenzende Dendrit zur Untersuchung ausgewählt.

Vor jeder Messreihe wurde der Fokuspunkt des Zwei-Photonen Lasers in den Mittelpunkt des Spinekopfs bzw. in die Mitte des angrenzenden Dendriten gesetzt (Abbildung 10 A, B). Eine Einzelmessung (Sweep) dauerte 2,3 s und beinhaltete jeweils eine Serie von 16 überschwelligem

Strompulsen (CC-Modus, Frequenz: 100 Hz; Stromstärke: 1,5 nA; Pulslänge: 1,5 ms). Der evozierte CaT sowie die korrespondierende Spannungskurve wurden parallel aufgezeichnet (Abbildung 9). Die Spannungskurven dienten zur späteren Kontrolle der Anzahl der evozierten APs am Soma der MC. Weniger oder mehr als 16 APs galten als Ausschlusskriterium einer Einzelmessung. Jede Messreihe setzte sich aus vier Sweeps zusammen, die in einem festen Intervall von 10 Sekunden wiederholt wurden, wodurch das Abklingen des evozierten CaTs auf Basalniveau sichergestellt war. Der erste Versuchsteil setzte sich aus je zwei alternierenden Messreihen pro Spine bzw. Dendriten zusammen, sodass die Datensätze jeder Lokalisation insgesamt acht Wiederholungen umfassten.

Im zweiten Teil des Experiments wurde unter dem pharmakologischen Einfluss von Ryanodin [40 μ M] die gleichen Messreihen an denselben Spines und denselben Dendritenabschnitten wiederholt (Abbildung 10 D). Die Messungen starteten 20 min nachdem die ACSF-Ryanodin-Lösung in die Perfusionskammer eingeleitet wurde. Das in Pulverform erhältliche Ryanodin ist hydrophob und wurde zur Applikation in wässriger Umgebung zuerst in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst (Stocklösung Rya^{DMSO}: 10 mM) und anschließend in ACSF auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt. Die resultierende DMSO-Konzentration im ACSF lag bei \sim 57 mM. Die ACSF^{Rya}-Lösung wurde über mehrere Experimente und Tage hinweg wiederverwendet (nach Gebrauch Sterilfiltration mit Rotilabo®-Spritzenfilter mit Nylonmembran (Carl Roth), Lagerung bei 4°C, max. 3 Tage; tägliche Osmolaritätskontrolle). Um tagesbedingte Messschwankungen auszugleichen, wurden Schnittkulturen von WT- bzw. Synaptopodin-KO Tieren abwechselnd verwendet.

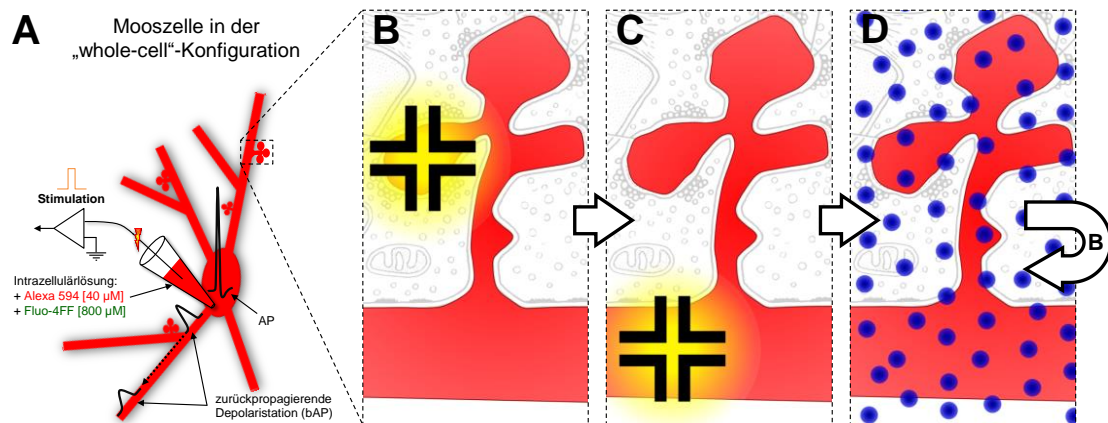


Abbildung 10: Ablauf eines Experiments zur Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung an der hippocampalen Moosfasersynapse. **A** Mit Hilfe der Patchpipette am Soma einer MC (whole-cell-Konfiguration) werden durch überschwellige Strompulse zuverlässig APs ausgelöst. Die zurückpropagierende Depolarisation aktiviert VGCCs in der Zellmembran und damit den CiCR aus internen ER-Speichern. Die mit Hilfe der Patch-Pipette applizierten Farbstoffe dienen zur morphologischen Identifikation (Alexa 594) sowie zur Zwei-Photonen Ca^{2+} -Messung (Fluo-4FF) nach der dualen Indikator Methode. **B, C** Messreihe mit abwechselnder Lokalisation im Spinekopf (B), bzw. im angrenzenden Dendriten (C). Die evozierten CaTs werden mittels des Zwei-Photonen-Punkt-Scan-Verfahren hochaufgelöst aufgezeichnet (Digitale Abtastrate 2,5 MHz). **D** Einwaschen von Ryanodin [40 µM] zur Blockade des CiCR. Wiederholung der Messreihe an denselben Spines und Dendriten nach 20 min Inkubation (paariges Testen).

3.4.3 Modellierung und Datenanalyse

3.4.3.1 Zelluläres Modell der evozierten CaTs

Während der Stimulation setzt sich der Ca^{2+} -Influx k_{in} in das Cytoplasma (Kompartiment C) maßgeblich aus den spezifischen Leitfähigkeiten, bzw. Influxraten durch die beteiligten Ca^{2+} -Kanäle zusammen (Details siehe 1.5, Seite 17 ff.). Der Extrazellulärraum (Quelle A) und die internen Speicher des ERs (Quelle B) repräsentieren die beiden ausschlaggebenden Ca^{2+} -Quellen für Influx k_{in} in das Kompartiment C (Abbildung 11). Durch die bAP-Serien sollten die VGCCs möglichst reproduzierbar aktiviert werden, um einen primären Ca^{2+} -Influx k_{in}^A aus dem Extrazellulärraum in das Kompartiment C zu erreichen. Der resultierende Anstieg des cytosolischen Ca^{2+} sollte gegebenenfalls die RyR-Kanäle öffnen und so zum sekundären Ca^{2+} -Influx aus den intrazellulären Speichern (k_{in}^B) führen.

Die aktive Extrusion (k_{ex}) ist in ihrer Kinetik unter anderem von der aktuellen cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration abhängig. Die Extrusion erfolgt vor allem durch die Aktivität von Ca^{2+} -pumpenden-ATPasen (k_{ex}^A) sowie von SERCA-Pumpen (k_{ex}^B). Weitere Einflüsse auf die Kinetik der postsynaptischen CaTs haben bspw. die freie Diffusion im Cytoplasma sowie Ca^{2+} -puffernde Proteine im Cytoplasma (Calmodulin, Calbindin, etc.).

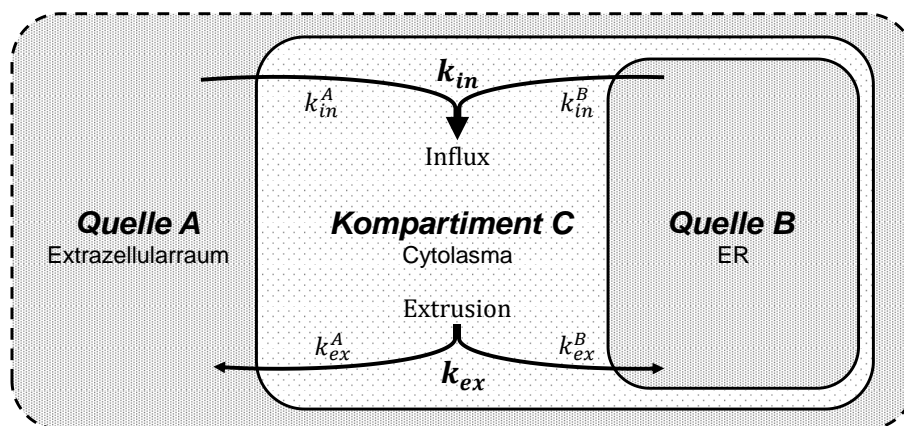


Abbildung 11: Schema der zugrundeliegenden Ca^{2+} -Ströme zwischen den extra- und intrazellulären Kompartimenten. Multiple Influx- und Extrusionsprozesse (k_{in} , k_{ex}), gespeist aus extra- und intrazellulären Ca^{2+} -Quellen (Quelle A und B), tragen zur Änderung der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration (Kompartiment C) bei. k_{in}^A : Influx durch die VGCCs während der Stimulation; k_{ex}^A : Extrusion durch plasmamembranständige Ca^{2+} -pumpende-ATPasen. k_{in}^B : Influx aus dem ER durch den RyR-vermittelten Mechanismus des CiCR; k_{ex}^B : SERCA-Pumpen füllen die intrazellulären Speicher des ERs wieder auf.

3.4.3.2 Mathematische Modellierung der evozierten CaTs

Mit der Methode der optischen Ca^{2+} -messung im Cytosol kann prinzipiell nur eine Summenfunktion der parallel ablaufenden Intrusions- und Extrusionsprozesse abgebildet werden. Die Bateman-Funktion beschreibt als pharmakokinetisches Reaktionsmodell das Verhalten zweier simultaner Prozesse 1. Ordnung (Influx und Extrusion) in einem Kompartiment (Bateman, 1910). Die Influxrate k_{in} ist dabei abhängig von der Konzentration $[g_0]$ einer virtuellen Quelle G. Die Extrusionsrate k_{ex} ist abhängig von der aktuellen Konzentration $[c]$ in Kompartiment C (Abbildung 12).

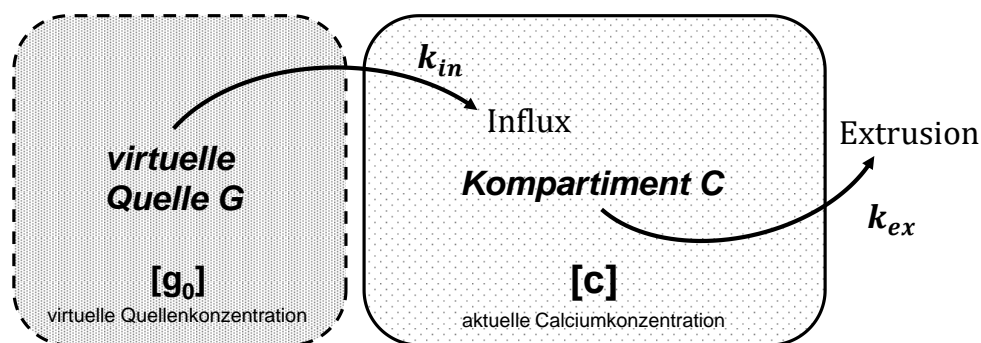


Abbildung 12: Die Änderung der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration kann durch das Reaktionsmodell zweier simultaner Prozesse 1. Ordnung wiedergegeben werden. Die aktuelle Ca^{2+} -Konzentration in Kompartiment C ist dabei abhängig von der Influxrate k_{in} , der Extrusionsrate k_{ex} und der virtuellen Quellenkonzentration g_0 .

Änderung der Ca^{2+} -Konzentration in der virtuellen Quelle G:

$$\frac{dg}{dt} = -k_{in} g;$$

$$g(t) = g_0 \cdot e^{-k_{in} \cdot t}$$

Änderung der Ca^{2+} -Konzentration im Kompartiment C durch den Influx aus G mit der

Intrusionsrate k_{in} :

$$c(t) = -g_0 \cdot e^{-k_{in} \cdot t}$$

Änderung der Ca^{2+} -Konzentration durch Extrusion aus Kompartiment C mit der

Extrusionsrate k_{ex} :

$$c(t) = c_0 \cdot e^{-k_{ex} \cdot t}$$

Auf Grund des enormen Ca^{2+} -Konzentrationsunterschieds zwischen Cytoplasma und Extrazellulärraum bzw. ER gilt die Annahme, dass während der Stimulation die Konzentration im virtuellen Kompartiment G konstant bleibt. Demnach ist die Influxrate k_{in} für den kurzen Zeitraum des Ca^{2+} -Anstiegs ($t < t_{in}$) als konstant anzusehen.

Influx 0. Ordnung in Kompartiment C mit der Influxionsrate k_{in} :

$$c(t) = -g_{const.} \cdot k_{in} \cdot t$$

Damit kann die Kinetik der Anstiegsphase des CaT's als eine Funktion mit simultanem Influx 0. Ordnung und Extrusion 1. Ordnung modelliert werden.

Anstieg:
$$c(t) = \frac{k_{in}}{k_{ex}} \cdot \left(1 - e^{-k_{ex} \cdot t}\right) \mid t < t_{in}$$

Mit dem Ende der Stimulation setzt auch der Influx aus. Deshalb gilt für die abfallenden Phase des CaT ($t > t_{in}$), dass k_{ex} nur noch von der Konzentration in Kompartiment C abhängig ist. Daraus folgt ein exponentieller Abfall (Extrusion 1. Ordnung) bis auf das Ausgangsniveau.

Abfall:
$$c(t) = c(t_{in}) \cdot e^{-k_{ex} \cdot (t - t_{in})} \mid t > t_{in}$$

3.4.4 Quantifizierung und Statistik

Die aufgezeichneten Fluoreszenzkurven wurden mit einem genetischen Anpassungsalgorithmus auf das oben angegebene Modell gefittet. Für die folgenden Parameter wurde eine statistische Analyse durchgeführt: die maximal erreichte Amplitude der Transienten (c_{max}), die Influxrate k_{in} zum Zeitpunkt ($t = 0$) sowie die Zeitkonstante der Extrusion ($\tau_{ex} = 1/k_{ex}$). Anschließend wurden die ermittelten Einzelwerte aus insgesamt acht Wiederholungen zu einem Mittelwert \pm Standardfehler (S.E.M.) zusammengefasst. Für statistische Aussagen waren die Parameter k_{in} und τ_{ex} im Vergleich zu c_{max} mit einer höheren Unsicherheit behaftet, da sie zusätzlich eine Schätzung des Verlaufs beinhalten. Die Null-Hypothese (H_0), dass sich die Werte der einzelnen Parameter vor und nach Zugabe von Ryanodin nicht unterscheiden, wurde mit Hilfe des nicht-parametrischen Wilcoxon-Rangsummen-Tests überprüft (eine Stichprobe, H_0 : Quotient nachher/vorher = 1). Da dieser Test eine symmetrische Verteilung der Stichprobe voraussetzt, wurden die logarithmierten Quotienten der Wertepaare verwendet (Wilcoxon, 1945). Die Beobachtungseinheit stellten jeweils die einzelnen Spines bzw. Dendriten dar. Die erforderliche Unabhängigkeit der Beobachtung war dadurch gewährleistet, dass immer nur ein Spine und ein Dendrit pro MC und nur eine MC pro Schnittkultur untersucht wurde.

Mit Hilfe des generalisierten Wilcoxon-Rangsummentests für zwei unabhängige Stichproben wurde getestet, ob die Werte eines Genotyps größer oder kleiner als die Werte des anderen Genotyps waren (Neuhäuser und Ruxton, 2009).

Da die analysierten Parameter jeweils aus einem Satz von Fluoreszenzkurven extrahiert wurden, sollte mit Hilfe des Benjamini-Hochberg Verfahrens die Rate der falsch positiven Testergebnisse (false discovery rate), welche durch das multiple Testen eines Datensatzes auftritt, korrigiert werden (Benjamini und Hochberg, 1995).

3.5 Methoden zur Untersuchung individueller Moosfasersynapsen

In diesen Experimenten sollte untersucht werden, welchen Einfluss der postsynaptische CiCR bzw. der Spine-Apparat auf die Ausprägung von Langzeitplastizitätsmechanismen an der MF-MC-Synapse hat. Dazu war es nötig, einzelne identifizierte MF-MC-Synapsen untersuchen zu können. Eine Kombination aus neuen und bereits etablierten Methoden sollte deshalb in diesen Experimenten zur Anwendung kommen:

- Gezielte Identifikation des präsynaptischen MF-Boutons an einer bereits gepatchten und fluoreszenzmarkierten MC (siehe 3.5.1, Seite 54 ff.).
- Langzeitstabile „bouton-attached“-Konfiguration zur elektrophysiologischen Stimulation individueller MF-Boutons (siehe 3.5.2, 3.5.3, Seite 57 ff.).
- Parallel zur präsynaptischen Stimulation, hochauflösende Zwei-Photonen Ca^{2+} -Messung in einzelnen Spines einer im Whole-Cell-Patch-Clamp-Verfahren abgeleiteten MC (siehe 3.5.4, Seite 60 ff.).

3.5.1 Identifizierung von unmarkierten MF-Boutons in hippocampalen Schnittkultur.

Um die unmarkierten präsynaptischen MF Boutons zu den fluoreszenz-markierten Spines der MCs identifizieren zu können, etablierten wir das „Shadowpatching“-Verfahren (Kitamura et al., 2008) in der Schnittkultur. Diese ursprünglich zur gezielten *in vivo* Patch-Clamp-Ableitung konzipierte Technik basiert auf der Fluoreszenzmarkierung des Extrazellulärraums, ohne dass der Farbstoff dabei von zellulären Strukturen aufgenommen wird. Dadurch erscheinen vor allem die Somata umliegender Neurone als dunkle „Schatten“ vor einem fluoreszierenden Hintergrund und können somit unter visueller Kontrolle mit der Patch-Pipette angesteuert werden. In einer Serie von Vorversuchen musste das „Shadowpatching“-Verfahren zuerst an die Verhältnisse in hippocampalen Schnittkulturen angepasst werden (Abbildung 13 A). Zusätzlich sollte erprobt werden, ob sich das Verfahren auch zur Identifizierung von kleinen subzellulären Strukturen (z.B. MF-Boutons) eignet.

Dazu verwendeten wir 10-15 M Ω Theta-Pipetten (Borosilikat-Theta-Glaskapillaren, Außendurchmesser 2,0 mm, Wandstärke 0,3 mm; Hilgenberg, Malsfeld). Sie wurden vor dem Einsatz mit einer HEPES-gepufferten Extrazellulärlösung (siehe Rezept 3.2.5.3, Seite 37) und dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 488 Hydrazid (50 μM , Molecular Probes) befüllt. Die Ionenzusammensetzung der Extrazellulärlösung entsprach der des ACSF, wodurch sichergestellt war, dass im Bereich des Ausstromkegels der Stimulationspipette

physiologische Bedingungen herrschten (Alcami et al., 2012). Unter kontinuierlichem Ausstrom der Farbstofflösung (Überdruck > 100 mbar) wurde die Pipettenspitze in die oberste Zellschicht einer hippocampale Schnittkultur platziert und anschließend in die Nähe einer vorab gepatchten und intrazellulär gefärbten MC gesteuert. Zur Übersicht wurde ein Zwei-Photonen-Bildstapel aufgenommen (Abbildung 13 B, Bild 1-4, XY-Scan: 1024 x 1024 Pixel, Auflösung: XY = 0,0092 μm , $\Delta Z = 1,0 \mu\text{m}$), welcher den fluoreszenzmarkierten Extrazellulärraum und eine Vielzahl ungefärbter zellulärer Strukturen als kleine und große „Schatten“ aufwies. Bereits bei dieser geringen Vergrößerungsstufe konnten die MF-Boutons als dunkle Umrandungen um die rot gefärbten MC-Excrencenzen lokalisiert werden.

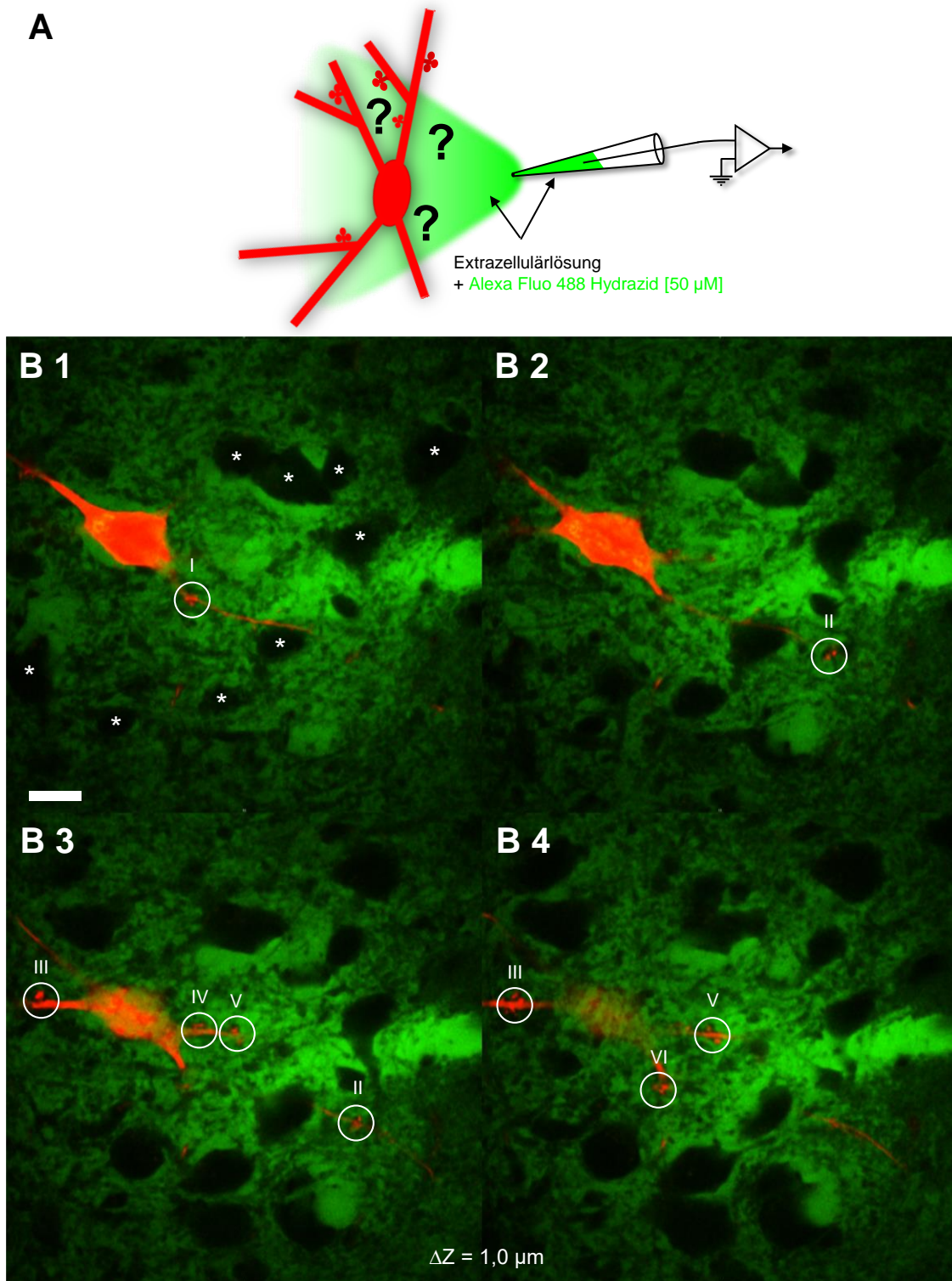


Abbildung 13: Erprobung des "Shadowwatching"-Verfahrens in hippocampalen Schnittkulturen. **A** Die Methode beruht auf der die Applikation eines Fluoreszenzfarbstoffs (Alexa 488 Hydrazid, grün) in den Extrazellulärraum, welcher von zellulären Strukturen nicht aufgenommen werden kann. Die Kontrastierung des Extrazellulärraums lässt unter Zwei-Photonen-Anregung die Morphologie der ungefärbten zellulären und subzellulären Strukturen als „Schatten“ erkennbar werden. **B** Live-Ansicht während des „Shadowpatches“ im Hilus einer hippocampalen Schnittkultur. (Zwei-Photonen Stapel-Aufnahme B 1-4 , $\Delta Z = 1,0 \mu\text{m}$, Maßstabsbalken: $10 \mu\text{m}$). Die Kontrastierung des Extrazellulärraums lässt mehrere große Somata erkennen (*, exemplarisch

markiert in B 1). Zudem sind eine Vielzahl fleckenartiger „Schatten“ zu erkennen, die subzellulären Elementen entsprechen (z.B. senkrecht aufsteigenden Dendriten). Die gefärbte MC (rot) hat an ihren proximalen Dendriten mehrere Excrescenzen ausgebildet (○, Excrescenz I-VI, markiert in B 1-4). Bei niedriger Vergrößerung lassen sich bereits die präsynaptischen MF-Boutons als dunkle Umrandungen erkennen.

3.5.2 Patchen identifizierter MF-Boutons

Unter visueller Kontrolle wurde die Stimulationpipette auf einen Abstand von wenigen Mikrometern dem präsynaptischen Bouton angenähert (Abbildung 14 A, B 1-4, XY-Scan: 512 x 512 Pixel, Auflösung: XY = 0,046 μm , $\Delta Z = 0,5 \mu\text{m}$). Der Kontrastierungseffekt des Shadowpatching-Verfahrens ermöglichte bei höherer Vergrößerung eine zweifelsfreie morphologische Identifizierung des verhältnismäßig kleinen präsynaptischen Elements (vergl. \emptyset -MF-Bouton 2-5 μm \leftrightarrow \emptyset -Soma: 25-30 μm).

Die Stimulationpipette wurde unter reduziertem Ausstrom ($< 50 \text{ mbar}$) dem identifizierten MF-Bouton unmittelbar angenähert. Durch die Unterbrechung des Ausstroms bildete sich anschließend zwischen Boutonmembran und Stimulationpipette ein Seal aus, was die individuelle Stimulation des MF-Boutons ermöglichte. Innerhalb weniger Sekunden nach dem Patchvorgang ist der Farbstoff bereits komplett aus dem Extrazellulärraum ausgewaschen und somit steht der grüne Detektionskanal unmittelbar wieder zur Messung des Ca^{2+} -Indikators (Fluo-4FF, grün) zur Verfügung.

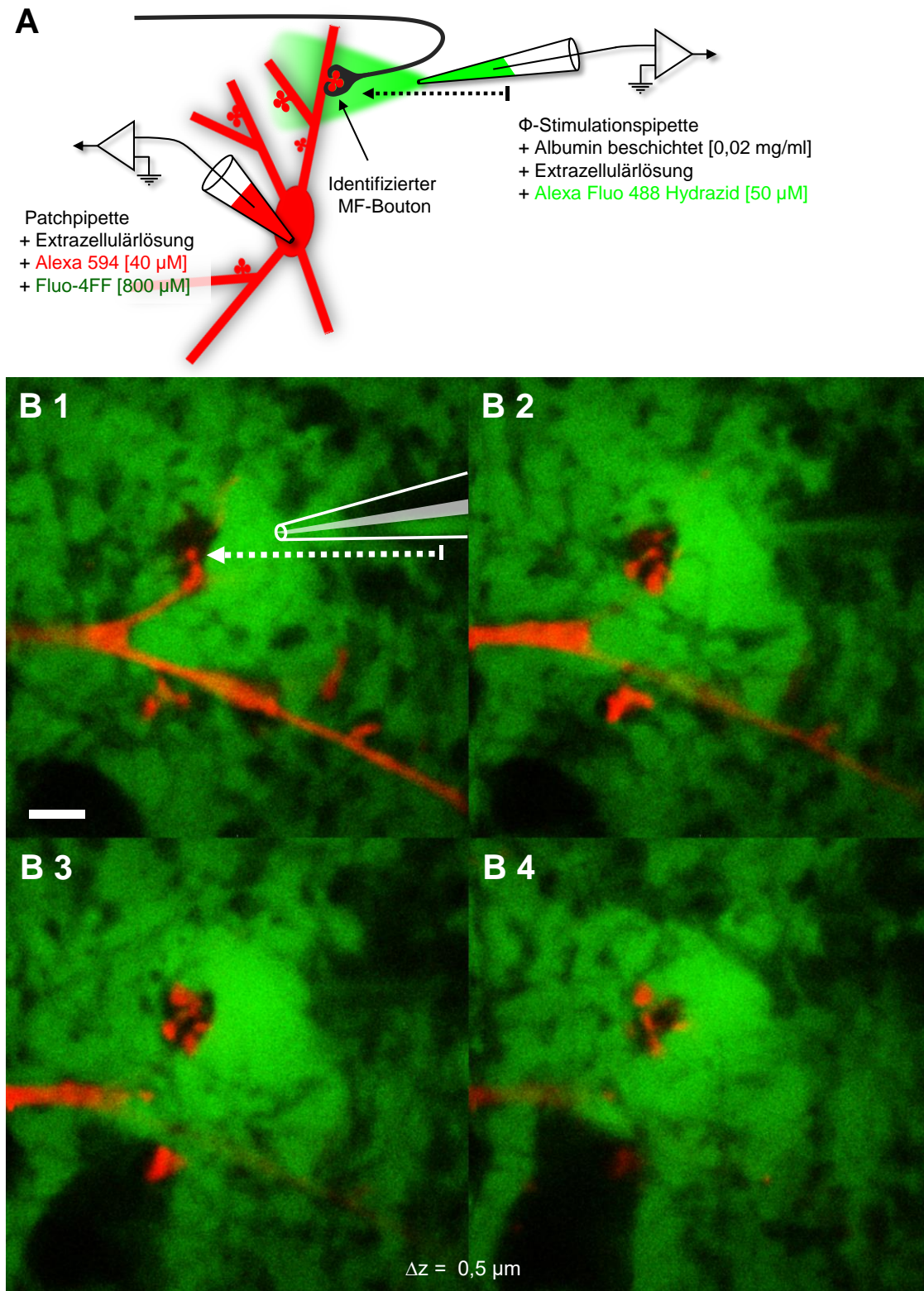


Abbildung 14: „Shadowpatching“-Verfahren zur Identifikation und Stimulation individueller MF-Boutons *in vitro* (abgewandelt nach Kitamura et al., 2008). **A** Die Fluoreszenzmarkierung des Extrazellulärums (grün, Alexa Fluor® 488 Hydrazid) kontrastiert gegen den ungefärbten MF-Bouton (schwarz), der die intrazellulär gefärbte MC-Excrecenz (rot, Alexa 594 Dextran) innerviert. **B** Live-Ansicht während des „Shadowpatchens“ bei hoher Vergrößerung (Zwei-Photonen Stapel-Aufnahme, B 1-4, $\Delta z = 0,5 \mu\text{m}$, Maßstabsbalken: 5 μm). Durch die Kontrastierung des Extrazellulärums wird die typische Morphologie eines individuellen

MF-Boutons zweifelsfrei erkenntlich. Die Spines der gefärbten MC-Excrecenz werden dabei vom ungefärbten präsynaptischen Element komplett umschlossen. Lokalisation der Stimulationspipette exemplarisch in B 1. Während des Patch-Vorgangs wird die Stimulationspipette unter schwachem Ausstrom dem Bouton unmittelbar angenähert. Der Ausstrom wird anschließend unterbrochen, sodass sich ein spontaner Seal zwischen Pipette und Boutonmembran ausbilden kann.

3.5.3 „bouton-attached“-Konfiguration zur Langzeitableitung

Studien zu Einzelableitungen von MF-Boutons zeigen, dass die mit der Ruptur des Ω -Seals verbundene „whole-bouton“-Konfiguration (Abbildung 15 A) bereits nach einigen Minuten zu Auswascheffekten führt (Bischofberger et al., 2006). Grund dafür ist die freie Diffusion von Ionen und kleinen Proteinen in die Pipette. Dieser unerwünschte Nebeneffekt des invasiven Patch-Verfahrens tritt besonders stark bei sehr kleinen Volumina auf, wodurch sich der physiologische Zustand eines Boutons schon nach wenigen Minuten stark verändern kann. Deshalb war die Durchführung langzeitstabiler Ableitungen an der Einzelsynapse (> 60 min) in der Whole-Cell-Konfiguration nicht möglich.

In einer weiteren Serie von Vorversuchen testeten wir deshalb verschiedene Ansätze weniger invasiver Patch-Konfigurationen, bei denen der spontane Ω -Seal nicht rupturiert wird (Vyleta & Jonas, 2014, Abbildung 15 B). Zur Kontrolle der Ω -Seal-Entwicklung wurde während der sogenannten „bouton-attached“-Konfiguration eine kontinuierliche Widerstandsmessung durchgeführt (Stromantwort auf eine Rechteck-Spannungskurve, ± 5 mV).

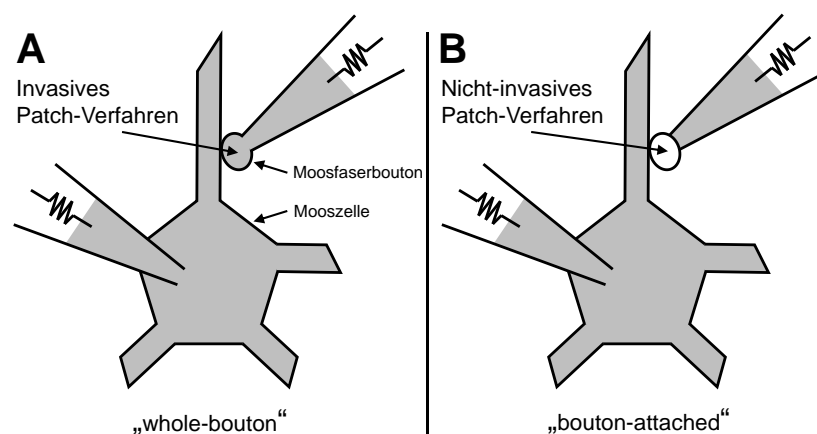


Abbildung 15: Unterschiedliche Patch-Konfigurationen zur gepaarten Ableitungen individueller MF-Synapsen (Abb. verändert nach Vyleta & Jonas, 2014). **A** Während der somatischen Whole-Cell-Patch-Clamp-Ableitung an einer MC wird eine zweite Pipette zur Ableitung und Stimulation des präsynaptischen MF-Boutons verwendet. Durch die Ruptur der Boutonmembran wird die sogenannte „whole-bouton“-Konfiguration erreicht. Bei diesem invasiven Verfahren wird die Physiologie des Boutons durch Auswascheffekte nach kurzer Zeit jedoch stark beeinträchtigt. **B** Eine Alternative bietet das nicht-invasive Patch-Verfahren in der „bouton-attached“-

Konfiguration. Hierbei bleibt die Boutonmembran nach der Ausbildung des Ω -Seals über die gesamte Dauer der Ableitung intakt.

Im Verlauf der Vorversuche zeigte sich jedoch, dass die Spontanaktivität der MF-Boutons in der „bouton-attached“-Konfiguration stark anstieg. Kurze Zeit nach der Giga- Ω -Seal-Bildung („tight-seal“) waren häufig anhaltende AP-Serien zu beobachten, die schließlich zum Zusammenbruch des Membranpotentials der postsynaptischen MC führten. Grund hierfür war möglicherweise die mechanische Belastung der Boutonmembran durch den ausgeprägten Ω -Seal (Alcami et al., 2012).

Aus diesem Grund entwickelten wir ein modifiziertes Verfahren der „bouton-attached“-Konfiguration (Abbildung 15 B). Dazu wurde Albumin (Bovine Serum Albumin Fraction V, Sigma Aldrich) in Extrazellulärlösung gelöst (0,02 mg/ml), mit einem Farbstoffaliquot (Alexa 488 Hydrazid) gemischt und anschließend filtriert (Ultrafree Zentrifugenfilter, Porengröße 0,22 μm , steril, Millipore). Die fertige Lösung wurde in beide Schenkel einer Theta-Stimulationspipette gefüllt (3 μl). Die Albumin-haltige Extrazellulärlösung sorgte für eine Beschichtung der Pipetteninnenwand, wodurch beim Bouton-Patchen gezielt niedrige Seal-Widerstände zwischen 50 - 100 $\text{M}\Omega$ („loose-seal“) erreicht wurden. Diese neue „loose-seal bouton-attached“-Konfiguration stellte sich über lange Zeiträume (>60 min) als ausgesprochen stabil heraus, was gleichzeitig die Reproduzierbarkeit der Bouton-Stimulation enorm vereinfachte.

3.5.4 Einzelsynapsenableitung

Der Nachweis der gelungenen Stimulation einer individuellen MF-Synapse erfolgte nach der Etablierung der gepaarten Ableitungskonfiguration anhand der detektierten postsynaptischen Signale. Erwartet wurde eine AP-Generierung am MF-Bouton nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip. Vor jedem Experiment musste diese Schwellenamplitude neu ermittelt werden (Abbildung 16 A), da sie einerseits vom erreichten Seal-Widerstand, andererseits vom Eingangswiderstand, bzw. der Größe des individuellen MF-Boutons abhängig war und so von Experiment zu Experiment variierte. Dies erfolgte mittels einer Serie von zehn Doppelpulsstimulationen mit ansteigender Amplitude (Pulsdauer: 0,5 ms, Amplitude: 10 nA bis 100 nA). Das Inter-Stimulus Intervall (ISI) betrug 40 ms. Um keine Kurzzeitplastizität an der MF-Synapse zu induzieren, wurde das Inter-Sweep Intervall auf 20 s festgelegt. Die minimale Stimulationsamplitude für das reproduzierbare Auslösen von APs wurde im anschließenden Experiment angewendet. Sie lag in der Regel zwischen 20 nA bis 80 nA. Als Antwort auf überschwellige Doppelpulsstimulationen traten zeitlich streng korrelierte EPSPs

an der somatischen Patch-Pipette auf (Abbildung 16 B). Zugleich wurden im Spinekopf der MC-Excrescenz die evozierten postsynaptischen Ca^{2+} -Antworten mit Hilfe der Punkt-Scan-Methode registriert (Abbildung 16 C).

Mit dem hier vorgestellten Verfahren lässt sich nahezu jedes Stimulationsprotokoll prä- und postsynaptischer Stimulation kombinieren. Unsere Methode eignet sich deshalb sowohl zur Quantifizierung der synaptischen Transmission an der Einzelsynapse (EPSPs und CaTs), als auch zur Induktion von synaptischer Plastizität mit verschiedenen Protokollen. Dies war insbesondere für die Untersuchung der hippocampalen MF-Synapse von Bedeutung, für die ein breites Spektrum an unterschiedlichsten Stimulationsmustern zu verschiedenen Plastizitätsformen führt. Der neu entwickelte methodische Ansatz trägt deshalb den Namen: **iPot** (individual **pot**entiation). Die technische Umsetzung der iPot-Methode mittels der direkten, nicht-invasiven Bouton-Stimulation erlaubte uns außerdem die Untersuchung der individuellen MF-Synapse unter möglichst physiologischen Bedingungen, da keine Notwendigkeit bestand, mittels pharmakologischen Blockern die üblicherweise massenhafte Aktivierung unerwünschter Zell- und Synapsentypen zu unterdrücken.

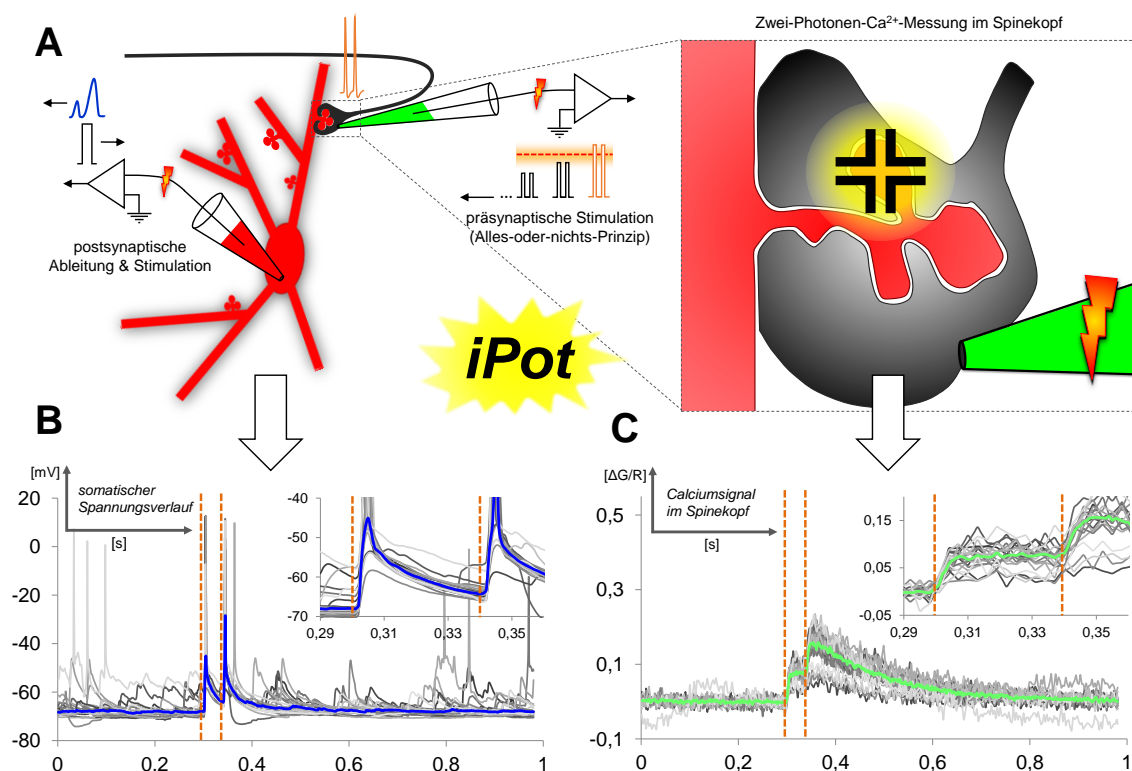


Abbildung 16: iPot. **A** Die postsynaptische MC wird in der Whole-Cell-Patch-Clamp Konfiguration abgeleitet und mit Farbstoffen gefüllt. Sie kann durch die Applikation überschwelliger Strompulse (Rechteckpuls schwarz) aktiviert werden (rote Pipette). Danach erfolgt die „Shadowpatching“-vermittelte Identifizierung des präsynaptischen MF-Boutons mit Etablieren der sowie langzeitstabilen „Loose-seal bouton-attached“-Konfiguration (grüne Pipette). **B** Überschwellige Doppelpulsstimulationen des MF-Boutons (gestrichelte orangene Linien) evozierten zeitlich korrelierte EPSPs (graue Kurven: 20 Sweeps, blaue Kurve: Median aller somatischer Spannungsantworten). Die EPSPs weisen eine große Variabilität auf (siehe Ausschnitt). Es gibt unterschwellige EPSPs mit Amplituden < 10 mV neben sehr großen überschwelligeren EPSPs, die direkt zur Generierung eines APs in der MC führen. Die Spannungskurven zeigen zudem die typische Spontanaktivität der MC in der entorhino-hippocampalen Schnittkultur ohne pharmakologische Zusätze. **C** Die simultane Zwei-Photonen-Ca²⁺-Messung erfasst den Ca²⁺-Einstrom in einen postsynaptischen Spinekopf der MC-Exzreszenz (graue Kurven: normierte CaTs ($\Delta G/R$); grüne Kurve: Median der 20 Wiederholungen). Auch in der postsynaptischen Ca²⁺-Antwort zeigt sich die Variabilität der Einzelsynapse.

3.6 Durchführung der iPot-Experimente

Das Experiment sollte Aufschluss darüber geben, welche Rolle der Spine-Apparat bzw. der CiCR für die synaptische Übertragung und Plastizität an individuellen MF-Synapsen spielt. Dazu wurden MF-MC-Synapsen von WT- und Synaptopodin-KO-Mäusen untersucht.

In der Hilusregion einer entorhino-hippocampalen Schnittkultur (> 28 DIV) wurde das Soma einer MC gepatcht und zunächst einer Erfassung der aktiven und passiven Membraneigenschaften unterzogen (Details siehe 3.2.2, Seite 33 ff.). Nach der Identifikation des präsynaptischen MF-Boutons mit Hilfe des „Shadowpatching“-Verfahrens und der Bestimmung der Schwellenamplitude in der „bouton-attached“-Konfiguration wurde das Experiment gestartet.

Das Experimentdesign setzte sich aus drei Teilen zusammen (Abbildung 17). Zur Charakterisierung des aktuellen Zustands der Einzelsynapse wurde eine Messreihe von 20 Doppelpulsstimulationen durchgeführt (Abbildung 17 A). Die Antworten auf den jeweils ersten Puls spiegelten den aktuellen Zustand der synaptischen Transmission wieder (EPSP-Steigung und maximale Ca^{2+} -Amplitude), bzw. ermöglichten eine Aussage über die postsynaptische Ausstattung mit AMPARs und NMDARs. Eine quantitative Aussage über die initiale p_R (release probability) des präsynaptischen MF-Boutons konnte anhand der charakteristischen PPF, bzw. der berechneten PPR ermittelt werden (EPSP-Steigung, bzw. max. Ca^{2+} -Amplitude: zweite Antwort/erste Antwort). Eine große PPR ($\gg 1$) weist auf eine geringe initiale p_R hin, wohingegen eine PPR nahe oder sogar deutlich kleiner eins eine initial hohe p_R vermuten lässt.

Im zweiten Teil des Experiments sollte mit Hilfe eines STDP-Protokolls postsynaptisches LTP an der MF-Synapse induziert werden (Abbildung 17 B). Dazu wurde eine Serie von 24 präsynaptischen (je 0,5 ms, 20 - 80 nA) Stimulationen, jeweils kombiniert mit einer um 10 ms verzögerten postsynaptischen Stimulation (1,5 ms, 1,5 nA) mit 25 Hz appliziert. Durch die am Soma der gepatchten MC ausgelösten, in den Dendritenbaum propagierenden APs sollte eine effizientere Öffnung der NMDARs durch Verminderung des Mg^{2+} -Blocks hervorgerufen werden (modifiziert nach Schmitz et al., 2003; Kwon und Castillo, 2008).

Der letzte Experimentteil startete 30 Minuten nach dem Induktionsprotokoll. Er bestand aus der Wiederholung der 20 Doppelpulsstimulationen (Abbildung 17 B), um die Veränderung des Zustands der Synapse in Reaktion auf das Induktionsprotokoll zu untersuchen.

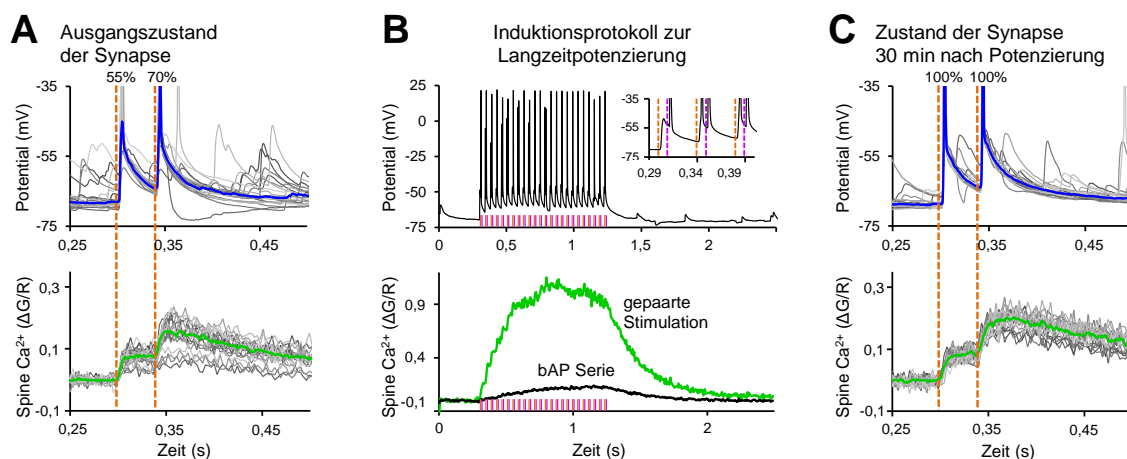


Abbildung 17: Interrogation und Potenzierung individueller MF-Synapsen. **A** Spannungs- (oben) und Ca²⁺-Antworten (unten) der 20 Doppelpulsstimulationen vor der Potenzierung (blaue und grüne Kurven: Mediane aller Einzelmessungen). Bei 55% der ersten und 70% der zweiten Pulse sind die evozierten Antworten überschwellig. **B** Induktion der Potenzierung der gleichen Synapse durch einer Serie von 24 Bouton-Stimulationen (orangene Linien), kombiniert mit bAPs (magenta Linien). Der Ausschnitt zeigt die ersten drei Antworten vergrößert. Die Ca²⁺-Antwort der gepaarten Stimulation fällt um ein Vielfaches höher aus (grüne Kurve), als bei der alleinigen bAP-Serie (schwarze Kurve), was auf die Aktivierung der NMDARs zurückzuführen ist. **C** 30 min nach dem Induktionsprotokoll sind 100% der Antworten überschwellig. Die Amplituden der Ca²⁺-Antworten sind erhöht, deren Variabilität ist reduziert.

3.6.1 Parameter der entorhino-hippocampalen Schnittkulturen

Für die iPot-Experimente wurde die Präparation der Versuchstiere zwischen P3 und P5 durchgeführt. Das mittlere Alter der WT-Tiere lag bei $4,1 \pm 0,57$ Tage (\pm SD), das der KO-Tiere bei $4,0 \pm 0,32$ Tage. Die mittlere Inkubationsdauer der Kulturen am Tag des Experiments betrug bei WT-Kulturen $41,7 \pm 10,4$ Tage (\pm SD), bei KO-Kulturen $49,7 \pm 12,5$ Tage.

3.6.2 Modellierung und Analyse der postsynaptischen Signale (EPSPs + CaTs)

Die Rohdaten der evozierten EPSPs sowie der korrespondierenden CaTs in Antwort auf die Doppelpulsstimulation wurden zuerst mittels einer lokal adaptiven, auf Bayesianischen P-Splines basierenden Regressionsmethode geglättet (Scheipl und Kneib, 2009). Dieses Verfahren hat im Vergleich zu anderen Glättungsverfahren den Vorteil, dass auch sehr steile Anstiege im geglätteten Kurvenverlauf erhalten bleiben (Implementierung in LabVIEW; siehe DISCLAIMER Seite 31).

Die geglätteten Spannungs- und normierten Fluoreszenzkurven wurden anschließend mit Hilfe eines genetischen Anpassungs-Algorithmus auf eine Transientenfunktion in Form der Differenz zweier Exponentialfunktionen gefittet (Richardson und Silberberg, 2008). Aus den

erhaltenen Funktionen konnten die Zeitkonstanten für die Anstiegsphase τ_r (raise) und den Abfall τ_d (decay) sowie der Startzeitpunkt t_0 und die Maximalamplitude y_{max} der Kurvenverläufe extrahiert werden.

Modell der Transientenfunktion (Differenz zweier Exponentialfunktionen):

$$y(t) = y_{max} \cdot \frac{\exp^{-(t-t_0)/\tau_d} - \exp^{-(t-t_0)/\tau_r}}{(\tau_r/\tau_d)^{\tau_r/(\tau_d - \tau_r)} - (\tau_r/\tau_d)^{\tau_d/(\tau_r - \tau_d)}}$$

mit τ_r = Zeitkonstante des Anstiegs; τ_d = Zeitkonstante des Abfalls;
 y_{max} = Maximalamplitude; t_0 = Startzeitpunkt

Die Ableitung dieser Funktion zum Zeitpunkt $t = 0$ liefert die Steigung im Startpunkt:

$$\text{Steigung}(t_0) = \frac{y_{max} \cdot (1/\tau_d - 1/\tau_r)}{\exp^{-t_{max}/\tau_r} - \exp^{-t_{max}/\tau_d}}$$

3.6.3 Statistik

Für jede Synapse wurden aus allen Wiederholungen die Mediane und die mediane Abweichung vom Median der verschiedenen Parameter berechnet. Als robustes Korrelationsmaß wurde Kendalls tau verwendet. Mit Hilfe der Perzentil-Bootstrap-Methode (1000 Bootstrap-Stichproben) wurde ein Konfidenzintervall für jede Zelle berechnet (Wilcox, 2012).

4 Ergebnisse

4.1 CiCR an der Moosfasersynapse

4.1.1 Calcium-Antworten in Spines und Dendriten von Mooszellen

Die quantitative Analyse der CaTs ergab, dass die Maximalamplituden der Ca²⁺-Antworten in Spines von Synaptopodin-KO Zellen gegenüber Spines in WT-Zellen im Mittel um 24 % kleiner waren (c_{\max} Spine WT, Mittelwert \pm SEM: $0,1473 \pm 0,0304$; KO: $0,1125 \pm 0,0169$; $n = 21/13$; P-Wert: $0,00539$ (*); Abbildung 18 A, Anhang 6.2, Seite 107). Entsprechend waren die Ca²⁺-Influxraten in KO-Spines im Mittel um etwa 35 % langsamer (k_{Influx} Spine WT [1/s]: $1,550 \pm 0,4654$; KO: $1,01431 \pm 0,1879$; P-Wert: $0,00288$ (*)). Die Zeitkonstanten der Extrusion waren in KO-Spines im Mittel um 30 % verlangsamt ($\tau_{\text{Extrusion}}$ Spine WT [s]: $0,3285 \pm 0,0736$; KO: $0,4288 \pm 0,1237$; P-Wert: $0,03035$ (*)). In Dendriten jedoch fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Die mittlere Maximalamplitude (c_{\max} Dendrit WT: $0,1720 \pm 0,0260$; KO: $0,1702 \pm 0,0169$; P-Wert: $0,94786$ (n.s)) sowie die mittlere Influxraten (k_{Influx} Dendrit WT: $2,075 \pm 0,5079$; KO: $1,8871 \pm 0,3263$; P-Wert: $0,42119$ (n.s.) und die Zeitkonstante der Extrusion ($\tau_{\text{Extrusion}}$ Dendrit WT: $0,3024 \pm 0,0605$; KO: $0,2955 \pm 0,0687$; P-Wert: $0,6169$ (n.s.) waren in den Dendriten beider Genotypen nahezu identisch; Abbildung 18 B, Anhang 6.2, Seite 107) Da ein Spine-Apparat nur in Spines, jedoch nicht in Dendriten gebildet wird und deshalb nur in Spines von Synaptopodin-KO Zellen fehlt, sind diese Befunde gut mit der Hypothese vereinbar, dass der Spine Apparat eine Rolle für die postsynaptische Ca²⁺-Kinetik an der MF-Synapse spielt. Durch das Experimentdesign (Ca²⁺-Influx durch nicht-synaptische Aktivierung mittels bAP-Serien) konnten wir ausschließen, dass die gefundenen Effekte auf Unterschieden in den Synapsen wie zum Beispiel eine unterschiedliche Aktivierung von NMDARs zurückzuführen sind. Der Vergleich der basalen Fluoreszenz in Spines und Dendriten ergab keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (siehe Anhang 6.2, Seite 107).

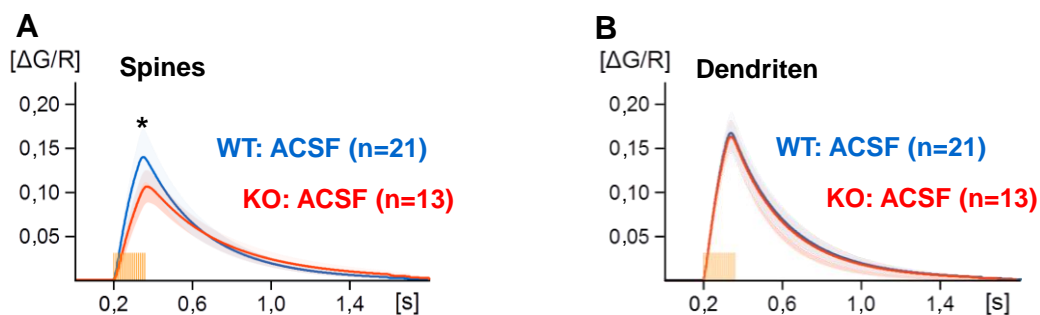


Abbildung 18: CaTs in Spines und Dendriten beider Genotypen. In jeder Mooszelle (n) wurden ein Spine und ein Dendrit untersucht. Pro Schnittkultur wurde nur eine Mooszelle analysiert. **A** Die CaTs in Antwort auf bAPs (16 Stimuli bei 100 Hz, orange Linien) in Spines von Synaptopodin-KO-Tieren wiesen im Vergleich zu WT-Tieren eine signifikant reduzierte Amplitude sowie verlangsamte Kinetiken auf (c_{\max} Spine: -24 %; P-Wert: 0,0054 (*); k_{Influx} Spine: -35%; P-Wert: 0,00288 (*); $T_{\text{Extrusion}}$ Spine: +30 %; P-Wert: 0,03035 (*); Generalisierter Wilcoxon-Rangsummentest (Neuhäuser und Ruxton, 2009). Gemittelte CaTs aller Wiederholungen im WT (blaue Line), bzw. KO (rote Line); farblich unterlegte Banden repräsentieren den Bereich der Standardabweichung (SD). **B** Die Amplituden und Kinetiken der CaTs in den Dendriten waren in beiden Genotypen nahezu identisch (Werte siehe Text und Anhang 6.2, Seite 107).

4.1.2 Effekt von Ryanodin auf die Calciumkinetik in Spines und Dendriten:

Die Ryanodin-vermittelte Blockade des CiCR sorgte sowohl in den Spines als auch den Dendriten beider Genotypen für eine starke Reduktion der Ca^{2+} -Antworten. Die maximalen Ca^{2+} -Amplituden waren in WT-Spines im Mittel um 31% kleiner (c_{\max} Spine, Quotient $\text{WT}^{\text{Rya}} / \text{WT}^{\text{ACSF}}$, Mittelwert \pm SD: $0,6998 \pm 0,1030$; $n = 11$; P-Wert: 0,00637 (*); Abbildung 19 A). Erwähnenswert hierbei ist, dass die maximalen Ca^{2+} -Amplituden in WT-Spines nach der Blockade des CiCR gerade das Ausgangsniveau der KO-Spines aufweisen (vgl. Abbildung 19 A und B). In KO-Spines fiel die Reduktion nach Zugabe von Ryanodin mit 19% im Mittel deutlich schwächer als im WT, jedoch immer noch signifikant aus (c_{\max} Spine, Quotient $\text{KO}^{\text{Rya}} / \text{KO}^{\text{ACSF}}$: $0,8133 \pm 0,2037$; $n = 10$; P-Wert: 0,04807 (*); Abbildung 19 B). Dieser Befund könnte auf die Präsenz von RyRs in der Membran einfacher ER-Zisternen in den Spines Synaptopodin-defizienter Tiere hinweisen. Dementsprechend waren nach Ryanodingabe auch geringere Influxraten zu beobachten. In WT-Spines belief sich die Reduktion im Mittel auf 35% (k_{Influx} Spine, Quotient $\text{WT}^{\text{Rya}} / \text{WT}^{\text{ACSF}}$: $0,6493 \pm 0,1700$; P-Wert: 0,00637 (*); Abbildung 19 A), in KO-Spines immerhin auf 18% (k_{Influx} Spine, $\text{KO}^{\text{Rya}} / \text{KO}^{\text{ACSF}}$: $0,8268 \pm 0,2406$; P-Wert: 0,09766 (n.s.); Abbildung 19 B). Mit Hilfe des gepaarten Testverfahrens konnte trotz der relativ breiten Streuung der Einzelmessungen ein signifikanter Effekt in den KO-Spines detektiert werden.

Bemerkenswerterweise war auch die Extrusion in den Spines nach Ryanodingabe im Vergleich zum Ausgangszustand deutlich verlangsamt (vgl. Abbildung 19 A und B). Der Effekt trat am

stärksten in WT-Spines auf ($\tau_{\text{Extrusion Spine}}$, Quotient $WT^{\text{Rya}} / WT^{\text{ACSF}}$: $2,2263 \pm 1,0101$; P-Wert: $0,00637$ (*)) und deutete sich auch in KO-Spines an ($\tau_{\text{Extrusion Spine}}$, Quotient $KO^{\text{Rya}} / KO^{\text{ACSF}}$: $1,4147 \pm 0,4362$; P-Wert: $0,06249$ (n.s.)), wobei in diesem Fall anzumerken ist, dass die Nullhypothese bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ nur knapp nicht zurückgewiesen werden konnte.

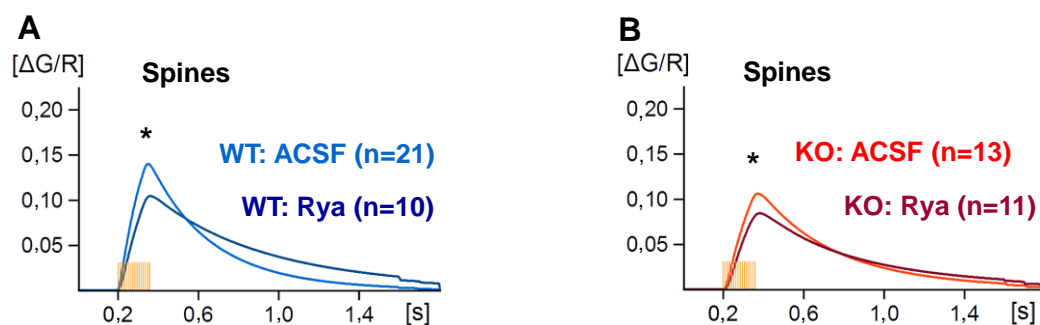


Abbildung 19: Änderung der Ca²⁺-Kinetik in Spines nach Ryanodingabe. **A** Nach der Blockade des CiCR durch Ryanodin [40 μ M] war die maximale Ca²⁺-Amplitude in den WT-Spines signifikant um 31 % reduziert ($c_{\text{max Spine}}$, Quotient $WT^{\text{Rya}} / WT^{\text{ACSF}}$, Mittelwert \pm SD: $0,6998 \pm 0,1030$; P-Wert: $0,00637$ (*)). Die WT-Spines wiesen zudem eine deutlich verlangsamte Influxrate um 35 %, sowie eine um 122% langsamere Extrusion auf ($k_{\text{Influx Spine}}$, Quotient $WT^{\text{Rya}} / WT^{\text{ACSF}}$: $0,6493 \pm 0,1700$; P-Wert: $0,00637$ (*); $\tau_{\text{Extrusion Spine}}$, Quotient $WT^{\text{Rya}} / WT^{\text{ACSF}}$: $2,2263 \pm 1,0101$; P-Wert: $0,00637$ (*)). **B** Interessanterweise fanden wir eine milde, aber dennoch signifikante Abschwächung der Ca²⁺-Amplituden um 19 % in den KO-Spines ($c_{\text{max Spine}}$, Quotient $KO^{\text{Rya}} / KO^{\text{ACSF}}$: $0,8133 \pm 0,2037$; P-Wert: $0,04807$ (*)). Die Influx und Extrusionskinetik dieser Spines waren nominell um 18 % verlangsamt, jedoch erwiesen sich diese Veränderungen als nicht signifikant ($k_{\text{Influx Spine}}$, Quotient $KO^{\text{Rya}} / KO^{\text{ACSF}}$: $0,8268 \pm 0,2406$; P-Wert: $0,09766$ (n.s.); $\tau_{\text{Extrusion Spine}}$, Quotient $KO^{\text{Rya}} / KO^{\text{ACSF}}$: $1,4147 \pm 0,4362$; P-Wert: $0,06249$ (n.s.)).

Der Effekt der Blockade des CiCR fiel in den Dendriten deutlich stärker aus. Hier beobachteten wir eine Reduktion der Maximalamplituden im WT im Mittel um 39 % ($c_{\text{max Dendrit}}$, Quotient $WT^{\text{Rya}} / WT^{\text{ACSF}}$: $0,6110 \pm 0,1295$; $n = 11$; P-Wert: $0,0064$ (*)) und KO-Dendriten um 35 % ($c_{\text{max Dendrit}}$, Quotient $KO^{\text{Rya}} / KO^{\text{ACSF}}$: $0,6521 \pm 0,11315$; $n = 10$; P-Wert: $0,0066$ (*)). Dementsprechend waren auch die Influxraten stärker reduziert: im WT um 44 % ($k_{\text{Influx Dendrit}}$, Quotient $WT^{\text{Rya}} / WT^{\text{ACSF}}$: $0,5614 \pm 0,128$; P-Wert: $0,00637$ (*)), in KO-Zellen um 41 % ($k_{\text{Influx Dendrit}}$, Quotient $KO^{\text{Rya}} / KO^{\text{ACSF}}$: $0,5932 \pm 0,0986$; P-Wert: $0,00659$ (*); Abbildung 20, Anhang 6.2, Seite 107).

Auch die Messungen in den Dendriten zeigten einen unerwartet starken Effekt von Ryanodin auf die Extrusion, die um fast 100 % im WT und 72 % in der KO ($\tau_{\text{Extrusion Dendrit}}$, Quotient $WT^{\text{ACSF}} / WT^{\text{Rya}}$: $2,0192 \pm 0,6972$; P-Wert: $0,00637$ (*); $\tau_{\text{Extrusion Dendrit}}$, Quotient $KO^{\text{Rya}} / KO^{\text{ACSF}}$: $1,7204 \pm 0,3599$; P-Wert: $0,01137$ (*)) verlangsamt war. Infolge der niedrigeren Ca²⁺-Konzentrationen nach Blockade des CiCR war eine schwächere Extrusion zu erwarten gewesen, jedoch ging die beobachtete Schwächung über das zu erwartende Maß

deutlich hinaus (vgl. CaTs in Abbildung 20: Kurven schneiden sich während der Extrusionsphase!). Diese Befunde deuten auf eine Sekundärwirkung von Ryanodin hin, der unabhängig von der untersuchten Struktur auftrat (Abbildung 19).

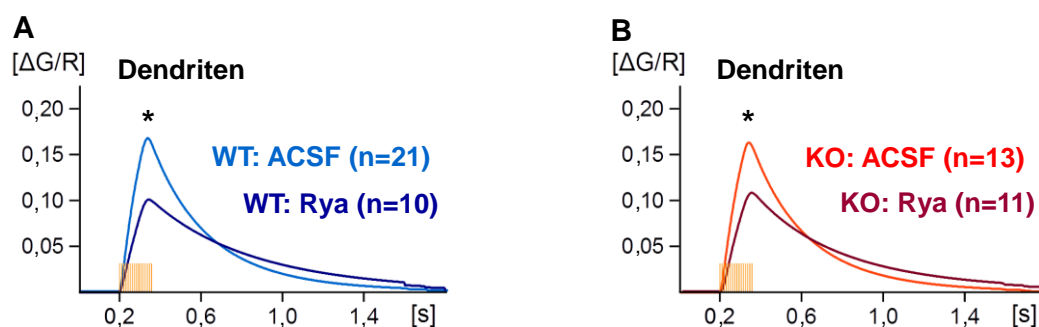


Abbildung 20: Gleichmäßig stark ausgeprägter Ryanodineffekt in den Dendriten beider Genotypen. **A** Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Maximalamplitude um 39 % in WT-Dendriten (c_{\max} Dendrit, Quotient WT^{Rya} / WT^{ACSF} , Mittelwert \pm SD: $0,6110 \pm 0,1295$; P-Wert: 0,0064 (*)) und um 35 % in KO-Dendriten (c_{\max} Dendrit, Quotient KO^{Rya} / KO^{ACSF} : $0,6521 \pm 0,11315$; P-Wert: 0,0066 (*)). Unerwartet stark war in beiden Genotypen die hemmende Wirkung von Ryanodin auf die Extrusion ($\tau_{\text{Extrusion Dendrit}}$, Quotient WT^{Rya} / WT^{ACSF} : $2,0192 \pm 0,6972$; P-Wert: 0,00637 (*); $\tau_{\text{Extrusion Dendrit}}$, Quotient KO^{Rya} / KO^{ACSF} : $1,7204 \pm 0,3599$; P-Wert: 0,01137 (*)).

4.1.3 Ryanodin egalisiert die Unterschiede zwischen den Genotypen

Wir konnten feststellen, dass unter Blockade des CiCR die CaTs sowohl in den Spines als auch in den Dendriten beider Genotypen nicht mehr voneinander zu unterscheiden waren. Der Vergleich der Genotypen liefert in keinem der analysierten Parameter signifikante Abweichungen (c_{\max} Spine WT^{Rya}: $0,1117 \pm 0,0330$; KO^{Rya}: $0,0903 \pm 0,0254$; $n = 11/10$; P-Wert: $0,4959$ (n.s.), k_{Influx} Spine WT^{Rya}: $1,0711 \pm 0,3831$; KO^{Rya}: $0,8260 \pm 0,3160$; P-Wert: $0,1044$ (n.s.); $\tau_{\text{Extrusion}}$ Spine WT^{Rya}: $0,6619 \pm 0,1635$; KO^{Rya}: $0,6132 \pm 0,3548$; P-Wert: $0,2346$ (n.s.); c_{\max} Dendrit WT^{Rya}: $0,1045 \pm 0,0256$; KO^{Rya}: $0,1124 \pm 0,0300$; P-Wert: $0,6379$ (n.s.), k_{Influx} Dendrit WT^{Rya}: $1,1114 \pm 0,2795$; KO^{Rya}: $1,1328 \pm 0,2838$; P-Wert: $0,82776$ (n.s.); $\tau_{\text{Extrusion}}$ Dendrit WT^{Rya}: $0,5753 \pm 0,1337$; KO^{Rya}: $0,4929 \pm 0,1522$; P-Wert: $0,08234$ (n.s.); (Abbildung 21, Anhang 6.2, Seite 107).

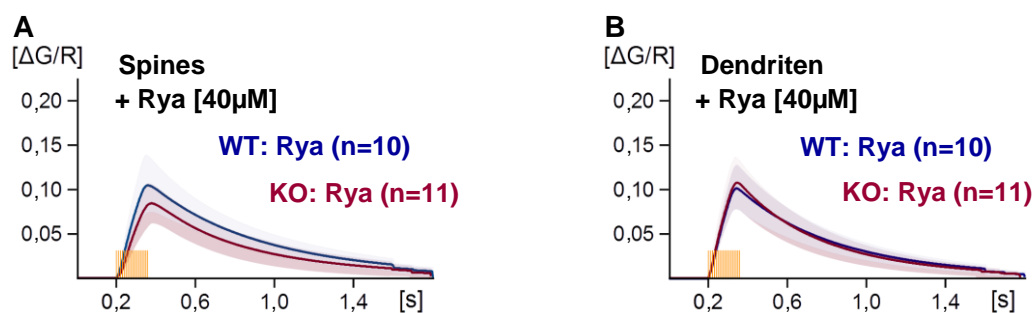


Abbildung 21: Vergleich der CaTs in den Spines und Dendriten beider Genotypen nach Ryanodinegabe. **A, B.** Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Spines, bzw. Dendriten beider Genotypen unter Blockade des CiCR.

4.2 Validierung der iPot-Methode zur Untersuchung einzelner MF-Synapsen

4.2.1 Identifizierung und Stimulation der MF-Boutons

Mit Hilfe des „Shadowpatching“-Verfahrens war es uns gelungen, die zu fluoreszenz-markierten MC-Excrescenzen präsynaptischen MF-Boutons (\emptyset -MF-Boutons: 5-10 μm , zu identifizieren und erfolgreich zu stimulieren.

In einer Reihe von Vorversuchen haben wir beobachtet, dass Bouton-Ableitungen in der „tight-seal“-Konfiguration mit Intrazellulärlösung (Vyleta und Jonas, 2014; Vyleta et al., 2016) bereits nach wenigen Minuten (< 15 min) zur spontanen Ruptur der Boutonmembran und damit zum Übergang in die invasive „whole-bouton“-Konfiguration neigten (Daten nicht gezeigt!). In dem kurzen Zeitraum bis zur Ruptur der Boutonmembran waren spontane APs in hoher Frequenz zu sehen (Daten nicht gezeigt!). Wurden „tight-seal“-Ableitungen von MF-Boutons mit Extrazellulärlösung in der Stimulationspipette durchgeführt, stieg die Spontanaktivität oft kontinuierlich an. Auf Grund der Instabilität des Ω -Seals in der „tight-seal“-Konfiguration endeten diese Experimente meistens nach kurzer Zeit mit unphysiologischem Dauerfeuer der postsynaptischen MC (Daten nicht gezeigt!). Gründe für die Instabilität des Ω -Seals könnten die mechanischen Belastungen der Boutonmembran während des ausgeprägten Kontakts mit der Glaspipette sein (Alcami et al., 2012). Im Fall der verwendeten Extrazellulärlösung kommt hinzu, dass durch die Ruptur des Ω -Seals die transmembranären Ionengradienten zusammenbrechen, was eine starke Depolarisation des Boutons zur Folge hatte.

Die Verwendung von Theta-Borosilikat-Glaskapillaren zur Herstellung der Stimulationspipetten sollte die mechanische Belastung des Ω -Seals während der Ableitung minimieren. Die Albumin-Beschichtung der Pipetten sollte zusätzlich für eine Verringerung der Ω -Seal-Widerstände sorgen.

Mit dieser Kombination erreichten wir reproduzierbare Seal-Widerstände im Bereich von 50 - 100 $\text{M}\Omega$ („loose-seal“-Konfiguration). Gleichzeitig verbesserte sich die Langzeitstabilität der Bouton-Ableitungen enorm. MF-Boutons konnten mit dieser Methode routinemäßig nach mehr als 120 min noch verlässlich stimuliert werden, was offensichtlich zeigt, dass der Ω -Seal in der „loose-seal bouton-attached“-Konfiguration nicht zur spontanen Ruptur neigt. Die benötigten Amplituden zur überschwelligigen Bouton-Stimulation (Pulsdauer: 0,5 ms) lagen in der Regel zwischen 20 nA bis 80 nA.

Der physiologisch herrschende Konzentrationsgradient der K^+ -Ionen zwischen Innen- (130 mM) und Außenseite (2,6 mM) des Membranpatches führt zu einem K^+ -Gleichgewichtspotential (E_K) von ≈ -104 mV ($T = 37^\circ\text{C}$). Das Ruhemembranpotential der MCs ($RMP_{MC} \approx -65$ mV) wird auf Grund der hohen Leitfähigkeit der Zellmembran für K^+ maßgeblich vom E_K beeinflusst. Bei Verwendung von Intrazellulärlösung wird der Membranpatch innerhalb der Pipette durch den Zusammenbruch des K^+ -Potentials „chemisch“ depolarisiert. Dementsprechend reagieren insbesondere kleine, mit K^+ -haltiger Intrazellulärlösung gepatchte Zellen mit einer erhöhten Spontanaktivität (Alcami et al., 2012). In diesem Zusammenhang könnte die geringe Membrankapazität der MF-Boutons ein weiterer Grund für die spontane AP-Generierung sein.

Die Verwendung von Extrazellulärlösung in der Stimulationspipette sorgte hingegen dafür, dass der Membran-Patch auf Grund des bestehenden K^+ -Potentials nicht depolarisiert wird. Zudem wurde die niedrige K^+ -Konzentration im Extrazellulärraum während des Patch-Vorgangs nicht verändert, was es uns ermöglichte die unkontrollierte Stimulation umliegender Neurone zu vermeiden. Der Ausstrom der Extrazellulärlösung während der behutsamen Annäherung der Stimulationspipette an die Boutonmembran.

Eine direkte Detektion der am Bouton evozierten APs konnte leider nicht erreicht werden, da die in der „loose-seal“-Konfiguration abgeleiteten Spannungskurven der APs im Vergleich zu den Stimulationsartefakten sehr klein waren und von diesen überlagert wurden.

4.2.2 Evoziert die Bouton-Stimulation der iPot-Methode synaptische Ereignisse?

Die Aktivierung des MF-Boutons mit resultierender Glutamatfreisetzung konnte anhand zweier Kriterien bestätigt werden. Zum Ersten musste die Bouton-Stimulation dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ folgen, d.h. es musste eine Schwellenamplitude zur Auslösung einer postsynaptischen Antwort existieren. Zum Zweiten war zu fordern, dass die evozierten postsynaptischen Ereignisse mit einer gewissen Latenzzeit auftraten, welche die synaptischen Transmissionsprozesse an einer chemischen Synapse repräsentiert.

Am Beispiel einer Serie von Bouton-Stimulationen zur Detektion der Schwellenamplitude lassen sich diese Aspekte sehr anschaulich verdeutlichen (Abbildung 22). Nur die beiden stärksten der insgesamt zehn Stimulationspulse lösen ein postsynaptisches Ereignis aus (Abbildung 22 B). Die Startpunkte beider evozierten Ereignisse liegen innerhalb der ersten Millisekunde nach dem Ende des Stimulationspulses (Abbildung 22 C). Unsere Vorversuche zeigten, dass eine falsch, bzw. ungenau platzierte Stimulationspipette zwei Phänomene hervorrief, die wir als Abbruchkriterien definierten. Bei einer unbeabsichtigten direkten Stimulation der postsynaptischen Membran fielen die Startpunkte der evozierten Ereignisse mit dem Stimulationspuls zusammen. Ohne Latenzzeit ($> 0,5$ ms und < 1.0 ms nach Ende des Stimulus) konnte es sich nicht um eine synaptische Aktivierung handeln. Zudem konnten die Startpunkte evozierter Ereignisse auch höhere Latenzzeiten aufweisen (> 1 ms). In diesem Fall war anzunehmen, dass es sich zwar um synaptische Ereignisse handelte, diese jedoch nicht am stimulierten Bouton stattfanden. Alle ausgewerteten iPot-Experimente erfüllten diese Kriterien.

Auf den postsynaptischen Aufzeichnungen sind zum Zeitpunkt der präsynaptischen Stimulation kleine Stimulationsartefakte zu sehen (siehe Abbildung 22 A, C). Ihre kapazitiven Spannungsverläufe (Amplituden: $\leq 0,2$ mV) fallen zeitlich exakt auf den Anfang und das Ende der Stimulationspulse (vgl. Abbildung 22 B und C). Die Ursache dieser Stimulusartefakte könnte möglicherweise die minimale Depolarisation der postsynaptischen Membran durch das erzeugte elektrische Feld der Stimulationspipette sein. Des Weiteren könnte es sich auch um elektrische Überlagerungseffekte handeln, die bei der Digitalisierung der Spannungssignale durch die PCI-Karte im Steuerungs-PC hervorgerufen werden und somit keine zellulären Messartefakte darstellen würden.

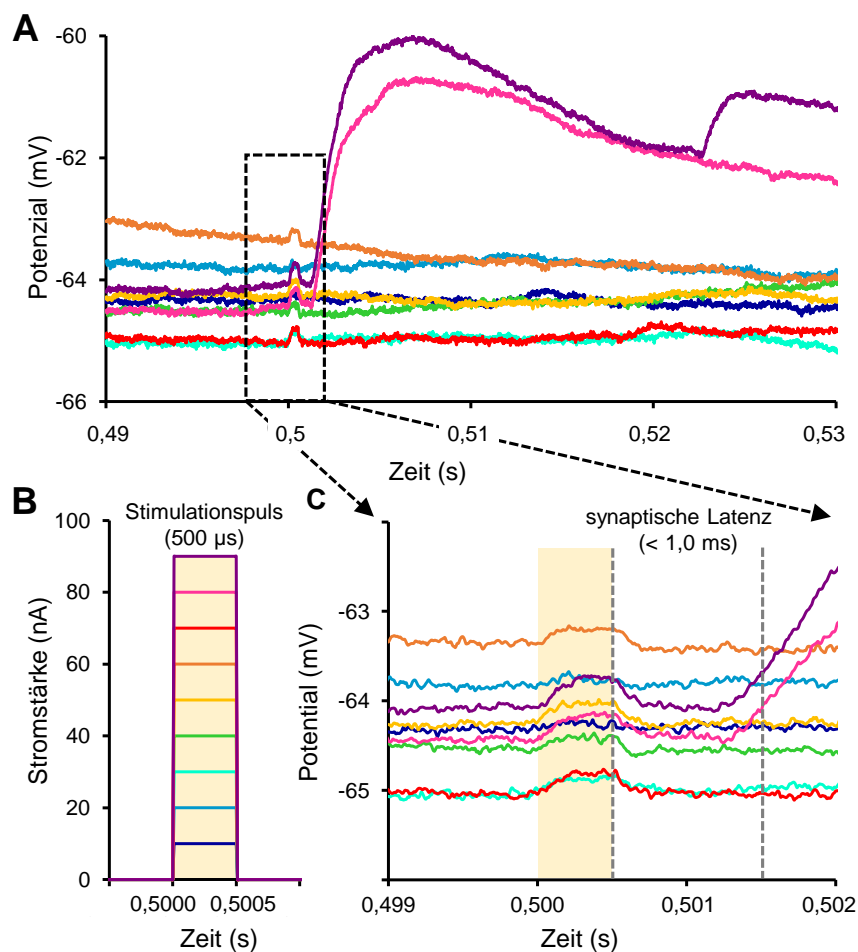


Abbildung 22: Stimulation des MF-Boutons in der „loose-seal“-Konfiguration evoked synaptische Ereignisse. **A** Spannungsverläufe einer somatisch abgeleiteten MC (CC-Modus) während einer Serie präsynaptischer Bouton-Stimulationen zur Detektion der Schwellenamplitude. Nur zwei Kurven (magenta und lila) zeigen in Antwort auf die stärksten Stimulationspulse ein evoked postsynaptisches Potential. **B** Stromstärke der zehn applizierten Stimulationspulse. Farbcodierung entspricht der in (A). **C** Vergrößerter Ausschnitt des gestrichelt umrandeten Bereichs in (A). Der grau unterlegte Bereich markiert die Dauer des Stimulationspulses. Alle Ableitungen der postsynaptischen Zelle zeigen Stimulusartefakte mit einem kapazitiven Spannungsverlauf. Gestrichelte graue Linien markieren den Zeitraum von einer Millisekunde nach dem Ende des Stimulationspulses. Innerhalb dieses Zeitraums beginnt der Anstieg der evoked synaptischen Ereignisse, was der typischen Latenzzeit chemische Synapsen entspricht.

4.2.3 Physiologische Kinetik evoked Antworten

Um aufzuklären, ob die evoked EPSPs der Bouton-Stimulation physiologische Kinetiken aufweisen, verglichen wir den Verlauf evoked EPSPs und CaTs mit zufällig spontan aufgezeichneten Ereignissen (siehe Abbildung 23 A, B). Anhand der zeitlichen Korrelation und der übereinstimmenden Kinetik des CaTs konnte das Ereignis eindeutig der stimulierten Synapse zugewiesen werden.

Der erste CaT war auf Grund des supralinearen Ca^{2+} -Influx in Antwort auf das überschwellige EPSP höher (erhöhte NMDA-Leitfähigkeit).

Die Aufnahme einer anderen MC zeigte drei spontane überschwellige EPSP-Ereignisse, die direkt zur Auslösung von APs in der MC führten (siehe Abbildung 23 C). Das dritte spontane Ereignis ließ sich anhand des korrespondierenden Ca^{2+} -Signals der untersuchten Synapse zuordnen. Die ersten beiden überschwelligen EPSPs waren hingegen von sehr kleinen CaTs begleitet, die dem im Vergleich zur NMDAR Aktivierung schwachen Ca^{2+} -Influx durch VGCCs nach bAP-Stimulation entsprachen. Die Eingangssynapsen dieser Ereignisse waren demnach sicher an anderen MC-Excrescenzen lokalisiert. Diese Aufnahmen zeigen eindrucksvoll, dass wir mit Hilfe der neuen iPot-Methode in der Lage sind, unter physiologischen Bedingungen und ohne den Einsatz von pharmakologischen Substanzen, die beiden Hauptkomponenten der glutamatergen Transmission (AMPAR- und NMDAR-Aktivierung) an einer individuellen MF-Synapse parallel studieren zu können.

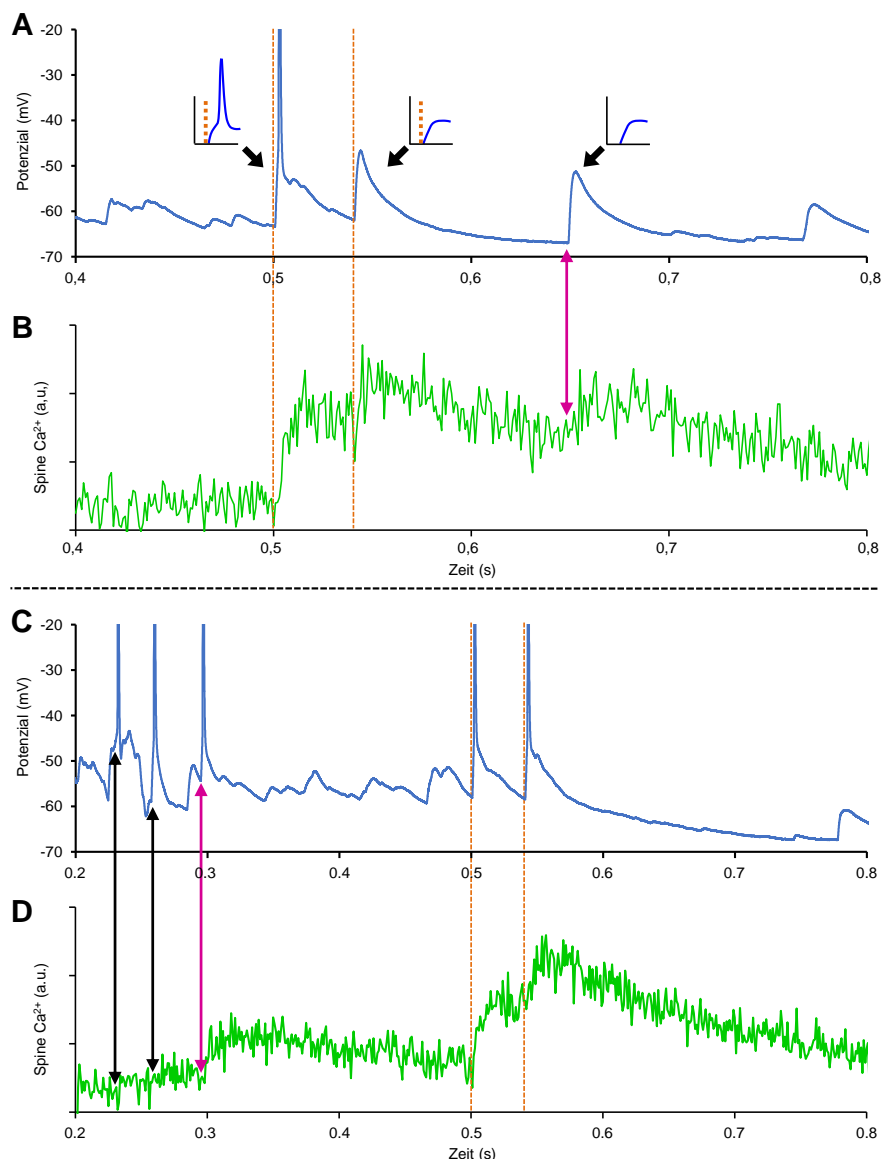


Abbildung 23: Vergleich der evozierten EPSP- und Ca^{2+} -Antworten mit spontan aufgetretenen synaptischen Ereignissen an individuellen MF-MC-Synapsen. **A** Spannungsverlauf der somatisch abgeleiteten MC während der PPS des präsynaptischen Boutons (PPS: orange Linien, ISI = 40 ms). Das erste evozierte EPSP war überschwellig und löste direkt ein AP in der postsynaptischen MC aus. Die Antwort auf den zweiten Stimulus blieb unterschwellig. Die unterschiedlichen Antwortklassen wurden jeweils als Skizze über den EPSPs abgebildet (schwarze Pfeile markieren die Ereignisse). Kurze Zeit nach der PPS ereignete sich ein spontanes EPSP (magenta Doppelpfeil). **B** Parallele Zwei-Photonen Ca^{2+} -Messung im postsynaptischen Spine zum stimulierten MF-Bouton ($\Delta\text{G/R}$). Der PPS folgten zeitlich streng korrelierte CaTs mit unterschiedlichen Amplituden. Der erste CaTs zeigte in Antwort auf das überschwellige EPSP auf Grund des supralinearen Ca^{2+} -Influx (erhöhte NMDAR-Leitfähigkeit) eine höhere Amplitude. Das spontan auftretende Ereignis konnte anhand der Kinetik des zeitlich korrelierten CaTs (magenta Doppelpfeil) eindeutig der untersuchten MF-Synapse zugewiesen werden. **C** Spannungsverlauf einer anderen MC-Ableitung (Hinweis: x-Achsenkalierung abweichend von A). Die PPS des MF-Boutons evozierte zwei überschwellige EPSPs (orange Linien). Die MC erfuhr kurz vor der PPS drei spontane überschwellige Ereignisse (Doppelpfeile). **D** Die Kinetik der beiden durch die Bouton-Stimulation evozierten CaTs (orange Linien) entsprach jeweils der typischen NMDAR-Beteiligung (Hinweis: x- und y-Achsenkalierung abweichend von B). Die Kinetik der CaTs der beiden ersten spontanen Ereignisse (schwarze Doppelpfeile) reflektierte hingegen den bAP-vermittelten

Ca²⁺-Influx durch die VGCCs. Das dritte Ereignis (magenta Doppelpfeil) konnte anhand seiner Kinetik der untersuchten MF-MC-Synapse zugeordnet werden.

4.2.4 Umfang des gewonnenen Datensatzes:

In die Auswertung flossen die Daten von 26 erfolgreichen Bouton-Stimulationen in 26 WT-Schnittkulturen von insgesamt 21 Mäusen. Dabei stammten in insgesamt fünf Fällen zwei Kulturen von dem gleichen Tier. An insgesamt 10 dieser WT-Synapsen wurde das komplette iPot-Experiment, einschließlich der Bouton-Stimulationen 30 min nach der Potenzierung, erfolgreich durchgeführt. Die Vergleichsgruppe der Synaptopodin-defizienten KO-Tiere umfasste 20 erfolgreiche Bouton-Stimulationen in 20 Schnittkulturen von insgesamt 18 Tieren. In dieser Gruppe stammten in zwei Fällen zwei Kulturen vom gleichen Tier. Der KO-Datensatz beinhaltete insgesamt 10 erfolgreiche iPot-Experimente.

Die Präparation der Versuchstiere erfolgte im Alter von P3 bis P5. Das mittlere Alter der im Datensatz enthaltenen WT-Tiere lag bei 4,1 Tagen, das der KO-Tiere bei 4,0 Tagen. Die durchschnittliche Inkubationsdauer der WT-Schnittkulturen betrug $41,7 \pm 10,4$ Tage, das der KO-Schnittkulturen $49,7 \pm 12,5$ Tage.

4.3 Untersuchung individueller MF-Synapsen

4.3.1 Funktionelle Heterogenität individueller MF-Synapsen

Die Eigenschaften der synaptischen Transmission wurde anhand einer Serie aus 20- Doppelpulsstimulationen (PPS, ISI = 40 ms) des präsynaptischen Boutons untersucht. Vorerst wurden nur die Antworten auf den jeweils ersten Puls der PPS betrachtet. Sie spiegeln den aktuellen Zustand der einzelnen Synapse wieder. Am Beispiel von drei der insgesamt 26 WT-Synapsen (Synapse: 3, 10, 23), wurden zur Illustration die Parameter der maximalen Steigung des EPSPs gegen die Amplituden der korrespondierenden Ca^{2+} aufgetragen (Abbildung 24).

Ein erstes Ergebnis dieser Untersuchung war, dass die Stimulation eines individuellen MF-Boutons bereits sehr heterogene Antworten in der postsynaptischen MCs hervorrufen kann. Die breite Streuung der Antworten innerhalb einer Synapse könnte auf eine Variabilität der Glutamatfreisetzung des präsynaptischen Boutons hinweisen.

Auffällig war zudem, dass die einzelnen Synapsen untereinander sehr heterogene Zustände aufwiesen. Einerseits konnte beobachtet werden, dass die 20 Stimulationen ausschließlich unterschwellige EPSP-Antworten hervorriefen. Andererseits war es häufig der Fall, dass es bei einigen Stimulationen direkt zur überschwelligen AP-Generierung in der postsynaptischen MC kam (Detonatorsynapse, siehe Synapse 10 und 23). Die zusätzliche postsynaptische Depolarisation durch das evozierte AP löste gleichzeitig einen höheren NMDAR-vermittelten Ca^{2+} -Influx aus, weshalb die Steigungen der Regressionsgeraden in Abhängigkeit einer über- bzw. unterschwelligen Antwort sehr stark variierten. Zur Veranschaulichung des supralinearen Zusammenhangs der Ca^{2+} -Antwort wurden bei gemischten Antworten die Einzelantworten in zwei Klassen aufgeteilt und getrennt ausgewertet (getrennte Regressionen bei Synapse 10). Die Gegenüberstellung der drei Synapsen hebt eindrucksvoll hervor, dass individuelle MF-MC-Synapsen offensichtlich in funktionell unterschiedlichen Zuständen angetroffen werden konnten.

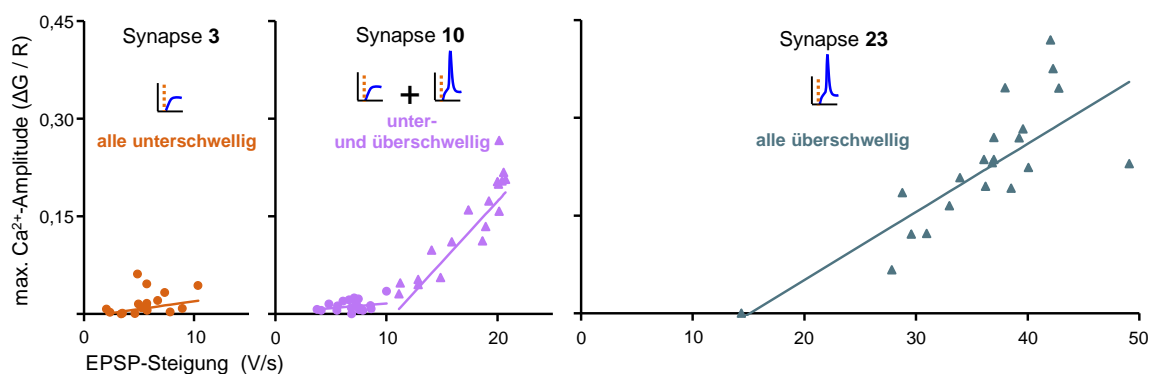


Abbildung 24: Funktionelle Heterogenität individueller MF-MC-Synapsen. EPSP- und Ca^{2+} -Antworten von drei repräsentativen Synapsen (#3, #10, #23). Ausgewertet wurde jeweils nur die Antwort auf den ersten Puls der Doppelpulsstimulation. Die evozierten EPSPs waren entweder unterschwellig (●) oder überschwellig (▲). Die EPSP-Steigung streute innerhalb einer Synapse sehr stark. Die breite Streuung weist auf eine präsynaptische Variabilität in der Glutamatfreisetzung hin. Bei der Darstellung handelt es sich nicht um den zeitlichen Verlauf der Stimulation. Die Ca^{2+} -Amplitude war positiv mit der EPSP-Steigung korreliert (illustriert durch die Regressionsgeraden). Für die gemischten Antworten der Synapse 10 wurden auf Grund des supralinearen Ca^{2+} -Anstiegs im Fall überschwelliger EPSPs jeweils getrennte Regressionen für beide Antwortklassen berechnet.

Die entsprechenden Ergebnisse der insgesamt 26 WT-Synapsen bestätigte das Bild der breiten Heterogenität unterschiedlicher synaptischer Zustände nochmals deutlich, was mit Hilfe der Darstellung des Medians der Einzelantworten jeder einzelnen Synapse illustriert wurde (Abbildung 25 A und Anhang 6.3, Seite 108 ff.).

Die vorgenommene Kategorisierung der Synapsen erfolgte anhand ihrer Antwortklassen in unterschwellige Synapsen (15 %), in gemischte Synapsen mit unter- und überschwelligen Antworten (58 %), sowie in rein überschwellige Synapsen (27 %). Die Analyse der EPSP-Steigung mit den korrespondierenden Ca^{2+} -Amplituden ergab in 24 von 26 Synapsen eine positive Korrelation. Die EPSP-Steigung korrelierte in 25 von 26 WT-Synapsen nicht mit der Sequenz der Wiederholungen. Gleiches galt für die Ca^{2+} -Amplituden in 24 von 26 WT-Synapsen (siehe Anhang 6.4, Seite 110). Das Auftreten von Kurzzeitplastizitätseffekten durch die wiederholten PPS konnte durch die großzügig gewählten Intervalle von 15 s zwischen den Wiederholungen offensichtlich vermieden werden.

Die Verteilung zeigt, dass der Beitrag der AMPAR- bzw. der NMDAR-Komponente je nach Synapse stark variiert und sich daraus für die MF-Synapsen ein breites Kontinuum an möglichen Zuständen ergibt (Abbildung 25 A, unten links → oben rechts), welches die biologische Variabilität der MF-MC Synapsen widerspiegelt.

Die gleiche Analyse ergab bei den Synaptopodin-defizienten MF-Synapsen eine deutlich homogenere Verteilung der synaptischen Zustände mit einer Häufung von im Vergleich zum

WT „schwachen“ Synapsen. Die Gruppe der unterschwelligen (25 %) und gemischten Synapsen (50 %) war in der Gruppe der KO-Synapsen deutlich stärker vertreten (Abbildung 25 B). Nur 15 % der untersuchten KO-Synapsen antworteten auf alle Bouton-Stimulationen überschwellig.

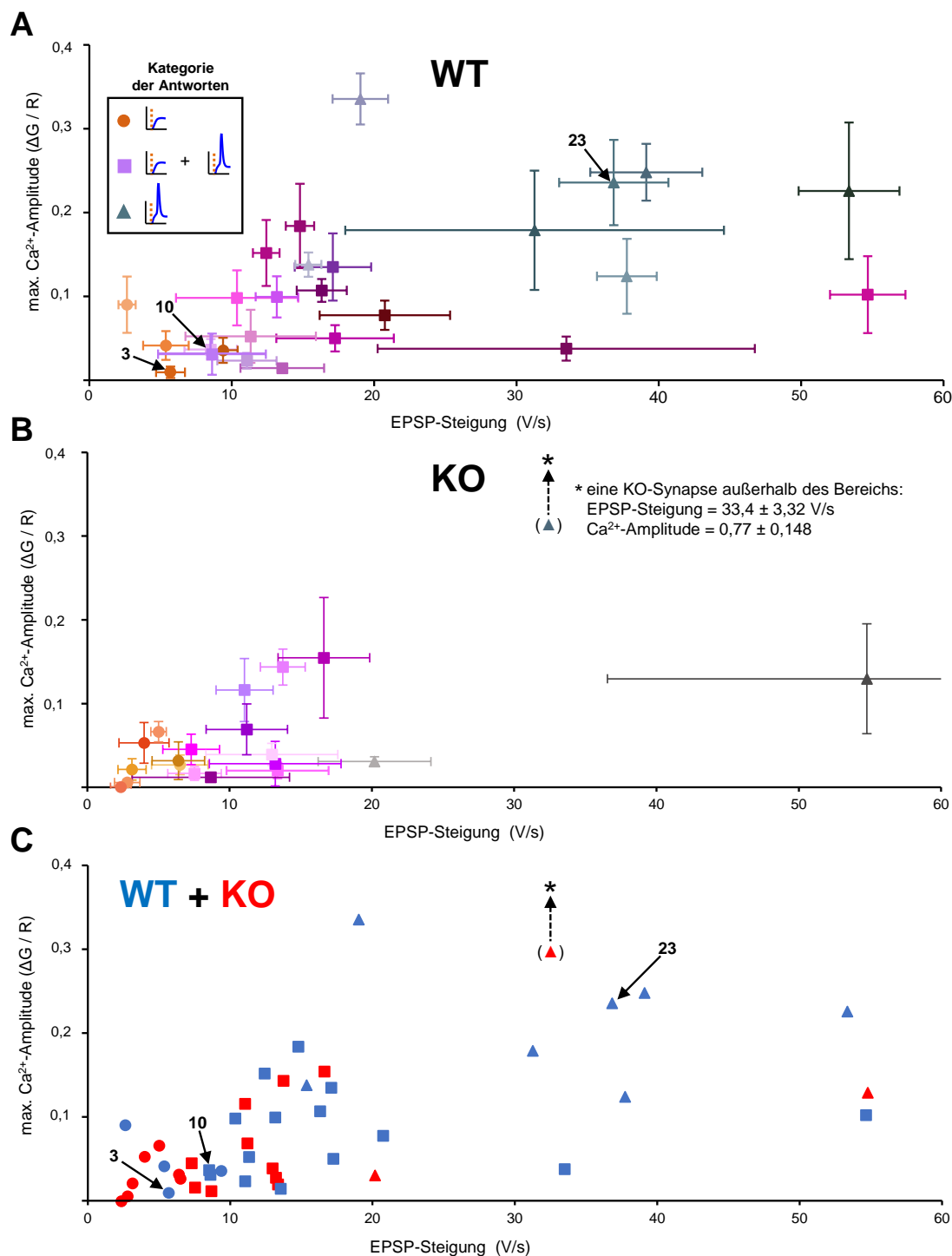


Abbildung 25: Heterogenität von WT- und Synaptopodin-defizienten- MF-MC-Synapsen. **A** Mediane der Einzelantworten auf den ersten Stimulationspuls aller 26 WT-Synapsen. Fehlerbalken repräsentieren den Median der absoluten Abweichungen (median absolute deviation)

from the median, MAD). Der Einschub zeigt die Kategorien der untersuchten Synapsen mit Farbcodierung: alle Antworten unerschwellig (Orangetöne, ●), gemischte Antworten (Magentatöne, ■), alle Antworten überschwellig (Grautöne, ▲). Exemplarisch wurden die Synapsen 3, 10 und 23 markiert (Abbildung 24). Die Gruppe der WT-Synapsen erstreckt sich über ein breites Kontinuum der Antwortstärken, wobei 85 % der untersuchten Synapsen gemischte oder rein überschwellige Antworten zeigten. **B** Mediane \pm MAD der Einzelantworten aller 20 KO-Synapsen. Die Ca^{2+} -Amplituden einer KO-Synapse lagen außerhalb des dargestellten Bereichs (*). Nur insgesamt drei der 20 Synapsen zeigen rein überschwellige Antworten (15 %). **C** Vergleich aller untersuchten MF-MC-Synapsen. Zur Anschaulichkeit sind nur die Mediane ohne Fehlerbalken gezeigt, binäre Farbcodierung nach Genotyp: WT- bzw. KO-Synapsen. Die Verteilung der KO-Gruppe ist deutlich homogener. Stark potenzierte Synapsen fehlen in der KO-Gruppe fast vollständig.

4.3.2 Repräsentiert die Heterogenität der individuellen MF-Synapsen wirklich die Variabilität zwischen Synapsen?

Ein möglicher Grund für die Heterogenität zwischen den einzelnen MF-Synapsen auf MCs könnte auch Ausdruck der Variabilität der unterschiedlichen Schnittkulturen, bzw. der einzelnen MCs sein. Um diese Unsicherheit auszuräumen, haben wir mit Hilfe der iPot-Methode versucht, mehrere MF-Boutons an unterschiedlichen Spines der gleichen MC zu stimulieren ($n = 3$). Die Versuchsanordnung eines dieser Experimente ist exemplarisch dargestellt (Abbildung 26 A, B). Die abgeleiteten EPSP-Antworten auf die PPS an Spine 1 waren alle unerschwellig. Die korrespondierenden Ca^{2+} -Antworten waren von moderater Amplitude. Die PPF des präsynaptischen Boutons zu Spine 1 war kaum ausgeprägt (siehe Abbildung 26 C, blaue Linie: Mediankurve). Das konsekutive Experiment an der zweiten Synapse der gleichen MC evozierte deutlich stärkere Antworten. Auf den ersten Stimulus folgte bereits bei 20 % der Antworten ein postsynaptisches Aktionspotential und auf 85 % beim Zweiten. Die korrespondierenden CaTs waren vergleichsweise groß (siehe Abbildung 26 D). Die PPF der beiden Synapsen war offensichtlich unterschiedlich.

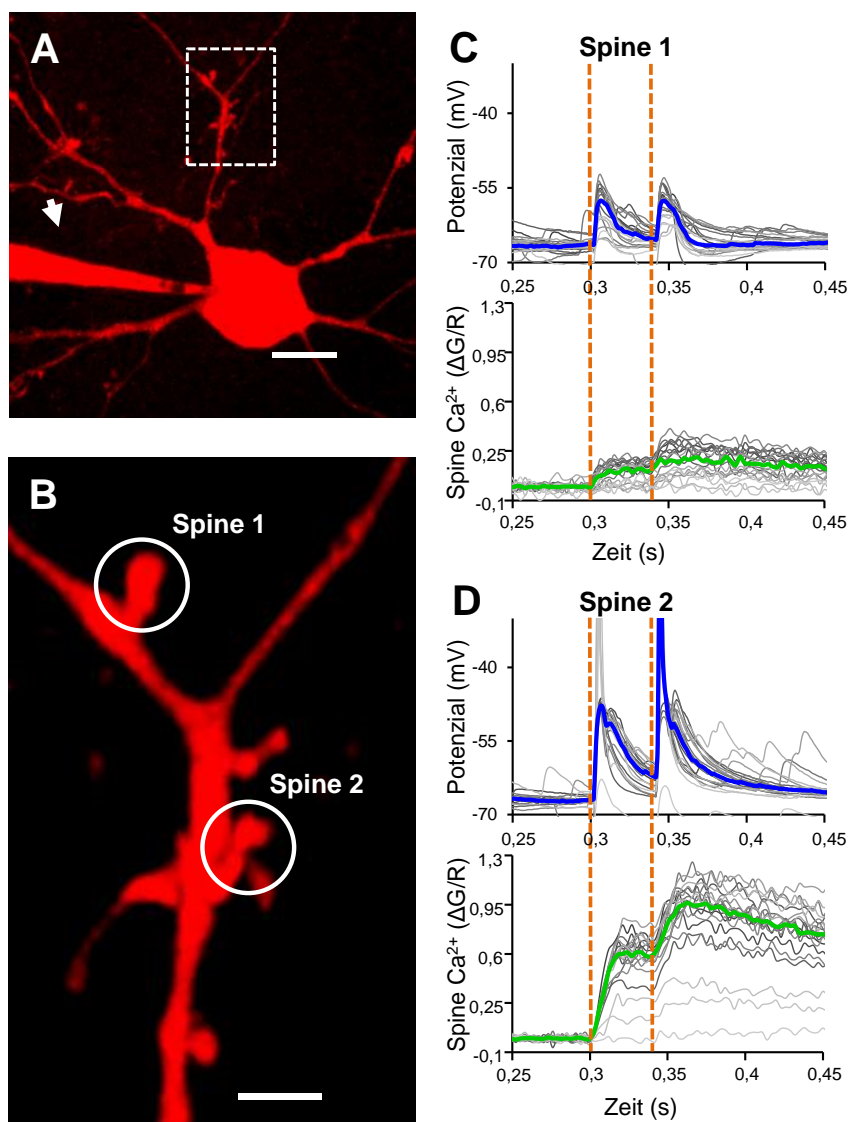


Abbildung 26: Konsekutives iPot Experiment an zwei Synapsen der gleichen Zelle. **A** Eine gepatchte MC wurde mit Alexa 594 (rot) und dem Ca^{2+} -Indikator Fluo-4FF gefüllt. Der Ausschnitt markiert den untersuchten Dendritenabschnitt (Maßstabsbalken: $20\ \mu\text{m}$). **B** Vergrößerter Bildausschnitt aus A (Maßstabsbalken: $5\ \mu\text{m}$). Mit Hilfe der Stimulationspipette wurde zuerst der präsynaptische MF-Bouton zu Spine 1 und anschließend der zu Spine 2 gepatcht und jeweils stimuliert. **C,D** Aufgezeichnete EPSPs und CaTs an Spine 1 (C) und Spine 2 (D) in Antwort auf 20 PPSs (orange Linie: Zeitpunkt der Bouton-Stimulation; blaue und grüne Kurven: Mediane aller Wiederholungen).

4.3.3 Potenzierung individueller MF-Synapsen

In jeweils 10 Synapsen beider Genotypen konnte der Zustand der Synapse 30 min nach Anwendung des Induktionsprotokolls erfasst werden. Aus den erfolgreichen iPot Experimenten (10 WT, 10 KO) Dieser Datensatz führte zu folgenden Ergebnissen.

Der Vergleich des Ausgangszustandes der einzelnen Synapsen in Antwort auf den ersten Stimulationspuls mit dem Zustand nach der Potenzierung ergab bei 6 von 10 WT-Synapsen eine erhöhte EPSP-Steigung. Eine Synapse zeigte kaum Veränderung, wohingegen die Spannungsantworten der restlichen drei WT-Synapsen depotenziert wurden (siehe Abbildung 27 A). Erhöhte Ca^{2+} -Antworten nach der Potenzierung zeigten nur 4 von 10 WT-Synapsen.

Die Spannungsantworten der KO-Synapsen zeigten ein ähnliches Bild. Nach der Potenzierung waren sie in 5 von 10 Synapsen erhöht, eine Synapse zeigte keine Änderung, 4 hingegen eine Depotenzierung (siehe Abbildung 27 B). Vergleichbar zeigten nur 3 von 10 KO-Synapsen erhöhte Ca^{2+} -Antworten. Die Potenzierung individueller MF-Synapsen (WT + KO) führte nicht zu einer gleichförmigen Veränderung der synaptischen Stärke, sondern induzierte im Gegenteil unerwartet heterogene Plastizitätsformen mit teilweise gegenläufigen Richtungen (siehe Abbildung 27 C).

Mehr Aufschluss ergab der Vergleich der Antwortkategorien der untersuchten Synapsen. Hier wurde in mehreren Fällen ein Wechsel der Kategorie beobachtet, so dass beispielsweise eine rein unterschwellige Synapse nun gemischte Antworten aufwies, oder eine gemischte Synapse nur noch überschwellige Antworten zeigte. In der WT-Gruppe wechselten insgesamt 4 von 10 Synapsen ihre Kategorie. Darunter waren drei gemischte Synapsen, welche nach der Potenzierung zu 100 % Detonatorantworten aufwiesen. In der KO-Gruppe wechselte hingegen nur eine Synapse ihre Kategorie von rein unterschwelligen auf gemischte Antworten. Allgemein wurde beobachtet, dass vormals unterschwellige und gemischte Synapsen eher zu einer Potenzierung ihrer Spannungs- und Ca^{2+} -Antworten neigten, wohingegen reine Detonatorsynapsen z.T. sogar depotenziert wurden (siehe Abbildung 27 A, B). Einer Depotenzierung der Spannungs- und/oder Ca^{2+} -Antworten folgte jedoch nie ein Wechsel in eine schwächere Antwortkategorie.

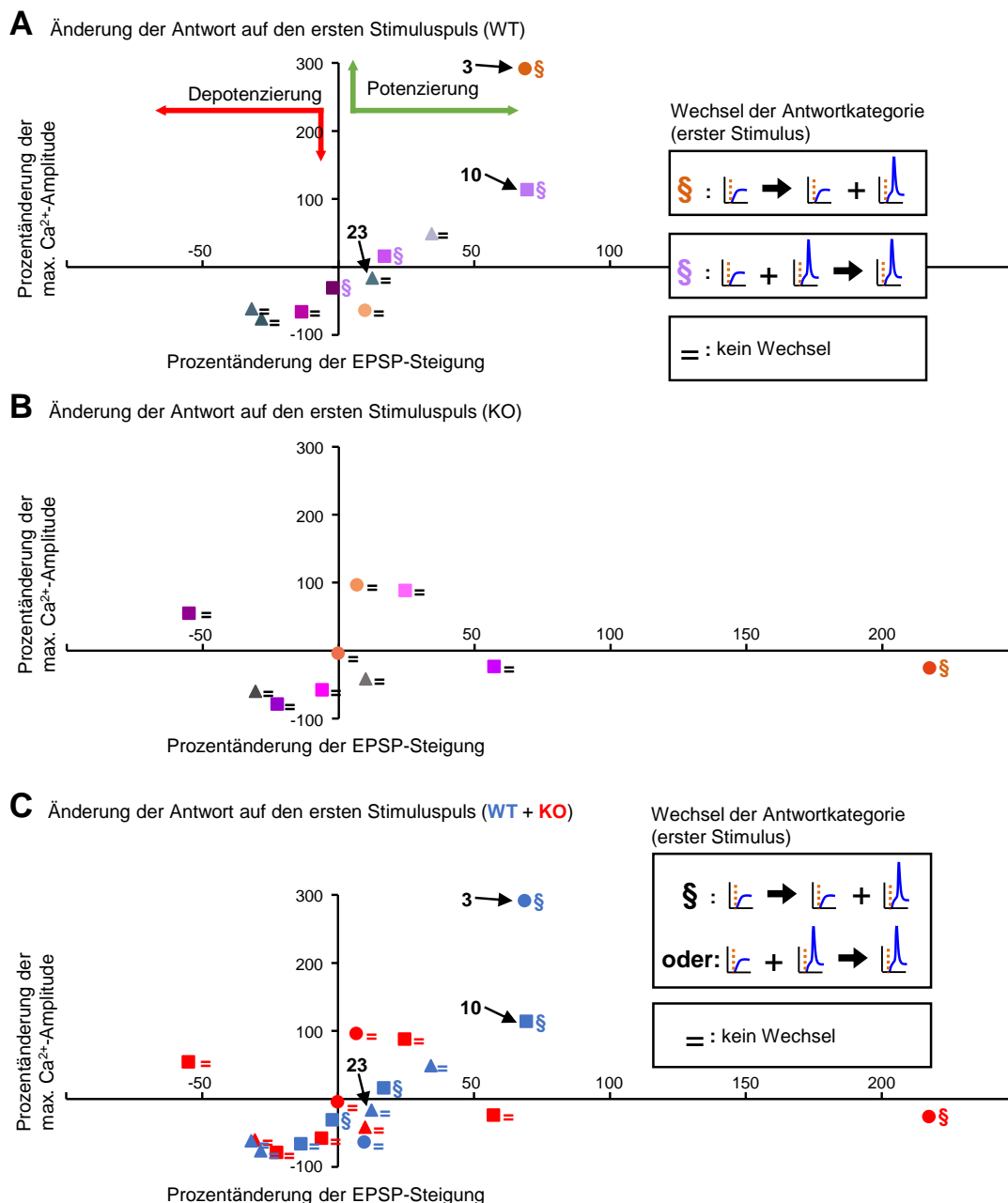


Abbildung 27: Heterogene Plastizität individueller MF-Synapsen. **A** Prozentuale Veränderung der EPSP-Steigung, sowie der Ca²⁺-Antworten in Antwort auf den ersten Stimulationspuls in 10 WT-Synapsen nach Potenzierung. Ausgangszustand und Identität jeder einzelnen Synapse entspricht der Symbol- und Farbcodierung in Abbildung 25. Der Einschub zeigt die Symbol- und Farbcodierung entsprechend des Wechsels der Antwortkategorie (§), bzw. keinen Wechsel (=). Die Synapsen 3, 10 und 23 (Abbildung 24) sind markiert. Unterschwellige und gemischte WT-Synapsen tendierten eher zum Wechsel in die nächste höhere Antwortkategorie. Starke Synapsen behielten trotz quantitativer Depotenzierung der Spannungs- und Ca²⁺-Antworten immer ihre Ausgangskategorie. **B** Ausgang der Potenzierung in den 10 KO-Synapsen. Trotz der erhöhten EPSP-Steigung in 5 von 10 Synapsen wechselte nur eine Synapse ihre Antwortkategorie von rein

unterschwellig auf gemischt unter- und überschwellig. **C** Gemeinsame Darstellung aller potenzierten **WT**- und **KO**-Synapsen aus A und B (binäre Farbkodierung).

4.3.4 Die Heterogenität der synaptischen Zustände spiegelt die Heterogenität der Glutamatfreisetzung an den präsynaptischen Boutons wieder

In Antwort auf repetitive Stimulationen erhöht sich Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit (release probability, p_R) des MF-Boutons (Nicoll und Schmitz, 2005). Die Analyse der PPR sollte dazu dienen, die initiale p_R des präsynaptischen Boutons einzuschätzen. Eine hohe PPR spricht für eine geringe p_R und umgekehrt. Innerhalb der WT- und KO-Gruppen zeigte sich dabei eine heterogene Verteilung der PPR (Abbildung 28 A - C). In den meisten Fällen wiesen MF-Boutons an Synapsen, die auf den ersten Stimulationspuls eher schwache bzw. moderate EPSP-Antworten zeigten, eine starke Doppelpuls-Faszilitierung (PPF) auf. Entsprechend war die PPF der MF-Boutons, welche initial schon gemischte oder nur überschwellige EPSPs auslösten i. d. R. gering, da die maximale p_R dieser MF-Boutons bereits ausgeschöpft war (siehe Abbildung 28 A, B). Interessanterweise verhielten sich in einigen Synapsen die PPRs der EPSP-Steigung nicht gleichsinnig mit den PPRs der Ca^{2+} -Antworten. Eine heterogene Gruppe von insgesamt 6 WT-Synapsen sowie eine KO-Synapse zeigen bei Depression (PPD) der Spannungsantworten gleichzeitig eine PPF der Ca^{2+} -Antworten.

Dies könnte neben der Menge an freigesetztem Glutamat auf weitere an der postsynaptischen Ca^{2+} -Dynamik beteiligte Faktoren zurückzuführen sein. Die Heterogenität der initialen p_R der untersuchten MF-Boutons machte eine quantitative Analyse der PPRs zum Vergleich der Genotypen fehleranfällig und wurde deshalb nicht weiter untersucht (zusätzliche Experimente werden benötigt).

4.3.5 Einfluss der Potenzierung auf die Heterogenität der Glutamatfreisetzung an den präsynaptischen Boutons

In WT-Synapsen zeigte sich bei der Änderung der PPR der EPSP-Steigung nach der Potenzierung eine klare Tendenz zu einer schwächeren PPF der EPSPs, was auf eine Steigerung der initialen p_R zurückzuführen war (stärkere EPSP-Antwort auf den jeweils ersten Puls der PPS nach Potenzierung). Diese Synapsen wiesen demnach eine MF-typische präsynaptische LTP-Komponente auf (siehe Abbildung 28 D). Die Synapsen 3, 10 und 23 spiegelten das Verhältnis der präsynaptischen Potenzierung anschaulich wieder. Die initial geringe p_R des schwachen MF-Boutons der Synapse 3 (alle EPSP-Antworten unterschwellig) wurde gegenüber den stärkeren Boutons der Synapsen 10 und 23, im Verhältnis am

effektivsten potenziert (siehe Abbildung 28 A, D und vgl. Abbildung 27 A). In der KO-Gruppe trat der Befund einer schwächeren PPF der Spannungsantwort nur in der Hälfte der untersuchten Synapsen auf. Fünf der insgesamt 10 KO-Synapsen ließen hingegen eine Steigerung der PPF erkennen (siehe Abbildung 28 E, F), offenbar hervorgerufen durch präsynaptisches LTD.

Die Änderung der PPRs der Ca^{2+} -Antworten verhielt sich in den WT-Synapsen z.T. gegenläufig zu den PPRs der Spannungsantworten (siehe Abbildung 28 A), was sich zum Teil auf die Steigerung der Rate überschwelliger EPSP-Antworten (supralinearer Ca^{2+} -Anstieg) bei gleichzeitig erhöhter p_R der MF-Boutons zurückführen ließ. Entsprechend war in 4 von 10 der KO-Synapsen eine PPF der EPSP-Antworten (präsynaptisches LTD) gleichsinnig von einer erhöhten PPF der Ca^{2+} -Antworten begleitet, da sich hier der Anteil überschwelliger Ereignisse nicht wesentlich änderte (Abbildung 28 E).

Die Analyse der Veränderung der PPR der EPSP-Steigung und der Ca^{2+} -Antworten nach Potenzierung ermöglichte die Identifikation von prä- und postsynaptischen Plastizitätseffekten an individuellen MF-Synapsen.

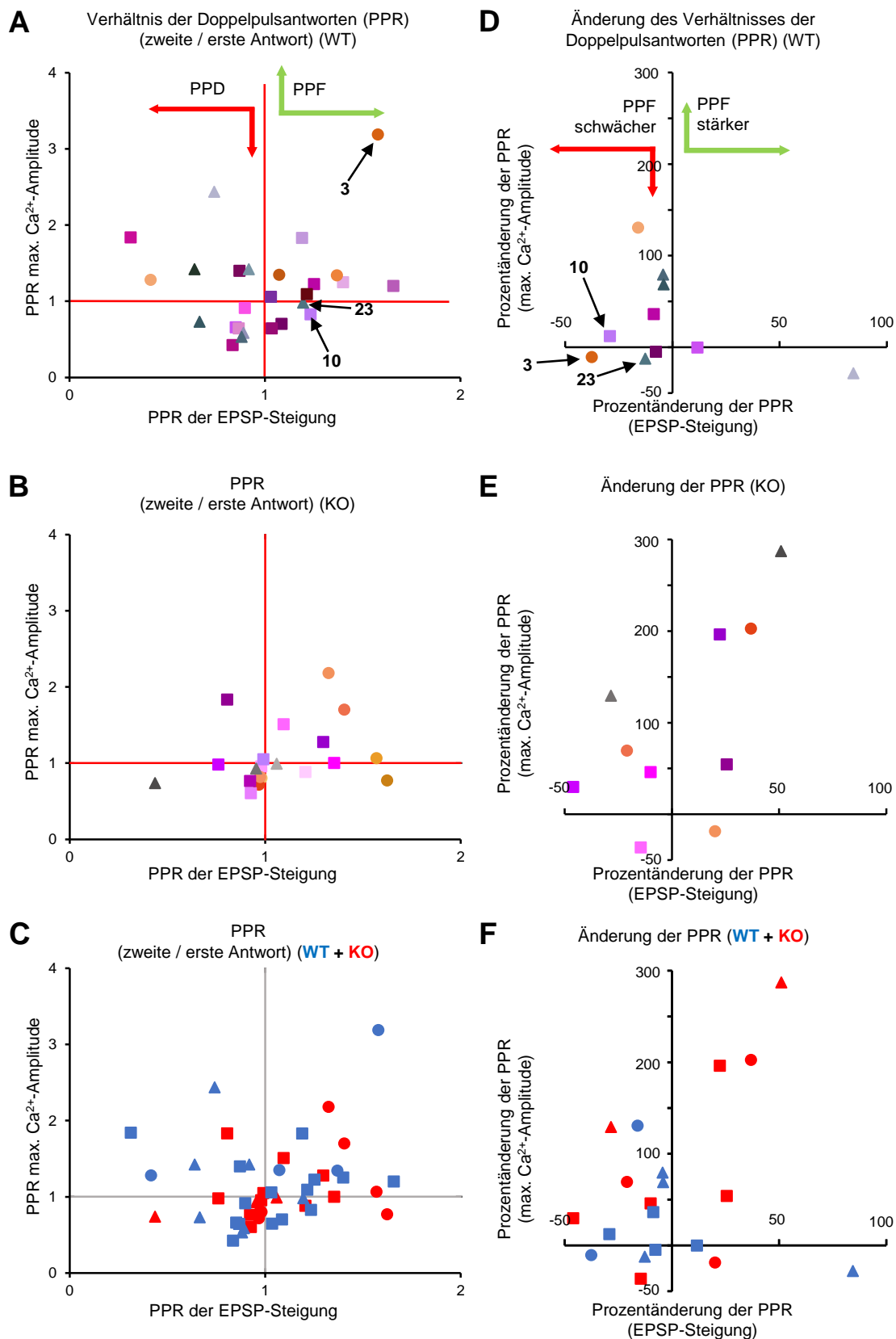


Abbildung 28: Individuelle MF-Synapsen zeigen heterogene Doppelpuls-Faszilitierung (PPF) (A-C). Die Potenzierung induziert unterschiedliche prä- und postsynaptische Effekte in WT- und KO-Synapsen (D-F). **A** Verhältnis der Doppelpulsantworten (PPR) der EPSP-Steigung aufgetragen

gegen das PPR der Ca^{2+} -Antwort aller 26 WT-Synapsen. Zur besseren Anschaulichkeit wurde jeweils der Median aller Einzelantworten pro Synapse dargestellt. Rote Linien markieren eine PPR von 1. PPR-Werte > 1 entsprechen einer Doppelpuls-Faszilitierung (PPF); PPR-Werte < 1 entsprechen einer Doppelpuls-Depression (PPD). **B** PPRs der 20 KO-Synapsen. **C** PPRs aller WT- und KO-Synapsen. **D** Prozentänderung der PPRs der EPSP-Steigung und der Ca^{2+} -Antworten in den WT-Synapsen 30 min nach der Potenzierung. Schwächere PPF der EPSP-Antworten weist auf einen Anstieg der p_R des MF-Boutons nach der Potenzierung hin. Eine erhöhte PPF der Ca^{2+} -Antworten entspricht der Zunahme von überschwelligeren EPSPs in Antwort auf den zweiten Stimulationspuls der PPS. **E** Prozentänderung der PPRs in den KO-Synapsen nach der Potenzierung. **F** Prozentänderung der PPRs in den WT- und KO-Synapsen nach der Potenzierung.

5 Diskussion

5.1 Teil I: Welche Rolle spielen der Spine Apparat und der CiCR an der MF-Synapse?

5.1.1 Überblick

Die genaue Funktion der Spine-Apparat-Organelle in den Spines telencephalischer Neurone bei Säugern ist bis heute enigmatisch. Die lamellenartige Konformation des Spine-Apparats stellt gegenüber den sonst in Spines zu findenden einfachen ER-Zisternen eine strukturell komplexere Form des ERs dar. Ein Ziel der vorliegenden Studie war es, eine mechanistische Verbindung zwischen dem Spine-Apparat und seiner Rolle bei der Orchestrierung postsynaptischer Ca^{2+} -Antworten zu finden. Ausgangspunkt dieser Arbeit war eine vorangegangene Studie unserer Arbeitsgruppe zur Rolle des Spine-Apparats als Ca^{2+} -Speicher während der synaptischen Transmission an der hippocampalen MF-Synapse (Dissertation Tippmann, 2014). Der darin gewählte methodische Ansatz umfasste eine Kombination der Whole-Cell Patch-Clamp-Ableitung hippocampaler MCs in entorhino-hippokampalen Schnittkulturen mit der Zwei-Photonen Ca^{2+} -Messung im Einzelspine und der gleichzeitigen Stimulation der MF-Synapse mit Hilfe der optischen Glutamatfreisetzung (Zwei-Photonen-Glutamat-Uncaging). Die Analyse der evozierten Spannungs- und Ca^{2+} -Antworten von WT- und Synaptopodin-defizienten Synapsen konnte eine Beteiligung des Spine-Apparats an der Kinetik der postsynaptischen Ca^{2+} -Antwort bei starker Aktivierung zeigen (gepaarte prä- und postsynaptische Stimulation: 24 Glutamatpulse + 24 bAPs bei 25 Hz, $\Delta t = +10$ ms). Dabei fielen die Amplituden der CaTs in Synaptopodin-KO Spines um etwa 25 % niedriger aus als in WT Spines. Bei schwacher synaptischer Stimulation (Glutamat-Einzelpulse) zeigte sich hingegen kein Unterschied in den Amplituden und Steigungen sowohl der EPSPs als auch der CaTs. Dies weist darauf hin, dass bei großen CaTs zusätzlich zur NMDAR-Aktivierung der CiCR beiträgt, der in Spines ohne Spine-Apparat weniger effizient ist. A. Tippmann hat in pharmakologischen Kontrollexperimenten bestätigt, dass an der MF-Synapse hauptsächlich der NMDAR-vermittelte Ca^{2+} -Influx zur postsynaptischen Ca^{2+} -Antwort auf einzelne Uncaging-Pulse beiträgt. Dieser Befund entspricht der Situation an der Schaffer Kollateral-CA1-Synapse (Mainen et al., 1999; Kovalchuk et al., 2000; Sabatini et al., 2002; Nimchinsky et al., 2004). In einer weiter zurückliegende Studie unserer Arbeitsgruppe wurde der CiCR an der MF-Synapse nicht durch synaptische Stimulation, sondern durch die

bAP-vermittelte Aktivierung der VGCCs ausgelöst (Drakew et al., 2007). Auch hier fanden sich in Spines von Synaptopodin-KO Spines kleinere CaTs.

Unabhängig von der Frage nach der Rolle des Spine-Apparats wurde in einer Publikation entgegen der oben zitierten Literatur der CiCR als Hauptquelle des postsynaptischen Ca^{2+} -Influx in Spines identifiziert (Emptage et al., 1999). Unter niederfrequenter synaptischer Stimulation wurde dabei in Spines von CA1- und CA3-Pyramidenzellen beobachtet, dass die Aktivierung des CiCRs dort auf dem NMDAR-vermittelten Ca^{2+} -Influx beruht. Unter Blockade des CiCR mit Hilfe von Cyclopiazonsäure (SERCA-Blocker) bzw. Ryanodin waren in besagter Studie die postsynaptischen Ca^{2+} -Antworten vollkommen unterdrückt. Daraus schlossen die Autoren auf einen geringen Beitrag der NMDAR-Komponente an der Gesamtantwort. In einer Folgestudie derselben Gruppe konnte dies an der MF-CA3 Synapse jedoch nicht bestätigt werden. Die Autoren konstatierten darin einen negativen Befund für den CiCR als Hauptquelle, da sie unter Ryanodin-Blockade keinen hemmenden Effekt mehr feststellen konnten (Reid et al., 2001). In ihrer Schlussfolgerung verweisen sie auf die AMPAR-vermittelte Aktivierung der VGCCs als Hauptquelle. In der Reid-Studie wurde jedoch ein hochaffiner Indikator gewählt (Oregon Green 488 BAPTA-1), was aufgrund der zu erwartenden Sättigung des Indikators bei großen CaTs zu den widersprüchlichen Befunden CiCR beigetragen haben könnte.

5.1.2 CiCR an der MF-Synapse

In der vorliegenden Studie wurde der CiCR an der MF-Synapse durch die bAP-vermittelte Aktivierung der VGCCs ausgelöst (16 bAPs bei 100 Hz). Ein Vorteil dieses Ansatzes war die Unabhängigkeit der gemessenen CaTs von einer hochgradig variablen Transmitterfreisetzung des präsynaptischen Boutons. Das Verfahren der robusten Zwei-Photonen- Ca^{2+} -Messung nach Yasuda et al., 2004, gewährleistete ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis und wurde durch die extrem hohe Zeitauflösung des Punkt-Scan-Verfahrens (400 ns \sim 2,5 MHz) komplementiert. Zusätzlich wählten wir einen synthetischen Ca^{2+} -Indikator mit niedriger Affinität (Fluo-4FF), um mögliche Sättigungseffekte zu vermeiden. Außerdem ermöglichte das Experimentdesign ein paariges Testverfahren, das die Untersuchung derselben Spines und Dendriten jeweils vor und nach der Blockade des CiCR vorsah und damit die Varianz innerhalb der Vergleichsgruppen minimierte. Die Analyse der postsynaptischen Ca^{2+} -Antworten von WT-Spines vor und nach Zugabe von Ryanodin (in hemmender Konzentration, 40 μM ; Fill und Coronado, 1988; McPherson et al., 1991) ergab eine Reduktion der Maximalamplituden um im Mittel -31 % (c_{max} Spine, Quotient $\text{WT}^{\text{Rya}} / \text{WT}^{\text{ACSF}}$, Mittelwert

\pm SD: $0,6998 \pm 0,1030$; P-Wert: $0,00637$ (*). Damit wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass der CiCR an der MF-MC-Synapse eine signifikante Rolle spielt.

5.1.3 Einfluss des Spine-Apparats auf die postsynaptische Ca^{2+} -Dynamik

Die Auswertung der Ca^{2+} -Kinetik in der Ausgangslage belegte zudem, dass die Spines Synaptopodin-defizienter MCs im direkten Vergleich zum WT im Mittel eine um -24% geringere Amplitude (*), sowie einen um -35% langsameren Ca^{2+} -Influx (*) und eine um +30% längere Extrusionskinetik aufwiesen (*).

MF-Spines von WT-MCs, die regelmäßig über einen Spine-Apparat verfügen, zeigten nur im Ausgangszustand größere Ca^{2+} gegenüber den Spine-Apparat-losen KO-Spines. Die Blockade des CiCR mit Hilfe von Ryanodin [40 μM] hob die Unterschiede in der Ca^{2+} -Kinetik in den Spines beider Genotypen vollständig auf. Die initial zwischen den Genotypen nicht zu unterscheidende Ca^{2+} -Antwort in den Dendriten war durch die Blockade des CiCR in beiden Gruppen gleichermaßen reduziert. Dieser Befund war wichtig, da die Lokalisation der Spine-Apparat-Organellen ausschließlich auf Spines beschränkt ist und deren Existenz, bzw. Abwesenheit, keinen Effekt in den Dendriten hervorrufen sollte. Damit konnte bestätigt werden, dass der Spine-Apparat einen signifikanten Effekt auf die postsynaptische Ca^{2+} -Dynamik an der hippocampalen MF-Synapse hat. Bezeichnenderweise erreichten die Ca^{2+} -Antworten von WT-Spines unter Ryanodin-Blockade gerade das Ausgangsniveau von KO-Spines, was zusätzlich auf die RyR-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus den internen Speichern des ER hinweist.

Unsere Ergebnisse liefern somit erstmals Belege dafür, dass an der hippocampalen MF-Synapse die Funktion des Spine-Apparats mit dem Mechanismus des CiCR verknüpft ist.

5.1.4 Nebenbefunde

Wir konnten trotz der geringen Maximalamplituden in KO-Spines einen hemmenden Effekt von Ryanodin auf die Ca^{2+} -Kinetik nachweisen. Die Reduktion der Maximalamplituden belief sich im Mittel auf -19 % (*). Dieser Befund lässt sich anhand der RyR-Ausstattung der einfachen ER-Zisternen in Spines der KO-Zellen erklären. Bei Synaptopodin-defizienten Tieren findet sich kein genereller Verlust der ER-Zisternen in Spines. Es fehlt nur die komplexe Ausprägung des ER in Form des Spine-Apparats ohne weitere Veränderungen der Ultrastruktur.

Interessanterweise waren die Extrusionsraten von KO-Spines im Ausgangszustand bereits um 30 % verlangsamt. Dieser Befund deutet auf eine geringere Ausstattung der ER-Zisternen mit SERCA-Pumpen hin, was auf Grund des ungünstigeren Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses des ERs in KO-Spines analog zur verminderten RyR-Ausstattung zu erwarten wäre. Der Spine-Apparat, bzw. das Aktin-assoziierte Protein Synaptopodin übernimmt vielleicht auch eine Funktion bei der räumlichen Organisation postsynaptischer Ca^{2+} -Mikrodomänen in den MF-Excrescenzen. Während der Maturierung dieser komplexen Synapse könnte die Spine-Apparat-Organelle an der zielgerichteten Ausrichtung der ER-Membran-ständigen RyRs auf die primären Ca^{2+} -Quellen in der Plasmamembran (NMDARs, VGCCs) verantwortlich sein, um somit eine räumlich differenzierte Organisation der Ca^{2+} -Kinetik auf kleinstem Raum zu ermöglichen (Spinevolumen: ~ 1 Femtoliter). Das eröffnete auf der Ebene des Einzelspines zusätzlich zur zeitlichen Modulation der Ca^{2+} -Signale (Frequenzkodierung), die Möglichkeit einer parallelen Signalverarbeitung der unterschiedlichen Ca^{2+} -Quellen (räumliche Signalkodierung, siehe dazu Berridge, 2006).

Eine weitere Beobachtung war die robuste Reduktion der Ca^{2+} -Extrusion nach Ryanodingabe. Dieser Effekt trat an den Dendriten am stärksten auf, wobei sich die Zeitkonstanten der Extrusion in WT-Dendriten um fast 100 % und KO-Dendriten um 72 % verlangsamt ($\tau_{\text{Extrusion Dendrit WT}^{\text{ACSF}}/\text{WT}^{\text{Rya}}$: $2,0192 \pm 0,6972$; P-Wert: 0,00637 (*); $\tau_{\text{Extrusion Dendrit, KO}^{\text{Rya}} / \text{KO}^{\text{ACSF}}$: $1,7204 \pm 0,3599$; P-Wert: 0,01137 (*)). Diese Reduktion geht über das infolge der geringeren Maximalamplituden zu erwartende Maß hinaus. Der Befund deutete auf einen Nebeneffekt von Ryanodin hin, der bereits bekannt, jedoch bis heute nicht aufgeklärt ist (Shmigol et al., 1995; Berridge, 1998). Das Alkaloid Ryanodin weist in tierischen Zellen einen physiologischen Januseffekt auf, der konzentrationsabhängig einerseits RyR-aktivierend wirkt ($< 10 \mu\text{M}$; Fill und Coronado, 1988), andererseits die RyRs zuverlässig blockiert ($> 10 \mu\text{M}$; McPherson et al., 1991; Review: Ozawa, 2010). Im RyR2 konnte ein Ca^{2+} -sensibles Motiv im Porenbereich des Kanals identifiziert werden, das auf der Seite des ER-Lumens verortet ist und dessen Struktur bei allen RyR- und IP3R-Isoformen konserviert ist (Chen et al., 2014). Der beobachtete Effekt der verlangsamt Extrusion beruht möglicherweise auf einer Kopplung des RyR mit der SERCA-Aktivität, was funktionell bisher nur für IP₃Rs bestätigt werden konnte, aber auf Grund der z.T. homologen Sequenzen auch auf den RyR zutreffen könnte (Gordienko und Bolton, 2002).

5.1.5 Diskussion alternativer Methoden zur Untersuchung des CiCR

Andere Studien an dissoziierten Neuronen kamen bei der Untersuchung des CiCR in Spines auf ähnliche Ergebnisse, wobei in diesen Experimenten eine Depletionsstrategie der internen Ca^{2+} -Speicher unter Verwendung von Thapsigargin angewendet wurde (Korkotian et al., 2014). Thapsigargin ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor der membrangebundenen Ca^{2+} -ATPase des Sarcoplasmatischen Retikulums (SERCA-Blocker) und verhindert somit die aktive Aufnahme von Ca^{2+} ins ER-Lumen. Trotz der übereinstimmenden Ergebnisse ist die Herangehensweise über eine Depletion der internen Ca^{2+} -Speicher mit Hilfe von Thapsigargin im Hinblick auf die Funktion des CiCR jedoch kritisch zu hinterfragen.

Das herrschende Ca^{2+} -Konzentrationsgefälle zwischen Cytoplasma und ER-Lumen liegt etwa bei 1:10000 (Cytoplasma: ± 100 nm; ER: ± 1 mM). Das Entleeren der Speicher erfordert eine starke Stimulation der Zellen, da ja nur die Wiederaufnahme von Ca^{2+} blockiert wird, und würde primär eine starke Ca^{2+} -Erhöhung im Cytoplasma der gesamten Zelle hervorrufen. Zudem ist bekannt, dass ein Konzentrationsabfall im ER-Lumen den sogenannten kapazitiven oder speichergesteuerten Ca^{2+} -Influx aktiviert (store-operated Ca^{2+} entry, SOCE; (Putney, JR, 1986; Klejman et al., 2009; Hartmann et al., 2014). Dies geschieht über die Ausbildung von sogenannten CRAC-Kanälen (Ca^{2+} -release-activated channel). Der SOCE-Mechanismus verläuft über die Protein-Protein-Interaktion zwischen STIM1- und Orai1-Dimeren (Transmembranproteine in der ER-, bzw. Plasmamembran). Das STIM1-Protein fungiert dabei als ein an das ER-Lumen gekoppelter Ca^{2+} -Sensor. Nimmt die Ca^{2+} -Konzentration in den ER-Speichern ab, löst das eine Oligomerisierung von STIM1 und Orai1 aus, wodurch der CRAC-Kanal entsteht und Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum ins Cytoplasma strömen. Das Ca^{2+} -Konzentrationsgefälle zwischen Extrazellulärraum und Cytoplasma liegt etwa bei 20000:1 (Extrazellulärraum: ± 2 mM; Cytoplasma; ± 100 nm). Die Experimente, die zur Aufklärung des SOCE-Mechanismus führten, wurden systematisch im Wechsel zwischen Ca^{2+} -freien und Ca^{2+} -haltigen Pufferlösungen durchgeführt. Nur so konnte eine Entleerung des ER-Lumens erreicht werden, wobei es transient auch zu einer starken Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kam (Takemura und Putney, JR, 1989).

Bei der Depletionsstrategie der internen Ca^{2+} -Speicher mittels Thapsigargin ergeben sich folglich Probleme, die eine Interpretation der damit gewonnenen Ergebnisse erschweren. Ist ein Neuron aktiv und wird Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern freigesetzt, kann es nicht wieder zurückgepumpt werden (SERCA-Blockade) und akkumuliert im Cytoplasma. Gleichzeitig sorgt aber der Konzentrationsabfall im ER-Lumen dafür, dass weiteres Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum einströmt (SOCE-Mechanismus). Diese positive Rückkopplung kann nicht

unterbunden werden, da aktuell noch keine erfolgreich getesteten CRAC-Kanal Inhibitoren existieren.

Die sich hieraus ergebenden Reaktionen der Zelle lassen sich in ihrer Auswirkung auf die Untersuchung des Ca_iCR schwer abschätzen und erschweren Rückschlüsse auf die Situation bei synaptischer Übertragung oder Aktivierung durch bAPs. Aus diesen Gründen haben wir uns zur Untersuchung des Ca_iCR an der MF-Synapse für den pharmakologischen Ansatz mit Ryanodin in blockierenden Konzentrationen entschieden.

5.2 Teil II - LTP an der MF-MC-Synapse

5.2.1 Methoden zur gepaarten Ableitung

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zum CiCR an der MF-MC-Synapse konnten die Arbeitshypothese zur Rolle des Spine-Apparats bei der Beteiligung an der postsynaptischen Ca^{2+} -Dynamik vollumfänglich bestätigen. Der Mechanismus des CiCR verstärkt die postsynaptischen CaTs in den Excrescenzen der MF-MC-Synapsen. Der CiCR ist in Spines mit Spine-Apparat effektiver als in Spines ohne diese Organelle.

Die MF-Synapse hebt sich in Hinblick auf ihre komplexe Ultrastruktur mit bis zu 40 einzelnen Glutamat-Release Sites pro Bouton an den Excrescenzen der postsynaptischen MCs und CA3-Pyramidenzellen klar von anderen hippocampalen und neokortikalen Synapsen ab (Blackstad und Kjaerheim, 1961; Hamlyn, 1961a, 1962; Amaral und Dent, 1981; Frotscher, 1989; Chicurel und Harris, 1992; Rollenhagen und Lübke, 2010). Die MF-Synapse weist zudem eine aktivitätsabhängige strukturelle Plastizität im Zusammenhang mit Lern- und Gedächtnisprozessen auf (Galimberti et al., 2006; Maruo et al., 2016). Im Hinblick auf die funktionelle Plastizität konnten mehrere unterschiedliche Formen der prä- und postsynaptischen Plastizität an der MF-Synapse nachgewiesen werden (Zalutsky und Nicoll, 1990; Schmitz et al., 2001; Kwon und Castillo, 2008; Rebola et al., 2011). Unter dem Aspekt der benötigten Regulationsmechanismen für die Ausprägung dieser strukturellen und funktionellen Eigenschaften an der MF-Synapse rückte die Frage nach einer Beteiligung der Spine-Apparat-Organelle als dynamischer Modulator der postsynaptischen CaTs in den Mittelpunkt unserer Untersuchungen. Konkret sollte an WT- und Synaptopodin-defizienten MCs in hippocampalen Schnittkulturen untersucht werden, ob der Spine-Apparat als regulärer Bestandteil der MF-Synapse einen Einfluss auf den Ausgang induzierter Langzeitplastizität hat.

Die Untersuchung der synaptischen Transmission an individuellen MF-Synapsen erforderte somit den gleichzeitigen Zugang zur prä- und postsynaptischen Zelle, was methodisch jedoch nicht trivial ist. Ein naheliegender Ansatz wären gepaarte Patch-Clamp-Ableitung (paired-recordings) eines synaptisch verbundenen GC-MC-Paars gewesen, jedoch stellte sich diese Herangehensweise auf Grund der Anatomie der hippocampalen MF-Projektion als ungeeignet heraus. Der Ansatz gepaarter somatischer Ableitungen eignet sich nur bei Zelltypen, die eine hohe Interkonnektivität aufweisen, wie z.B. dem autoassoziativen CA3-CA3-Netzwerk oder der Schaffer-Kollateral-Synapse zwischen CA3- und CA1-Pyramidenzellen (Nicoll und Schmitz, 2005). Die Wahrscheinlichkeit mit Hilfe somatischer

Patch-Clamp-Ableitungen ein monosynaptisch verbundenes GC-MC-Paar, bzw. GC-CA3-Paar zu finden wäre auf Grund der verhältnismäßig niedrigen Konnektivität praktisch sehr gering. Aus diesem Grund existieren zur hippocampalen MF-Synapse bis heute nur vereinzelte Studien dieser Art. Die Arbeitsgruppen um Masahiro Mori und Peter Jonas sind bisher die einzigen, die die Methode der fokalen GC-Stimulation erfolgreich etabliert haben (Jonas et al., 1993; Mori et al., 2004; Mori et al., 2007; Maruo et al., 2016). Im Lauf der letzten Jahrzehnte haben sich einfachere Methoden durchgesetzt, die auf die Verwendung von extrazellulären Stimulationselektroden setzen. Um die Wahrscheinlichkeit einer monosynaptisch evozierten Antwort in der abgeleiteten Zielzelle zu erhöhen, werden die Stimulationselektroden i.d.R. so positioniert, dass viele GCs gleichzeitig aktiviert werden (bulk stimulation). Zudem können größere Bereiche des GCL durch sukzessives Umpositionieren der Elektrode abgesehen werden.

Jedoch ergibt sich durch den Einsatz nicht-fokaler Stimulationselektroden eine Reihe von Problemen. Die Massenaktivierung der MF-Projektion ruft eine erhöhte Hintergrundaktivität des assoziativ-rekurrenten CA3-CA3-Netzwerks hervor und erhöht damit die Wahrscheinlichkeit disynaptischer Eingänge an der abgeleiteten Zielzelle. Zudem kann es durch die antidrome Aktivierung einzelner MC- oder CA3-Kollateralen im DG (Axonreflex) unbeabsichtigt direkt zu einer monosynaptischen Aktivierung kommen (Nicoll und Schmitz, 2005). Die stark ausgeprägte inhibitorische Projektion der MFs führt unweigerlich auch zu einer Aktivierung signifikanter Teile des inhibitorischen Netzwerks (Acsady et al., 1998; Mori et al., 2004; Mori et al., 2007), was über di- und multisynaptische Verschaltungswege wiederum zu einer erheblichen „Kontamination“ der Ableitung führt. Durch die sukzessive Reduktion der Stimulationsstärke kann das Problem minimiert werden. Dieses Vorgehen stellt sich in der Praxis jedoch oft als Gratwanderung heraus, da einerseits eine reproduzierbare synaptische Aktivierung der Zielzelle erreicht werden muss, die andererseits ein vertretbares Maß an Hintergrundaktivität hervorruft. Deshalb kommt man nicht umhin, die glutamatergen Signale der MF-Projektion zusätzlich pharmakologisch zu isolieren.

Die Unterdrückung des inhibitorischen Netzwerks wird üblicherweise durch die Blockade der GABAergen Transmission mittels Bicucullin erreicht. Um sicher zu stellen, dass es sich bei den evozierten glutamatergen Signalen um spezifische MF-Aktivität handelt, kann zur rückwirkenden Kontrolle der metabotrope Glutamatrezeptor-Agonist DCG-IV eingewaschen werden, der selektiv die synaptische Transmission an der MF blockiert, ohne jedoch die Übertragung des assoziativ-rekurrenten Netzwerks zu beeinflussen (Yoshino et al., 1996). Durch die zusätzliche Blockade einzelner Rezeptorsubtypen an der MF-Synapse können deren

spezifische Beteiligung an der synaptischen Transmission sowie deren Funktion für die Induktion synaptischer Plastizitätsmechanismen untersucht werden. Mit Hilfe des kompetitiven AMPA-Rezeptor Antagonisten CNQX können bspw. die NMDAR-vermittelten Ströme (Ca^{2+} -Ströme) isoliert werden, wohingegen der NMDAR-Antagonist AP-5 die Induktion der Ca^{2+} -abhängigen postsynaptischen Plastizität unterdrückt (Jonas et al., 1993; Yuste et al., 1999). Ein grundsätzliches Problem bei der pharmakologischen Isolation synaptischer Komponenten stellen die bekannten und insbesondere die unbekannteren pharmakologischen Nebeneffekte dar, die bei Anwendung mehrerer Pharmaka in ihrem Gesamteffekt noch schwieriger einzuschätzen sind.

5.2.2 Erprobung alternativer Verfahren zur Untersuchung individueller Synapsen

Auf Grund der schlechten Interpretierbarkeit der Messergebnisse kam für die Untersuchungen in der vorliegenden Studie keiner der erwähnten Ansätze in Frage. Eine alternative Möglichkeit, um den Einfluss des Spine-Apparats auf die Ca^{2+} -abhängigen postsynaptischen LTP-Mechanismen an der hippocampalen MF-Synapse zu untersuchen, eröffnete die Methode der optischen Freisetzung von Glutamat (Zwei-Photonen-Glutamat-Uncaging). Dieser Ansatz bot im Prinzip ideale Voraussetzungen für die geplanten Untersuchungen und war in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich etabliert worden (Dissertation Tippmann, 2014).

Trotz intensiver Bemühungen gelang es im Rahmen der vorliegenden Studie mit dieser Methode jedoch nicht, LTP an individuellen MF-Synapsen zu induzieren (Daten nicht gezeigt!). Eine mögliche Erklärung könnte die sehr fokale Glutamat-Applikation (Aktivierung einzelner Release Sites) und die fehlenden Ko-Faktoren, wie Zink, Glycin, BDNF u.v.a.m. sein, die sonst vom präsynaptischen MF-Bouton freigesetzt werden. Unsere Erfahrungen mit MNI-Glutamat bestätigten zudem den disinhibierenden Effekt der chemischen Schutzgruppe MNI (4-Methoxy-7-nitroindolyl, Antagonist der GABAergen Transmission) auf das hippocampale Netzwerk (Fino et al., 2009). Als Alternative Maskierungsgruppe für Glutamat existiert das alpha-Carboxy-2-Nitrobenzyl (CNB). Jedoch konnten den photolytischen Spaltprodukten dieser Substanz ein direkter inhibitorischer Effekt auf den NMDA-Rezeptor nachgewiesen werden (Maier et al., 2005).

Eine vielversprechende Methode zur gepaarten Ableitung individueller MF-Synapsen war die aus der Arbeitsgruppe um Peter Jonas stammende, direkte Patch-Clamp Stimulation einzelner MF-Boutons in Kombination mit der postsynaptischen Whole-Cell Patch-Clamp-Ableitung der Zielzelle (Geiger und Jonas, 2000; Bischofberger et al., 2006). Nach dem gescheiterten Versuch der Potenzierung einzelner MF-Synapsen mittels der optischen-Glutamatfreisetzung

stellte dieser Ansatz, trotz der hohen technischen Anforderungen, aus unserer Sicht eine vernünftige Alternative für eine physiologische Untersuchung individueller MF-Synapsen dar. Zudem existierte bereits eine auf längere Ableitungen ausgerichtete Variante des Bouton-Patch-Verfahrens (Vyleta und Jonas, 2014).

Um die Ca^{2+} -Antwort im zum MFB postsynaptischen Spine messen zu können, erweiterten wir den technischen Ansatz von Jonas & Geiger um die duale Indikator-Methode der Zwei-Photon- Ca^{2+} -Messung. Zusätzlich musste das Verfahren nach Vyleta & Jonas an die Bedingungen für eine langzeitstabile Bouton-Stimulation (> 60 min) angepasst werden (Details siehe 3.5.2 bis 3.5.4, Seite 57 ff.).

Die parallele Ca^{2+} -Messung im Einzelspine erforderte die optische Identifizierung des präsynaptischen MF-Boutons an der gepatchten und fluoreszenzmarkierten MC. Dies gelang mit Hilfe des Shadowpatching-Verfahrens (Kitamura et al., 2008; Details siehe 3.5.1, Seite 54 ff.), welches ursprünglich zur *in vivo* Identifizierung ungefärbter Zellsomata entwickelt worden war. Wir konnten hier zeigen, dass sich das Verfahren auch zum gezielten Patchen sehr viel kleinerer Strukturen wie den MF-Boutons in entorhino-hippocampalen Schnittkulturen erfolgreich anwenden lässt.

Die gezielte Identifizierung und anschließende Stimulation des präsynaptischen Boutons, in Kombination mit der Zwei-Photon- Ca^{2+} -Messung im postsynaptischen Spine sowie der somatischen Whole-Cell Patch-Clamp-Ableitungen der postsynaptischen MC eröffnete uns die Möglichkeit, das Verhalten einzelner identifizierter MF-Synapsen in Antwort auf spezifische prä- und postsynaptische Stimulations- und Potenzierungsprotokolle zu untersuchen (individuelle Potenzierung = iPot). Ein maßgeblicher Vorteil des iPot-Verfahrens gegenüber den diskutierten Ansätzen war der Verzicht auf jegliche pharmakologische Beeinträchtigung der zu untersuchenden Synapsen. Um den iPot-Ansatz breiter zugänglich zu machen, soll die Methode auch für das akute Hirnschnittpräparat etabliert werden.

5.2.3 Funktionelle Heterogenität individueller MF-Synapsen

Die Analyse der maximalen Steigung der evozierten EPSPs sowie der Amplituden der korrespondierenden CaTs auf den jeweils ersten Puls der Doppelpulsstimulation zeigte eine breite Streuung innerhalb der einzelnen MF-Synapse. Die unterschiedliche Steigung der Regressionsgeraden der gleichen Antwortklasse verweist dabei auf eine heterogene Expression postsynaptischer AMPA- und NMDA-Rezeptoren, siehe 4.3, Seite 78 ff. und Anhang 6.3, Seite 108).

Die mit Hilfe der Glutamat-Uncaging-Methode gewonnenen Daten aus der Studie von A. Tippmann gaben uns einen Hinweis darauf, dass es sich bei der beobachteten Heterogenität der Einzelantworten in der Tat um die biologische Variabilität an den individuellen Synapsen handelte, da die Steigung der Regressionsgeraden auch in Antwort auf definierte Mengen an Glutamat stark streuten.

Die unterschiedlichen Längen der Regressionsgeraden in Antwort auf die Bouton-Stimulation waren hingegen ein Hinweis auf eine stark variierende Glutamatfreisetzung an den einzelnen MF-Boutons. Diese Variabilität fiel insbesondere bei den Synapsen auf, die gemischte Antworten zeigten. Doch was ist die Ursache dieser biologischen Variabilität? Eine plausible Erklärung wäre die analoge Modulation der präsynaptischen p_R durch den Effekt der Integration des präsynaptischen EPSPs am MF-Bouton (Alle und Geiger, 2006). Die Depolarisation des präsynaptischen EPSPs läuft dabei parallel zum AP über die MF und sorgt für eine analoge Steigerung der effektiven p_R des Boutons. Es konnte bisher nicht geklärt werden, ob der von Alle & Geiger entdeckte Effekt an der MF-Synapse durch eine Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktion, oder durch eine direkte Spannungs-abhängige Modulation der präsynaptischen Transmitterfreisetzung-Maschinerie hervorgerufen wird (Alle und Geiger, 2006).

Die MF-CA3-Synapse wird als konditionale Detonatorsynapse bezeichnet, da kurzen Serien von GC-APs, nicht jedoch einzelne GC-APs zum Feuern der postsynaptischen CA3-Pyramidenzelle führen (Vyleta et al., 2016). So können einzelne GCs in Abhängigkeit von ihrer AP-Frequenz das Netzwerk in CA3 direkt modulieren. Unsere Ergebnisse weisen auf einen anderen Charakter der MF-MC-Synapse hin, der bisher noch nicht beschrieben wurde. In der Gruppe der 26 WT-Synapsen konnte der erste Puls in 85 % der MCs bereits direkt eine überschwellige Antwort evozieren. Diese „nicht-konditionale“ Eigenschaft der MF-MC-Synapse als „direkte Detonatorsynapse“ beruht sehr wahrscheinlich auf den physiologischen Eigenschaften der postsynaptischen MCs. Die Erfassung der passiven

Membraneigenschaften ergab ein mittleres RMP der MC von $-68,1$ mV ($n = 26$, -63 mV bis -78 mV). Allgemein wird das RMP der MCs mit ca. -64 mV (*in vitro* akuter Schnitt; Kowalski et al., 2010) angegeben. Somit ist die MC im Ruhezustand im Vergleich zur CA3-Pyramidenzellen mit ca. -77 mV deutlich depolarisierter (Tyzio et al., 2003).

Die Darstellung der Mediane aller untersuchten Synapsen illustrierte eindrucksvoll das breite Spektrum an angetroffenen synaptischen Zuständen. Die beobachtete Heterogenität könnte Ausdruck der individuellen Aktivitätsgeschichte der MF-MC-Synapsen während der Inkubationszeit sein. Die Aktivität der GCs, bzw. der afferenten MFs stellt den wesentlichen exzitatorischen Eingang der MCs dar. Man könnte nun vermuten, dass das breite Spektrum der synaptischen Zustände eher die Variabilität der Spontanaktivität in den unterschiedlichen Schnittkulturen als die Heterogenität einzelner MF-MC Synapsen widerspiegeln könnte. Dieses Argument konnte jedoch entkräftet werden indem wir mehrere MF-Synapsen auf der gleichen Zelle untersuchten und klar zeigen konnten, dass zwei MF- Synapsen am gleichen Dendriten derselben MC sehr unterschiedliche Zustände aufwiesen (Details siehe 4.3.2, Seite 81 ff.).

Im Vergleich zu den 26 WT- Synapsen zeigten die 20 KO- Synapsen eine deutlich homogenere Verteilung der synaptischen Zustände. Dementsprechend evozierte der erste Puls der PPS nur in 65 % der postsynaptischen MCs direkt überschwellige Antworten. Der Befund der schwächeren KO-Synapsen ließ sich nicht durch die unterschiedliche Inkubationsdauer erklären (WT: $41,7 \pm 10,4$ Tage; KO: $49,7 \pm 12,5$ Tage, *, $p = 0,023$). Auf Grund der signifikant längeren Inkubationszeit der KO-Kulturen wären eher stärkere Synapsen zu erwarten gewesen.

Die bisher diskutierten Befunde wären mit einem rein postsynaptischen Effekt zu erklären, der auf Grund der fehlenden Spine-Apparat-Organellen im postsynaptischen Spine der MC eine verminderte Ca^{2+} -Antwort nach sich zieht und dadurch wiederum zu weniger stark potenzierten KO-Synapsen führt.

5.2.4 Die Heterogenität der Glutamatfreisetzung der präsynaptischen Boutons spiegelt die Heterogenität der synaptischen Zustände wieder

Die Höhe der PPR ist Ausdruck der initialen p_R des MF-Boutons. Eine hohe PPF deutet demnach auf eine primär geringe Glutamatfreisetzung in Antwort auf den ersten Stimulus hin. Wir fanden bei den Synapsen beider Genotypen übereinstimmend, dass tendenziell schwache Synapsen (unterschwellig und gemischte Antworten) eine hohe PPF aufwiesen, wohingegen starke Synapsen (alle Antworten überschwellig) in der Regel eine niedrige PPF oder sogar PPD zeigten. Die Analyse der PPRs deutete somit auf die Beteiligung des präsynaptischen Boutons hin.

5.2.5 Heterogene Plastizität der MF-Synapsen

Die LTP-Induktion durch das immer gleiche Potenzierungsprotokoll löste in 8 von 10 WT-Synapsen eine konsistente Änderung der PPRs hervor. Jedoch stellte sich heraus, dass der Ausgang der Potentierung maßgeblich eine erhöhte p_R der MF-Boutons hervorrief, d.h. dass in 8 von 10 WT-Synapsen eine präsynaptische Potenzierung stattgefunden hat. Dieses Ergebnis hatten wir auf Grund des angewandten Induktionsprotokolls nicht erwartet (Kwon und Castillo, 2008). Diese Autoren fanden in Antwort auf eine Serie von 24 MF-Stimulationen (25 Hz) neben der beschriebenen NMDAR-Potentierung keinen Hinweis auf eine präsynaptische Potenzierung:

„... Remarkably, induction of NMDAR-*m*LTP with a short tetanus Caused no lasting change in PPF ($97\% \pm 5\%$, $n = 7$, $p > 0.5$) ...“ [Kwon und Castillo, 2008]

Die Autoren einer älteren Studie berichten hingegen, dass eine präsynaptische Serie von 12 oder 24 Pulsen (25 Hz) manchmal ausreichen konnte, um sehr schwaches LTP im präsynaptischen Bouton zu induzieren (Schmitz et al., 2003). Ein deutlicher LTP-Effekt trat erst nach Verdopplung der Stimuluspulse ein:

“... in the presence of CNQX (10 μ M), which blocks (presynaptic) KARs, little or no LTP is induced with a 12- or 24-pulse tetanus (25 Hz), but clear LTP is seen with 48 pulse...” [Schmitz et al., 2003]

5.2.6 Beeinträchtigung der postsynaptischen LTP-Induktion in Synaptopodin-defizienten MF-MC-Synapsen

Die Daten der WT-Synapsen sprachen klar für einen dominierenden Einfluss des präsynaptischen Boutons auf den Ausgang der induzierten Plastizität. Wie ließ sich im Hinblick darauf aber die homogenere Verteilung der KO-Synapsen erklären, die bereits auf schwächere Boutons im Ausgangszustand hindeutete? Die einfachste Erklärung dafür wäre eine verminderte Spontanaktivität der GCs in den KO-Kulturen. Wenn man den allgemein schwächeren Ausgangszustand der KO-Synapsen in Betracht zieht, würde man erwarten, dass gerade die schwachen Synapsen (mit geringer p_R) stärker auf eine Potenzierung ansprechen müssten als die stärkeren WT-Synapsen (mit einer bereits hohen p_R). Die qualitative Analyse ergab dazu, dass in Antwort auf das Induktionsprotokoll insgesamt 4 von 10 Synapsen in der WT-Gruppe ihre Kategorie wechselten. Davon waren drei gemischte Synapsen, die nach der Potenzierung nur noch überschwellige Antworten aufwiesen. Übereinstimmend damit verwies die Änderung der PPR in 8 von 10 WT-Synapsen auf einen präsynaptischen Potenzierungseffekt. In der KO-Gruppe wechselte hingegen nur eine von 10 Synapsen ihre Antwortkategorie von unterschwellig auf gemischt. Außerdem reagierten 5 von 10 KO-Synapsen in Antwort auf das gleiche Induktionsprotokoll nicht mit einer präsynaptischen Potenzierung, sondern zeigten anhand der veränderten PPR sogar präsynaptisches LTD.

Dieser Befund spricht gegen eine schlichte Reduktion der GC-Aktivität in den KO-Kulturen, sondern verweist möglicherweise auf ein Problem bei der Ausprägung von präsynaptischen von LTP in Synaptopodin-defizienten MF-MC-Synapsen. Auf Grund des relativ kleinen Datensatzes (10 gegen 10 erfolgreich potenzierte MF-MC-Synapsen) war eine statistische Analyse mit Subgruppen wenig aussichtsreich.

In der Hälfte der untersuchten KO-Synapsen ergibt sich jedoch der kontraintuitive Befund, dass hier eine Beeinträchtigung der präsynaptischen Induzierbarkeit von LTP besteht, obwohl spezifisch die postsynaptische Ca^{2+} -Kinetik alteriert ist. Dies könnte auf eine postsynaptisch induzierte Veränderung des präsynaptischen MF-Boutons (PPR, p_R) zurückzuführen sein, die von der postsynaptischen Ca^{2+} -Kinetik abhängig ist. An der MF-Synapse wurde erst vor kurzer Zeit eine aktivitätsabhängige Änderung der Bouton-Morphologie beschrieben, die im Zusammenhang mit der postsynaptischen Ca^{2+} -Antwort stand (Maruo et al., 2016). Die Induktion der präsynaptischen Veränderungen war dabei abhängig von der Aktivierung postsynaptische NMDA-, Kainat- und mGlu-Rezeptoren. Die Autoren beschrieben darin einen Mechanismus der retrograden Signaltransduktion, der auf der intrazellulärer Freisetzung der Signalstoffe Stickstoffmonoxid (NO) und Arachidonsäure beruht. Sie gaben dem erstmals

beschriebenen Phänomen den Namen AdAMS (Activity-dependent Alteration of the Morphology of a Synapse = Aktivitätsabhängige Veränderung der Morphologie einer Synapse). Zudem stellte die Studie fest, dass die strukturelle Veränderung des MF-Boutons mit dem Anstieg der postsynaptisch abgeleiteten Ströme korrelierte. In einer Zeitspanne von 60 min traten die morphologischen Veränderungen an den MF-CA3-Boutons ein, wobei nicht das Volumen, sondern die Komplexität der Segmentierung anstieg. Vieles spricht dafür, dass hierbei möglicherweise die Anzahl der präsynaptischen Release Sites erhöht wird.

Der Bezug auf die notwendige postsynaptische Ca^{2+} -Antwort macht eine funktionelle Verbindung zur Spine-Apparat-Organelle plausibel. Möglicherweise ist eine dynamische Verstärkung der postsynaptischen Ca^{2+} -Antwort durch den CiCR-Mechanismus mitbestimmend für die Aktivierung der retrograden Signalkette. Unser Befund, dass der CiCR in KO-Spines prinzipiell noch funktioniert, wenn auch sehr vermindert, könnte in diesem Zusammenhang erklären, wieso 5 der 10 KO-Synapsen trotzdem in der Lage waren, einen gewissen präsynaptischen LTP-Effekt auszubilden.

5.2.7 Ausblick

Eine Erweiterung des bisherigen Datensatzes würde eine statistische Analyse von Subgruppen erlauben, bei der angestrebt wird möglichst ähnliche Synapsen (sog. pseudo Paare) zwischen den Genotypen zu definieren und den Ausgang der Potenzierung miteinander zu vergleichen („nearest-neighbour“-Analyse). Damit könnte eine quantitative Aussage über die effektive Potenzierung der individuellen MF-MC-Synapsen getroffen werden. Möglicherweise ergeben sich dabei auch Hinweise auf unterschiedliche Effekte auf die AMPA- bzw. NMDA-Komponenten in Abhängigkeit des Genotyps und Ausgangszustands der Synapse.

Mit der iPot-Methode sind wir in der Lage, die Langzeitveränderungen der postsynaptischen Antworten (CaTs und EPSPs) zu beobachten. Eine aktivitätsinduzierte Veränderung der Bouton-Segmentierung (AdAMS) müsste sich u.a. auf die Struktur der postsynaptischen Spines auswirken. Mit Hilfe von Zwei-Photonen-4D-Aufnahmen von MC-Excrescenzen könnten wir die morphologischen Veränderungen der präsynaptischen Boutons untersuchen, die in Abhängigkeit der retrograden Signaltransduktion induziert wurden. Zusätzlich könnten unterschiedliche Induktionsprotokolle verwendet werden, um z.B. eine effektive Depotenzierung des Detonatorstatus der MF-MC-Synapse zu induzieren. Deshalb arbeiten wir an einer Erweiterung der iPot-Methode, die gleichzeitig die Darstellung der Morphologie des gepatchten und stimulierten präsynaptischen MF-Boutons erlaubt. Die Fluoreszenzmarkierung des Boutons soll dabei mit Hilfe der Stimulationspipette und dem lipophilen Farbstoff DiI (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin) erfolgen. Diese Erweiterung der iPot-Methode (DiI + iPot \rightarrow DiPot⁺) würde uns in der Lage versetzen die prä- und postsynaptische Morphologie einzelner MF-MC-Synapsen über längere Zeiträume zu dokumentieren und sie gleichzeitig mit der funktionellen Plastizität in Bezug zu setzen. Das DiPot⁺-Verfahren könnte somit dazu beitragen, die Rolle der Spine-Apparat-Organellen bei der Induktion retrograder Signalwege an der MF-Synapse zu entschlüsseln. Zusätzlich könnte damit eine detaillierte Analyse der Struktur-Funktionsbeziehung auf der Ebene einzelner Synapsen erfolgen, um die Veränderungen der komplexen Morphologie der MF-Synapse (prä- und postsynaptisch) mit der funktionellen Ausprägung von LTP und LTD zu korrelieren.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

a.u.	<i>engl.</i> arbitrary units = beliebige Einheiten
ACSF	<i>engl.</i> artificial cerebrospinal fluid = künstlicher Liquor
AMPA	<i>engl.</i> α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid = Aminomethylphosphonsäure
AMPAR	AMPA-Rezeptor
AP	Aktionspotential
bAP	<i>engl.</i> backpropagating action potential = zurückpropagierendes Aktionspotential
BDNF	<i>engl.</i> brain-derived neurotrophic factor = Neurotrophiner Wachstumsfaktor im Gehirn
CA	<i>lat.</i> cornu ammonis = Ammonshorn
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II
CaT	Ca ²⁺ -Transient
CC	<i>engl.</i> current clamp = Stromklemme
CaCR	Ca ²⁺ -induced Ca ²⁺ release = Ca ²⁺ -induzierten Ca ²⁺ -Freisetzung
DG	<i>engl.</i> dentate gyrus = Gyrus Dentatus
DIV	<i>engl.</i> days in vitro = Inkubationsdauer in Tagen
EC	Entorhinaler Cortex
EGFP	<i>engl.</i> enhanced GFP = verstärktes GFP
E_K	Nernst-Potenzial (Kalium)
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GC	<i>engl.</i> granule cell = Körnerzelle
GCaMP	GFP-Calmodulin-Myosin13-Fusionsprotein; moderner genetisch kodierter Ca ²⁺ -Sensor
GCL	<i>engl.</i> granule cell layer = Körnerzellschicht
GFP	<i>engl.</i> green fluorescent protein = EGFP
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP₃	Inositoltrisphosphat
IP₃Rs	IP ₃ -Rezeptoren
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
ISI	Inter-Stimulus-Intervall
KO	<i>engl.</i> knock-out = gezielt Deaktivierung von einem oder mehreren Genen
LDCV	<i>engl.</i> large dense core vesicles = Vesikel mit elektronendichten Kernbereichen
LTD	<i>engl.</i> long-term depression = Langzeitdepression
LTP	<i>engl.</i> long-term potentiation = Langzeitpotenzierung
MAD	<i>engl.</i> median absolute deviation from the median = Median der absoluten Abweichungen des Medians
MC	<i>engl.</i> mossy cell = Mooszelle
MF	Moosfaser
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
n.s.	nicht signifikant
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-Rezeptor
PC	Personal Computer
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PLC	Phospholipase C
PMT	<i>engl.</i> photomultiplier = Licht-Verstärker-Röhren
PP	<i>engl.</i> perforant path = Tractus perforans
PPD	<i>engl.</i> paired-pulse depression = Doppelpuls-Depression
PPF	<i>engl.</i> paired-pulse fascilitation = Doppelpuls-Faszilitierung
PPR	<i>engl.</i> paired-pulse ratio = Verhältnis der Doppelpulsantworten
PPS	<i>engl.</i> paired-pulse stimulation = Doppelpuls-Stimulation
RMP	Ruhemembranpotenzial
RP	<i>engl.</i> release probability = Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit
RT	Raumtemperatur
Rya	Ryanodin
RyR 1, 2, 3	Ryanodin-Rezeptor Typ 1, 2, 3
SD	<i>engl.</i> standard deviation = Standardabweichung
SEM	<i>engl.</i> standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwerts
SERCA	<i>engl.</i> sarcoplasmic /endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase = Ca^{2+} -Pumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums
STDP	<i>engl.</i> spike-timing-dependent plasticity = zeitabhängige Plastizität von Impulsereignissen
STP	<i>engl.</i> short-term potentiation = Kurzzeitpotenzierung
VC	<i>engl.</i> voltage clamp = Spannungsklemme
VGCC	<i>engl.</i> voltage-gated Ca^{2+} channel = spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanal
WT	Wildtyp

6.2 Tabellen: CiCR an der Moosfasersynapse

Maximale Ca²⁺-Amplitude (c_{max}) in Spines:

Spines WT ^{ACSF} MW ± SD: 0,1473 ± 0,0304 n: 21	Spines WT ^{Rya} MW ± SD: 0,1117 ± 0,0330 n: 11	MW ± SD des Quotienten: WT ^{Rya} / WT ^{ACSF} 0,6998 ± 0,1030 P-Wert: 0,0064 (*)
Spines KO ^{ACSF} MW ± SD: 0,1125 ± 0,0169 n: 13	Spines KO ^{Rya} MW ± SD: 0,0903 ± 0,0254 n: 10	MW ± SD des Quotienten: KO ^{Rya} / KO ^{ACSF} 0,8133 ± 0,2037 P-Wert: 0,0481 (*)
Quotient der MWs KO ^{ACSF} / WT ^{ACSF} 0,7637 P-Wert: 0,0054 (*)	Quotient der MWs KO ^{Rya} / WT ^{Rya} 0,8085 P-Wert: 0,4959 (n.s.)	

Maximale Ca²⁺-Amplitude (c_{max}) in Dendriten:

Dendriten WT ^{ACSF} MW ± SD: 0,1720 ± 0,0260 n: 21	Dendriten WT ^{Rya} MW ± SD: 0,1045 ± 0,0256 n: 11	MW ± SD des Quotienten: WT ^{Rya} / WT ^{ACSF} 0,6110 ± 0,1295 P-Wert: 0,0064 (*)
Dendriten KO ^{ACSF} MW ± SD: 0,1702 ± 0,0169 n: 13	Dendriten KO ^{Rya} MW ± SD: 0,1124 ± 0,0300 n: 10	MW ± SD des Quotienten: KO ^{Rya} / KO ^{ACSF} 0,6521 ± 0,113152 P-Wert: 0,0066 (*)
Quotient der MWs KO ^{ACSF} / WT ^{ACSF} 0,9892 P-Wert: 0,9479 (n.s.)	Quotient der MWs KO ^{Rya} / WT ^{Rya} 1,0755 P-Wert: 0,6379 (n.s.)	

Ca²⁺-Influxrate (k_{Influx}) in Spines [1/s]:

Spines WT ^{ACSF} MW ± SD: 1,550 ± 0,4654 n: 21	Spines WT ^{Rya} MW ± SD: 1,0711 ± 0,3831 n: 11	MW ± SD des Quotienten: WT ^{Rya} / WT ^{ACSF} 0,6493 ± 0,1700 P-Wert: 0,0064 (*)
Spines KO ^{ACSF} MW ± SD: 1,01431 ± 0,1879 n: 13	Spines KO ^{Rya} MW ± SD: 0,8260 ± 0,3160 n: 10	MW ± SD des Quotienten: KO ^{Rya} / KO ^{ACSF} 0,8268 ± 0,2406 P-Wert: 0,09766 (n.s.)
Quotient der MWs KO ^{ACSF} / WT ^{ACSF} 0,6544 P-Wert: 0,00288 (*)	Quotient der MWs KO ^{Rya} / WT ^{Rya} 0,7712 P-Wert: 0,10446 (n.s.)	

Ca²⁺-Influxrate (k_{Influx}) in Dendriten [1/s]:

Spines WT ^{ACSF} MW ± SD: 2,075 ± 0,5079 n: 21	Spines WT ^{Rya} MW ± SD: 1,1114 ± 0,2795 n: 11	MW ± SD des Quotienten: WT ^{Rya} / WT ^{ACSF} 0,5614 ± 0,1287 P-Wert: 0,0064 (*)
Spines KO ^{ACSF} MW ± SD: 1,8871 ± 0,3263 n: 13	Spines KO ^{Rya} MW ± SD: 1,1328 ± 0,2838 n: 10	MW ± SD des Quotienten: KO ^{Rya} / KO ^{ACSF} 0,5932 ± 0,0986 P-Wert: 0,09766 (n.s.)
Quotient der MWs KO ^{ACSF} / WT ^{ACSF} 0,9093 P-Wert: 0,42119 (n.s.)	Quotient der MWs KO ^{Rya} / WT ^{Rya} 1,0192 P-Wert: 0,82776 (n.s.)	

Zeitkonstante der Ca²⁺-Extrusion (τ_{Extrusion}) in Spines [s]:

Spines WT ^{ACSF} MW ± SD: 0,3285 ± 0,0736 n: 21	Spines WT ^{Rya} MW ± SD: 0,6619 ± 0,1635 n: 11	MW ± SD des Quotienten: WT ^{Rya} / WT ^{ACSF} 2,2263 ± 0,1010 P-Wert: 0,0064 (*)
Spines KO ^{ACSF} MW ± SD: 0,4288 ± 0,1237 n: 13	Spines KO ^{Rya} MW ± SD: 0,6132 ± 0,3548 n: 10	MW ± SD des Quotienten: KO ^{Rya} / KO ^{ACSF} 1,4147 ± 0,432 P-Wert: 0,06249 (n.s.)
Quotient der MWs KO ^{ACSF} / WT ^{ACSF} 1,3053 P-Wert: 0,03035 (*)	Quotient der MWs KO ^{Rya} / WT ^{Rya} 0,9264 P-Wert: 0,23469 (n.s.)	

Zeitkonstanten der Ca²⁺-Extrusion (τ_{Extrusion}) in Dendriten [s]:

Spines WT ^{ACSF} MW ± SD: 0,3024 ± 0,0605 n: 21	Spines WT ^{Rya} MW ± SD: 0,5753 ± 0,1337 n: 11	MW ± SD des Quotienten: WT ^{Rya} / WT ^{ACSF} 2,0192 ± 0,6972 P-Wert: 0,0064 (*)
Spines KO ^{ACSF} MW ± SD: 0,2955 ± 0,0687 n: 13	Spines KO ^{Rya} MW ± SD: 0,4929 ± 0,1522 n: 10	MW ± SD des Quotienten: KO ^{Rya} / KO ^{ACSF} 1,7204 ± 0,3599 P-Wert: 0,01137 (*)
Quotient der MWs KO ^{ACSF} / WT ^{ACSF} 0,9774 P-Wert: 0,6169 (n.s.)	Quotient der MWs KO ^{Rya} / WT ^{Rya} 0,8567 P-Wert: 0,08234 (n.s.)	

Basale Fluoreszenz in Spines:

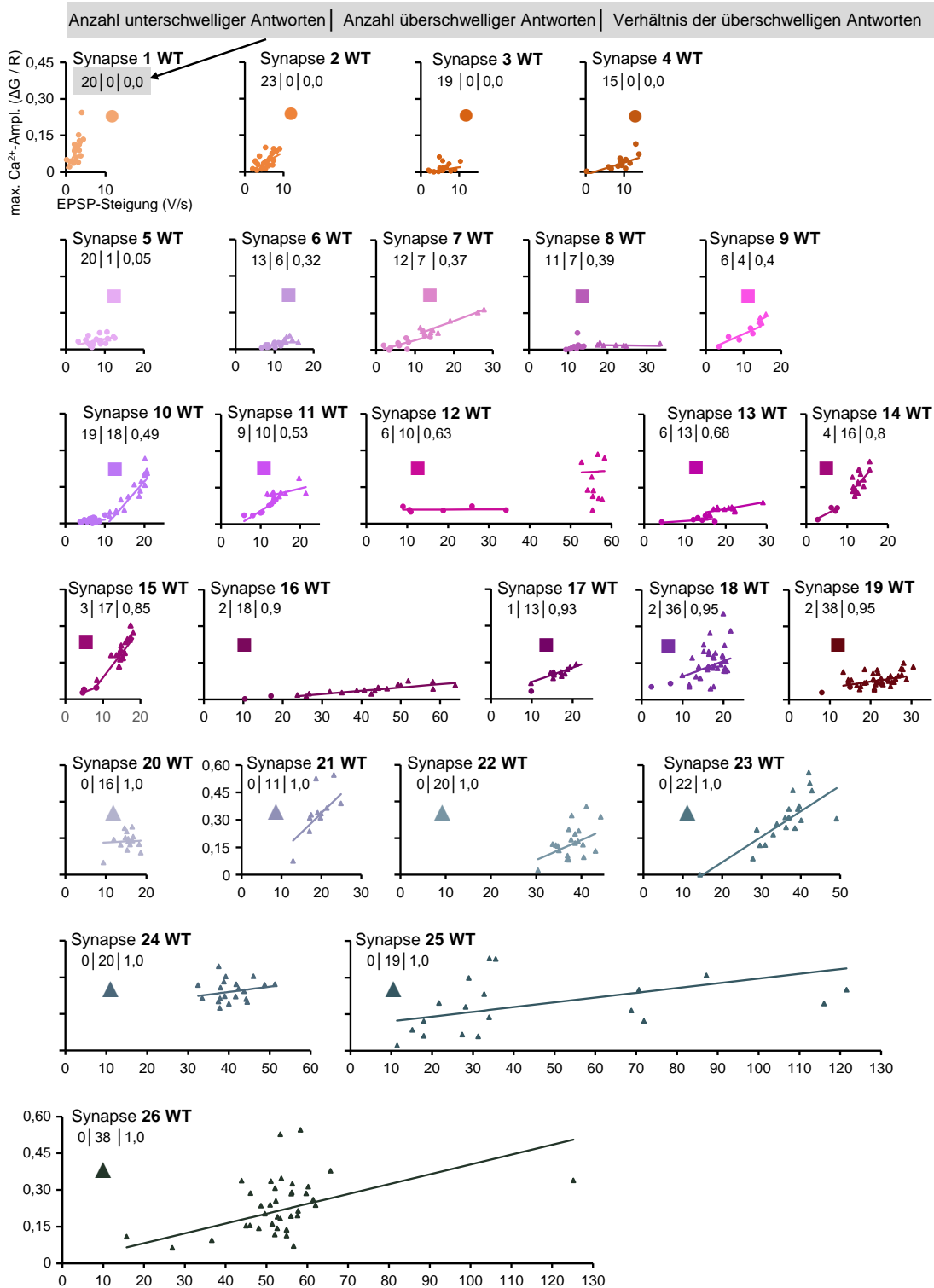
Spines WT ^{ACSF} MW ± SD: 0,1067 ± 0,0421 n: 21	Spines WT ^{Rya} MW ± SD: 0,0956 ± 0,0181 n: 11	MW ± SD des Quotienten: WT ^{Rya} / WT ^{ACSF} 0,9694 ± 0,4053 P-Wert: 0,2061 (n.s.)
Spines KO ^{ACSF} MW ± SD: 0,0929 ± 0,0263 n: 13	Spines KO ^{Rya} MW ± SD: 0,1001 ± 0,0164 n: 10	MW ± SD des Quotienten: KO ^{Rya} / KO ^{ACSF} 1,1774 ± 0,3961 P-Wert: 0,4316 (n.s.)
Quotient der MWs KO ^{ACSF} / WT ^{ACSF} 0,8708 P-Wert: 0,2842 (n.s.)	Quotient der MWs KO ^{Rya} / WT ^{Rya} 1,0474 P-Wert: 0,6612 (n.s.)	

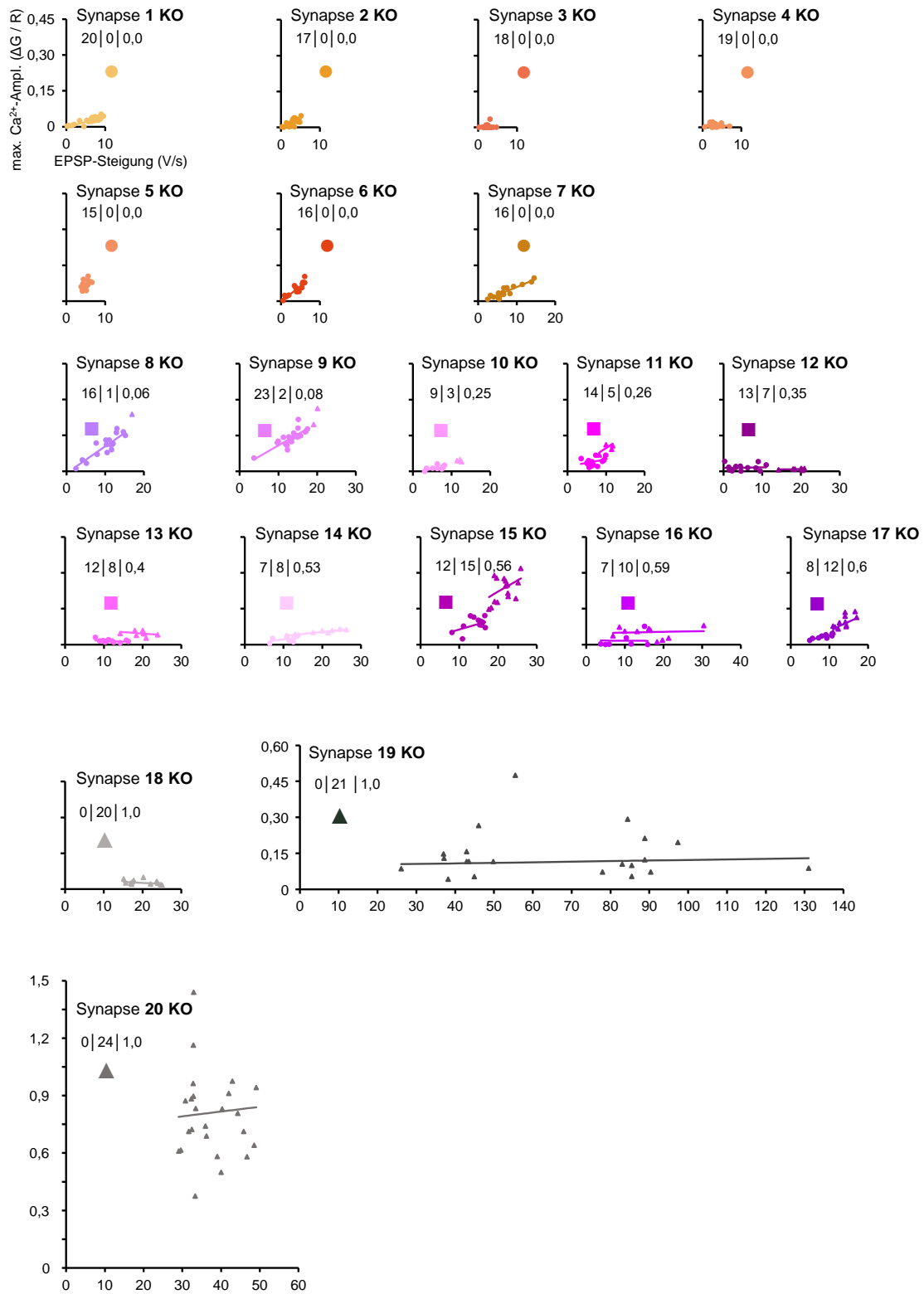
Basale Fluoreszenz in Dendriten:

Dendriten WT ^{ACSF} MW ± SD: 0,1267 ± 0,0324 n: 21	Dendriten WT ^{Rya} MW ± SD: 0,1068 ± 0,0326 n: 11	MW ± SD des Quotienten: WT ^{Rya} / WT ^{ACSF} 0,9026 ± 0,2244 P-Wert: 0,1475 (n.s.)
Dendriten KO ^{ACSF} MW ± SD: 0,1487 ± 0,0228 n: 13	Dendriten KO ^{Rya} MW ± SD: 0,1223 ± 0,0368 n: 10	MW ± SD des Quotienten: KO ^{Rya} / KO ^{ACSF} 0,8336 ± 0,2263 P-Wert: 0,0645 (n.s.)
Quotient der MWs KO ^{ACSF} / WT ^{ACSF} 1,1737 P-Wert: 0,0893 (n.s.)	Quotient der MWs KO ^{Rya} / WT ^{Rya} 1,1451 P-Wert: 0,3605 (n.s.)	

6.3 Übersicht der untersuchten MF-Synapsen

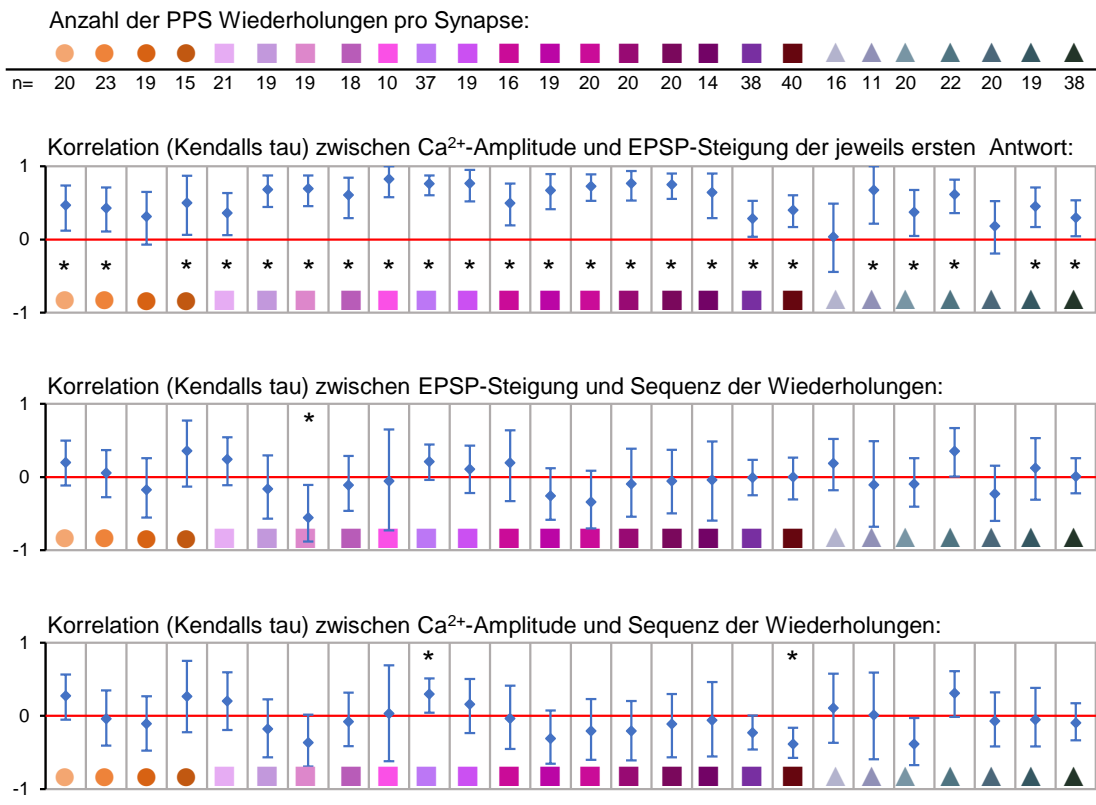
Maximale Ca^{2+} -Amplitude gegen EPSP-Steigung in Antwort auf den ersten Puls der PPS aller 26 WT- und 20 KO-Synapsen. Farbcodierung der Zellen wie in Abbildung 25. Aufsteigende Sortierung nach dem Anteil überschwelliger Antworten.





6.4 Korrelationen

Angegeben sind die Anzahl der PPS Wiederholungen pro Synapse, die Korrelation zwischen der Ca²⁺-Amplitude und, die Korrelation zwischen der EPSP-Steigung und der Sequenz der Wiederholungen, die Korrelation zwischen der Ca²⁺-Amplitude und der Sequenz der Wiederholungen der jeweils ersten Antwort (alle 26 WT-Synapsen). Dargestellt wird der Bootstrap-Mittelwert (♦) von Kendalls tau mit einem Konfidenzintervall (0,025 – 0,975, indiziert durch Fehlerbalken) für alle 26 WT-Synapsen. Kendalls tau ist ein robustes Korrelationsmaß. Wenn der Wert 0 (rote Linie) nicht im Konfidenzintervall enthalten ist, werden die Parameter auf einem Signifikanzniveau von 0,05 als positiv oder negativ korreliert (*) betrachtet. Farbcodierung der Zellen wie in Abbildung 25.



7 Literaturverzeichnis

- Acsady L**, Kamondi A, Sik A, Freund T, Buzsaki G. 1998. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* **18**:3386–3403.
- Alcami P**, Franconville R, Llano I, Marty A. 2012. Measuring the firing rate of high-resistance neurons with cell-attached recording. *J. Neurosci.* **32**:3118–3130. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5371-11.2012.
- Alle H**, Geiger JRP. 2006. Combined analog and action potential coding in hippocampal mossy fibers. *Science* **311**:1290–1293. doi: 10.1126/science.1119055.
- Amaral DG**. 1978. A golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J. Comp. Neurol.* **182**:851–914. doi: 10.1002/cne.901820508.
- Amaral DG**, Dent JA. 1981. Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J. Comp. Neurol.* **195**:51–86. doi: 10.1002/cne.901950106.
- Amaral DG**, Dolorfo C, Alvarez-Royo P. 1991. Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus* **1**:415–435. doi: 10.1002/hipo.450010410.
- Amaral DG**, Ishizuka N, Claiborne B. 1990. Chapter 1 Chapter Neurons, numbers and the hippocampal network. In: Storm-Mathisen J, Zimmer J, Ottersen OP, Blackstad TW, eds. *Understanding the brain through the hippocampus: The hippocampal region as a model for studying brain structure and function / edited by J. Storm-Mathisen, J. Zimmer, and O.P. Ottersen*. Elsevier, Amsterdam, Oxford.
- Amaral DG**, Lavenex P. 2007. Hippocampal Neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, eds. *The hippocampus book*. Oxford University Press, New York.
- Amaral DG**, Witter MP. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* **31**:571–591.
- Andersen P**, Bliss TV, Lomo T, Olsen LI, Skrede KK. 1969. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta physiologica Scandinavica* **76**:4A-5A.
- Andersen P**, Bliss TV, Skrede KK. 1971. Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp. Brain Res.* **13**:222–238.
- Andersen P**, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, eds. 2007. *The hippocampus book*. Oxford University Press, New York.
- Bas Orth C**, Schultz C, Muller CM, Frotscher M, Deller T. 2007. Loss of the cisternal organelle in the axon initial segment of cortical neurons in synaptopodin-deficient mice. *J. Comp. Neurol.* **504**:441–449. doi: 10.1002/cne.21445.
- Bateman H**. 1910. Solution of a system of differential equations occurring in the theory of radioactive transformations. *Proc. Camb. Philos. Soc* **423–427**.
- Benjamini Y**, Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* **57**:289–300. doi: 10.2307/2346101.
- Berridge MJ**. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**:315–325. doi: 10.1038/361315a0.
- Berridge MJ**. 1998. Neuronal Calcium Signaling. *Neuron* **21**:13–26. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80510-3.
- Berridge MJ**. 2006. Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* **40**:405–412. doi: 10.1016/j.ceca.2006.09.002.
- Bischofberger J**, Engel D, Li L, Geiger JRP, Jonas P. 2006. Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nat. Protoc.* **1**:2075–2081. doi: 10.1038/nprot.2006.312.

- Blackstad JS**, Osen KK, Scharfman HE, Storm-Mathisen J, Blackstad TW, Leergaard TB. 2016. Observations on hippocampal mossy cells in mink (*Neovison vison*) with special reference to dendrites ascending to the granular and molecular layers. *Hippocampus* **26**:229–245. doi: 10.1002/hipo.22518.
- Blackstad TW**, Brink K, Hem J, Jeune B. 1970. Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J. Comp. Neurol.* **138**:433–449. doi: 10.1002/cne.901380404.
- Blackstad TW**, Kjaerheim A. 1961. Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: Electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *J. Comp. Neurol.* **117**:133–159. doi: 10.1002/cne.901170202.
- Bliss TV**, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**:31–39. doi: 10.1038/361031a0.
- Buckmaster PS**, Jongen-Relo AL. 1999. Highly specific neuron loss preserves lateral inhibitory circuits in the dentate gyrus of kainate-induced epileptic rats. *J. Neurosci.* **19**:9519–9529.
- Buckmaster PS**, Strowbridge BW, Kunkel DD, Schmiede DL, Schwartzkroin PA. 1992. Mossy cell axonal projections to the dentate gyrus molecular layer in the rat hippocampal slice. *Hippocampus* **2**:349–362. doi: 10.1002/hipo.450020403.
- Buckmaster PS**, Wenzel HJ, Kunkel DD, Schwartzkroin PA. 1996. Axon arbors and synaptic connections of hippocampal mossy cells in the rat in vivo. *J. Comp. Neurol.* **366**:271–292. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960304)366:2<270::AID-CNE7>3.0.CO;2-2.
- Bygrave FL**, Benedetti A. 1996. What is the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum? *Cell Calcium* **19**:547–551.
- Caeser M**, Aertsen A. 1991. Morphological organization of rat hippocampal slice cultures. *J. Comp. Neurol.* **307**:87–106. doi: 10.1002/cne.903070109.
- Chen T-W**, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS. 2013. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* **499**:295–300. doi: 10.1038/nature12354.
- Chen W**, Wang R, Chen B, Zhong X, Kong H, Bai Y, Zhou Q, Xie C, Zhang J, Guo A, Tian X, Jones PP, O'Mara ML, Liu Y, Mi T, Zhang L, Bolstad J, Semeniuk L, Cheng H, Zhang J, Chen J, Tieleman DP, Gillis AM, Duff HJ, Fill M, Song L-S, Chen SRW. 2014. The ryanodine receptor store-sensing gate controls Ca²⁺ waves and Ca²⁺-triggered arrhythmias. *Nat. Med.* **20**:184–192. doi: 10.1038/nm.3440.
- Chicurel ME**, Harris KM. 1992. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* **325**:169–182. doi: 10.1002/cne.903250204.
- Claiborne BJ**, Amaral DG, Cowan WM. 1986. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* **246**:435–458. doi: 10.1002/cne.902460403.
- Connor B**, Young D, Yan Q, Faull RL, Synek B, Dragunow M. 1997. Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **49**:71–81.
- Cooney JR**, Hurlburt JL, Selig DK, Harris KM, Fiala JC. 2002. Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J. Neurosci.* **22**:2215–2224.
- Danielson NB**, Turi GF, Ladow M, Chavlis S, Petrantonakis PC, Poirazi P, Losonczy A. 2017. In Vivo Imaging of Dentate Gyrus Mossy Cells in Behaving Mice. *Neuron* **93**:552-559.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2016.12.019.
- Deller T**, Bas Orth C, Del Turco D, Vlachos A, Burbach GJ, Drakew A, Chabanis S, Korte M, Schwegler H, Haas CA, Frotscher M. 2007. A role for synaptopodin and the spine apparatus in hippocampal synaptic plasticity. *Ann. Anat.* **189**:5–16. doi: 10.1016/j.aanat.2006.06.013.
- Deller T**, Korte M, Chabanis S, Drakew A, Schwegler H, Stefani GG, Zuniga A, Schwarz K, Bonhoeffer T, Zeller R, Frotscher M, Mundel P. 2003. Synaptopodin-deficient mice lack a

- spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *PNAS* **100**:10494–10499. doi: 10.1073/pnas.1832384100.
- Deller T**, Merten T, Roth SU, Mundel P, Frotscher M. 2000. Actin-associated protein synaptopodin in the rat hippocampal formation: Localization in the spine neck and close association with the spine apparatus of principal neurons. *J. Comp. Neurol.* **418**:164–181. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(20000306)418:2<164::AID-CNE4>3.0.CO;2-0.
- Denk W**, Delaney KR, Gelperin A, Kleinfeld D, Strowbridge BW, Tank DW, Yuste R. 1994. Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy. *J. Neurosci. Methods* **54**:151–162. doi: 10.1016/0165-0270(94)90189-9.
- Denk W**, Strickler J, Webb W. 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**:73–76. doi: 10.1126/science.2321027.
- Dieni S**, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, Gundelfinger ED, Kojima M, Nestel S, Frotscher M, Barde Y-A. 2012. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J. Cell Biol.* **196**:775–788. doi: 10.1083/jcb.201201038.
- Dodt H-U**, Zieglgänsberger W. 1994. Infrared videomicroscopy: A new look at neuronal structure and function. *Trends Neurosci.* **17**:453–458. doi: 10.1016/0166-2236(94)90130-9.
- Drakew A**, Klatt N, Tippmann A, Hoffmann T, Vida I, Deller T, Frotscher M. 2007. *The spine apparatus shapes calcium transients in dendritic spines: Two-photon laser scanning microscopy-based calcium imaging at individual synapses in organotypic slice cultures.* Program No. 470.12/L5. 2007 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience. Online.
- Duffy AM**, Schaner MJ, Chin J, Scharfman HE. 2013. Expression of c-fos in hilar mossy cells of the dentate gyrus in vivo. *Hippocampus* **23**:649–655. doi: 10.1002/hipo.22138.
- Emptage NJ**, Bliss TV, Fine A. 1999. Single Synaptic Events Evoke NMDA Receptor-Mediated Release of Calcium from Internal Stores in Hippocampal Dendritic Spines. *Neuron* **22**:115–124. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80683-2.
- Feske S**. 2007. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:690–702. doi: 10.1038/nri2152.
- Fifkova E**, Markham JA, Delay RJ. 1983. Calcium in the spine apparatus of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Brain Res.* **266**:163–168.
- Fill M**, Coronado R. 1988. Ryanodine receptor channel of sarcoplasmic reticulum. *Trends Neurosci.* **11**:453–457.
- Fino E**, Araya R, Peterka DS, Salierno M, Etchenique R, Yuste R. 2009. RuBi-Glutamate: Two-Photon and Visible-Light Photoactivation of Neurons and Dendritic spines. *Front. Neural Circuits* **3**:2. doi: 10.3389/neuro.04.002.2009.
- Freguelli BG**, Potier B, Slater NT, Alford S, Collingridge GL. 1993. Metabotropic glutamate receptors and calcium signalling in dendrites of hippocampal CA1 neurones. *Neuropharmacology* **32**:1229–1237.
- Freund TF**, Buzsáki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* **6**:347–470. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I.
- Friel DD**, Tsien RW. 1992. A caffeine- and ryanodine-sensitive Ca²⁺ store in bullfrog sympathetic neurones modulates effects of Ca²⁺ entry on [Ca²⁺]_i. *J. Physiol.* **450**:217–246. doi: 10.1113/jphysiol.1992.sp019125.
- Frotscher M**. 1989. Mossy fiber synapses on glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons: Evidence for feed-forward inhibition in the CA3 region of the hippocampus. *Exp. Brain Res.* **75**:441–445. doi: 10.1007/BF00247950.
- Frotscher M**. 2000. Role of Afferent Innervation and Neuronal Activity in Dendritic Development and Spine Maturation of Fascia Dentata Granule Cells. *Cereb. Cortex* **10**:946–951. doi: 10.1093/cercor/10.10.946.

- Frotscher M**, Gähwiler BH. 1988. Synaptic organization of intracellularly stained CA3 pyramidal neurons in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience* **24**:541–551. doi: 10.1016/0306-4522(88)90348-X.
- Frotscher M**, Seress L, Schwerdtfeger WK, Buhl E. 1991. The mossy cells of the fascia dentata: a comparative study of their fine structure and synaptic connections in rodents and primates. *J. Comp. Neurol.* **312**:145–163. doi: 10.1002/cne.903120111.
- Gähwiler BH**. 1981. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* **4**:329–342. doi: 10.1016/0165-0270(81)90003-0.
- Galimberti I**, Gogolla N, Alberi S, Santos AF, Müller D, Caroni P. 2006. Long-term rearrangements of hippocampal mossy fiber terminal connectivity in the adult regulated by experience. *Neuron* **50**:749–763. doi: 10.1016/j.neuron.2006.04.026.
- Geiger JR**, Jonas P. 2000. Dynamic Control of Presynaptic Ca²⁺ Inflow by Fast-Inactivating K⁺ Channels in Hippocampal Mossy Fiber Boutons. *Neuron* **28**:927–939. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00164-1.
- GoodSmith D**, Chen X, Wang C, Kim SH, Song H, Burgalossi A, Christian KM, Knierim JJ. 2017. Spatial Representations of Granule Cells and Mossy Cells of the Dentate Gyrus. *Neuron* **93**:677–690.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2016.12.026.
- Göppert-Mayer M**. 1931. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.* **401**:273–294. doi: 10.1002/andp.19314010303.
- Gordienko DV**, Bolton TB. 2002. Crosstalk between ryanodine receptors and IP 3 receptors as a factor shaping spontaneous Ca²⁺-release events in rabbit portal vein myocytes. *J. Physiol.* **542**:743–762. doi: 10.1113/jphysiol.2001.015966.
- Granger AJ**, Nicoll RA. 2014. Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view, 10 years on. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **369**:20130136. doi: 10.1098/rstb.2013.0136.
- Gray EG**. 1959. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: An electron microscope study. *J. Anat.* **93**:420–433.
- Hamill OP**, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**:85–100. doi: 10.1007/BF00656997.
- Hamlyn LH**. 1961a. Electron microscopy of mossy fibre endings in Ammon's horn. *Nature* **190**:645–646.
- Hamlyn LH**. 1961b. Electron Microscopy of Mossy Fibre Endings in Ammon's Horn. *Nature* **190**:645–646. doi: 10.1038/190645a0.
- Hamlyn LH**. 1962. The fine structure of the mossy fibre endings in the hippocampus of the rabbit. *J. Anat.* **96**:112–120.
- Harris EW**, Cotman CW. 1986. Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl d-aspartate antagonists. *Neurosci. Lett.* **70**:132–137. doi: 10.1016/0304-3940(86)90451-9.
- 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**:2685–2705.
- Hartmann J**, Karl RM, Alexander RPD, Adelsberger H, Brill MS, Ruhlmann C, Ansel A, Sakimura K, Baba Y, Kurosaki T, Misgeld T, Konnerth A. 2014. STIM1 controls neuronal Ca²⁺(+) signaling, mGluR1-dependent synaptic transmission, and cerebellar motor behavior. *Neuron* **82**:635–644. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.027.
- Harvey CD**, Yasuda R, Zhong H, Svoboda K. 2008. The spread of Ras activity triggered by activation of a single dendritic spine. *Science* **321**:136–140. doi: 10.1126/science.1159675.
- Hebb DO**. 1949. *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. Wiley, New York.

- Heimrich B**, Frotscher M. 1991. Differentiation of dentate granule cells in slice cultures of rat hippocampus: a Golgi/electron microscopic study. *Brain Res.* **538**:263–268.
- Helmchen F**, Denk W. 2005. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods* **2**:932–940. doi: 10.1038/nmeth818.
- Henze DA**, Buzsaki G. 2007. Hilar mossy cells: functional identification and activity in vivo. *Prog. Brain Res.* **163**:199–216. doi: 10.1016/S0079-6123(07)63012-X.
- Henze DA**, Urban NN, Barrionuevo G. 2000. The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience* **98**:407–427.
- Hjorth-Simonsen A**, Jeune B. 1972. Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J. Comp. Neurol.* **144**:215–232. doi: 10.1002/cne.901440206.
- Jackson MB**, Scharfman HE. 1996. Positive feedback from hilar mossy cells to granule cells in the dentate gyrus revealed by voltage-sensitive dye and microelectrode recording. *J. Neurophysiol.* **76**:601–616.
- Jaffe DB**, Brown TH. 1997. Calcium dynamics in thorny excrescences of CA3 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* **78**:10–18.
- Jaffe DB**, Fisher SA, Brown TH. 1994. Confocal laser scanning microscopy reveals voltage-gated calcium signals within hippocampal dendritic spines. *J. Neurobiol.* **25**:220–233. doi: 10.1002/neu.480250303.
- Jaffe DB**, Johnston D. 1990. Induction of long-term potentiation at hippocampal mossy-fiber synapses follows a Hebbian rule. *J. Neurophysiol.* **64**:948–960.
- Jonas P**, Major G, Sakmann B. 1993. Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *J. Physiol.* **472**:615–663.
- Kapur A**, Yeckel MF, Gray R, Johnston D. 1998. L-Type calcium channels are required for one form of hippocampal mossy fiber LTP. *J. Neurophysiol.* **79**:2181–2190.
- Kerr AM**, Jonas P. 2008. The two sides of hippocampal mossy fiber plasticity. *Neuron* **57**:5–7. doi: 10.1016/j.neuron.2007.12.015.
- Kitamura K**, Judkewitz B, Kano M, Denk W, Hausser M. 2008. Targeted patch-clamp recordings and single-cell electroporation of unlabeled neurons in vivo. *Nat. Methods* **5**:61–67. doi: 10.1038/nmeth1150.
- Klejman ME**, Gruszczynska-Biegala J, Skibinska-Kijek A, Wisniewska MB, Misztal K, Blazejczyk M, Bojarski L, Kuznicki J. 2009. Expression of STIM1 in brain and puncta-like co-localization of STIM1 and ORA1 upon depletion of Ca(2+) store in neurons. *Neurochem. Int.* **54**:49–55. doi: 10.1016/j.neuint.2008.10.005.
- Kobayashi K**. 2010. Hippocampal Mossy Fiber Synaptic Transmission and Its Modulation. In: Litwack G, ed. *Hormones of the limbic system*. Academic Press, Amsterdam.
- Koester HJ**, Sakmann B. 1998. Calcium dynamics in single spines during coincident pre- and postsynaptic activity depend on relative timing of back-propagating action potentials and subthreshold excitatory postsynaptic potentials. *PNAS* **95**:9596–9601.
- Korkotian E**, Frotscher M, Segal M. 2014. Synaptopodin regulates spine plasticity: mediation by calcium stores. *J. Neurosci.* **34**:11641–11651. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0381-14.2014.
- Kovalchuk Y**, Eilers J, Lisman J, Konnerth A. 2000. NMDA receptor-mediated subthreshold Ca(2+) signals in spines of hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **20**:1791–1799.
- Kowalski J**, Geuting M, Paul S, Dieni S, Laurens J, Zhao S, Drakew A, Haas CA, Frotscher M, Vida I. 2010. Proper layering is important for precisely timed activation of hippocampal mossy cells. *Cereb. Cortex* **20**:2043–2054. doi: 10.1093/cercor/bhp267.
- Kremerskothen J**, Plaas C, Kindler S, Frotscher M, Barnekow A. 2005. Synaptopodin, a molecule involved in the formation of the dendritic spine apparatus, is a dual actin/alpha-actinin binding protein. *J. Neurochem.* **92**:597–606. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02888.x.

- Kwon H-B**, Castillo PE. 2008. Long-term potentiation selectively expressed by NMDA receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* **57**:108–120. doi: 10.1016/j.neuron.2007.11.024.
- Lake BB**, Ai R, Kaeser GE, Salathia NS, Yung YC, Liu R, Wildberg A, Gao D, Fung H-L, Chen S, Vijayaraghavan R, Wong J, Chen A, Sheng X, Kaper F, Shen R, Ronaghi M, Fan J-B, Wang W, Chun J, Zhang K. 2016. Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain. *Science* **352**:1586–1590. doi: 10.1126/science.aaf1204.
- Laurberg S**, Sørensen KE. 1981. Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (Hilus fasciae dentatae and subfield CA3). *Brain Res.* **212**:287–300. doi: 10.1016/0006-8993(81)90463-7.
- Lipscombe D**, Madison DV, Poenie M, Reuter H, Tsien RW, Tsien RY. 1988. Imaging of cytosolic Ca²⁺ transients arising from Ca²⁺ stores and Ca²⁺ channels in sympathetic neurons. *Neuron* **1**:355–365. doi: 10.1016/0896-6273(88)90185-7.
- Lisman J**, Schulman H, Cline H. 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**:175–190. doi: 10.1038/nrn753.
- Lisman JE**. 1999. Relating hippocampal circuitry to function: Recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions. *Neuron* **22**:233–242.
- Litwack G**, ed. 2010. *Hormones of the limbic system*. Academic Press, Amsterdam.
- Lomo T**. 1971. Patterns of activation in a monosynaptic cortical pathway: The perforant path input to the dentate area of the hippocampal formation. *Exp. Brain Res.* **12**:18–45.
- Magee J**, Johnston D. 1995. Synaptic activation of voltage-gated channels in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Science* **268**:301–304. doi: 10.1126/science.7716525.
- Maier W**, Corrie JET, Papageorgiou G, Laube B, Grever C. 2005. Comparative analysis of inhibitory effects of caged ligands for the NMDA receptor. *J. Neurosci. Methods* **142**:1–9. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.07.006.
- Mainen ZF**, Malinow R, Svoboda K. 1999. Synaptic calcium transients in single spines indicate that NMDA receptors are not saturated. *Nature* **399**:151–155. doi: 10.1038/20187.
- Malenka RC**. 1999. Long-Term Potentiation--A Decade of Progress? *Science* **285**:1870–1874. doi: 10.1126/science.285.5435.1870.
- Malenka RC**, Bear MF. 2004. LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron* **44**:5–21. doi: 10.1016/j.neuron.2004.09.012.
- Maruo T**, Mandai K, Takai Y, Mori M. 2016. Activity-dependent alteration of the morphology of a hippocampal giant synapse. *Mol. Cell. Neurosci.* **71**:25–33. doi: 10.1016/j.mcn.2015.12.005.
- Maske H**. 1955. Über den topochemischen Nachweis von Zink im Ammonshorn verschiedener Säugetiere. *Naturwissenschaften* **42**:424. doi: 10.1007/BF00601955.
- McGinty JF**, Henriksen SJ, Goldstein A, Terenius L, Bloom FE. 1983. Dynorphin is contained within hippocampal mossy fibers: Immunochemical alterations after kainic acid administration and colchicine-induced neurotoxicity. *PNAS* **80**:589–593.
- McPherson PS**, Kim YK, Valdivia H, Knudson CM, Takekura H, Franzini-Armstrong C, Coronado R, Campbell KP. 1991. The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron* **7**:17–25.
- Mellor J**, Nicoll RA. 2001. Hippocampal mossy fiber LTP is independent of postsynaptic calcium. *Nat. Neurosci.* **4**:125–126. doi: 10.1038/83941.
- Miller R**. 1991. The control of neuronal Ca²⁺ homeostasis. *Prog. Neurobiol.* **37**:255–285. doi: 10.1016/0301-0082(91)90028-Y.
- Miyawaki A**, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY. 1997. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**:882–887. doi: 10.1038/42264.
- Moore KA**, Nicoll RA, Schmitz D. 2003. Adenosine gates synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *PNAS* **100**:14397–14402. doi: 10.1073/pnas.1835831100.

- Mori M**, Abegg MH, Gähwiler BH, Gerber U. 2004. A frequency-dependent switch from inhibition to excitation in a hippocampal unitary circuit. *Nature* **431**:453–456. doi: 10.1038/nature02854.
- Mori M**, Gähwiler BH, Gerber U. 2007. Recruitment of an inhibitory hippocampal network after bursting in a single granule cell. *PNAS* **104**:7640–7645. doi: 10.1073/pnas.0702164104.
- Moser EI**. 2011. The multi-laned hippocampus. *Nat. Neurosci.* **14**:407–408. doi: 10.1038/nn.2783.
- Mundel P**, Heid HW, Mundel TM, Krüger M, Reiser J, Kriz W. 1997. Synaptopodin: An Actin-associated Protein in Telencephalic Dendrites and Renal Podocytes. *J. Cell Biol.* **139**:193–204.
- Nakai J**, Ohkura M, Imoto K. 2001. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature biotechnology* **19**:137–141. doi: 10.1038/84397.
- Neuhäuser M**, Ruxton GD. 2009. Distribution-free two-sample comparisons in the case of heterogeneous variances. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **63**:617–623. doi: 10.1007/s00265-008-0683-4.
- Nicoll RA**, Malenka RC. 1995. Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **377**:115–118. doi: 10.1038/377115a0.
- Nicoll RA**, Schmitz D. 2005. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**:863–876. doi: 10.1038/nrn1786.
- Nimchinsky EA**, Yasuda R, Oertner TG, Svoboda K. 2004. The number of glutamate receptors opened by synaptic stimulation in single hippocampal spines. *J. Neurosci.* **24**:2054–2064. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5066-03.2004.
- Nusser Z**, Lujan R, Laube G, Roberts JB, Molnar E, Somogyi P. 1998. Cell Type and Pathway Dependence of Synaptic AMPA Receptor Number and Variability in the Hippocampus. *Neuron* **21**:545–559. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80565-6.
- Ozawa T**. 2010. Modulation of ryanodine receptor Ca²⁺ channels (Review). *Mol. Med. Rep.* **3**:199–204. doi: 10.3892/mmr_00000240.
- Peters A**, Proskauer CC, Kaiserman-Abramof IR. 1968. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The axon hillock and initial segment. *J. Cell Biol.* **39**:604–619.
- Peticolas WL**, Rieckhoff KE. 1963. Double-Photon Excitation of Organic Molecules in Dilute Solution. *The Journal of Chemical Physics* **39**:1347–1348. doi: 10.1063/1.1734440.
- Petrozzino JJ**, Pozzo Miller LD, Connor JA. 1995. Micromolar Ca²⁺ transients in dendritic spines of hippocampal pyramidal neurons in brain slice. *Neuron* **14**:1223–1231. doi: 10.1016/0896-6273(95)90269-4.
- Pierce JP**, Mayer T, McCarthy JB. 2001. Evidence for a satellite secretory pathway in neuronal dendritic spines. *Curr. Biol.* **11**:351–355.
- Pierce JP**, van Leyen K, McCarthy JB. 2000. Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in dendritic spines. *Nat. Neurosci.* **3**:311–313. doi: 10.1038/73868.
- Putney JW, JR**. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**:1–12.
- Racca C**, Stephenson FA, Streit P, Roberts JD, Somogyi P. 2000. NMDA receptor content of synapses in Stratum radiatum of the hippocampal CA1 area. *J. Neurosci.* **20**:2512–2522.
- Ramón y Cajal S**. 1911. *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés*. Maloine, Paris.
- Rebola N**, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA. 2005. Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A_{2A} receptors in the hippocampus and striatum of the rat. *Neuroscience* **132**:893–903. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.01.014.
- Rebola N**, Carta M, Lanore F, Blanchet C, Mulle C. 2011. NMDA receptor-dependent metaplasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Nat. Neurosci.* **14**:691–693. doi: 10.1038/nn.2809.

- Rebola N**, Lujan R, Cunha RA, Mulle C. 2008. Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* **57**:121–134. doi: 10.1016/j.neuron.2007.11.023.
- Reid CA**, Fabian-Fine R, Fine A. 2001. Postsynaptic calcium transients evoked by activation of individual hippocampal mossy fiber synapses. *J. Neurosci.* **21**:2206–2214.
- Ribak CE**, Seress L, Amaral DG. 1985. The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J. Neurocytol.* **14**:835–857.
- Richardson MJE**, Silberberg G. 2008. Measurement and analysis of postsynaptic potentials using a novel voltage-deconvolution method. *J. Neurophysiol.* **99**:1020–1031. doi: 10.1152/jn.00942.2007.
- Riedemann T**, Polder HR, Sutor B. 2016. Determination and compensation of series resistances during whole-cell patch-clamp recordings using an active bridge circuit and the phase-sensitive technique. *Pflugers Arch.* **468**:1725–1740. doi: 10.1007/s00424-016-1868-8.
- Rollenhagen A**, Lübke JHR. 2010. The mossy fiber bouton: the "common" or the "unique" synapse? *Front. Synaptic Neurosci.* **2**:2. doi: 10.3389/fnsyn.2010.00002.
- Rolls ET**, Treves A, Robertson RG, Georges-Francois P, Panzeri S. 1998. Information about spatial view in an ensemble of primate hippocampal cells. *J. Neurophysiol.* **79**:1797–1813.
- Ropireddy D**, Ascoli GA. 2011. Potential Synaptic Connectivity of Different Neurons onto Pyramidal Cells in a 3D Reconstruction of the Rat Hippocampus. *Front. Neuroinform.* **5**:5. doi: 10.3389/fninf.2011.00005.
- Sabatini BL**, Maravall M, Svoboda K. 2001. Ca(2+) signaling in dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**:349–356. doi: 10.1016/S0959-4388(00)00218-X.
- Sabatini BL**, Oertner TG, Svoboda K. 2002. The life cycle of Ca(2+) ions in dendritic spines. *Neuron* **33**:439–452.
- Scharfman HE**, Schwartzkroin PA. 1988. Electrophysiology of morphologically identified mossy cells of the dentate hilus recorded in guinea pig hippocampal slices. *J. Neurosci.* **8**:3812–3821.
- Scheipl F**, Kneib T. 2009. Locally adaptive Bayesian P-splines with a Normal-Exponential-Gamma prior. *Comput. Stat. Data Anal.* **53**:3533–3552. doi: 10.1016/j.csda.2009.03.009.
- Schmitz D**, Mellor J, Breustedt J, Nicoll RA. 2003. Presynaptic kainate receptors impart an associative property to hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *Nat. Neurosci.* **6**:1058–1063. doi: 10.1038/nn1116.
- Schmitz D**, Mellor J, Nicoll RA. 2001. Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science* **291**:1972–1976. doi: 10.1126/science.1057105.
- Senzai Y**, Buzsaki G. 2017. Physiological Properties and Behavioral Correlates of Hippocampal Granule Cells and Mossy Cells. *Neuron* **93**:691-704.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2016.12.011.
- Seress L**, Ribak CE. 1984. Direct commissural connections to the basket cells of the hippocampal dentate gyrus: Anatomical evidence for feed-forward inhibition. *J. Neurocytol.* **13**:215–225.
- Shmigol A**, Verkhatsky A, Isenberg G. 1995. Calcium-induced calcium release in rat sensory neurons. *J. Physiol.* **489**:627–636.
- Sik A**, Penttonen M, Buzsaki G. 1997. Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: an in vivo intracellular study. *Eur. J. Neurosci.* **9**:573–588.
- Sloviter RS**, Brisman JL. 1995. Lateral inhibition and granule cell synchrony in the rat hippocampal dentate gyrus. *J. Neurosci.* **15**:811–820.
- Sloviter RS**, Lomo T. 2012. Updating the lamellar hypothesis of hippocampal organization. *Front. Neural Circuits* **6**:102. doi: 10.3389/fncir.2012.00102.

- Soltesz I**, Bourassa J, Descheˆnes M. 1993. The behavior of mossy cells of the rat dentate gyrus during theta oscillations in vivo. *Neuroscience* **57**:555–564. doi: 10.1016/0306-4522(93)90005-Z.
- 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.
- Spruston N**, Jonas P, Sakmann B. 1995. Dendritic glutamate receptor channels in rat hippocampal CA3 and CA1 pyramidal neurons. *J. Physiol.* **482**:325–352. doi: 10.1113/jphysiol.1995.sp020521.
- Stoppini L**, Buchs P-A, Muller D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* **37**:173–182. doi: 10.1016/0165-0270(91)90128-M.
- Storm-Mathisen J**, Zimmer J, Ottersen OP, Blackstad TW, eds. 1990. *Understanding the brain through the hippocampus: The hippocampal region as a model for studying brain structure and function / edited by J. Storm-Mathisen, J. Zimmer, and O.P. Ottersen.* Elsevier, Amsterdam, Oxford.
- Struble RG**, Desmond NL, Levy WB. 1978. Anatomical evidence for interlamellar inhibition in the fascia dentata. *Brain Res.* **152**:580–585.
- Svoboda K**, Mainen ZF. 1999. Synaptic [Ca²⁺]. *Neuron* **22**:427–430. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80698-4.
- Takemura H**, Putney JW, JR. 1989. Capacitative calcium entry in parotid acinar cells. *Biochem. J.* **258**:409–412.
- Tamamaki N**, Nojyo Y. 1993. Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin. *Hippocampus* **3**:471–480. doi: 10.1002/hipo.450030408.
- Tippmann A**. Dissertation. 2014. *Die Rolle des Spine Apparates als Kalzium-Speicher wahrend der synaptischen Transmission: Kombination von Zwei-Photonen Kalzium-Imaging mit Glutamat-Uncaging an individuellen Synapsen in organotypischen Schnittkulturen.* Dissertation.
- Tyzio R**, Ivanov A, Bernard C, Holmes GL, Ben-Ari Y, Khazipov R. 2003. Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. *J. Neurophysiol.* **90**:2964–2972. doi: 10.1152/jn.00172.2003.
- Urban NN**, Barrionuevo G. 1996. Induction of hebbian and non-hebbian mossy fiber long-term potentiation by distinct patterns of high-frequency stimulation. *J. Neurosci.* **16**:4293–4299.
- Urban NN**, Henze DA, Barrionuevo G. 2001. Revisiting the role of the hippocampal mossy fiber synapse. *Hippocampus* **11**:408–417. doi: 10.1002/hipo.1055.
- Vogt K**, Mellor J, Tong G, Nicoll RA. 2000. The Actions of Synaptically Released Zinc at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Neuron* **26**:187–196. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81149-6.
- Vyleta NP**, Borges-Merjane C, Jonas P. 2016. Plasticity-dependent, full detonation at hippocampal mossy fiber-CA3 pyramidal neuron synapses. *Elife* **5**:e17977. doi: 10.7554/eLife.17977.
- Vyleta NP**, Jonas P. 2014. Loose coupling between Ca²⁺ channels and release sensors at a plastic hippocampal synapse. *Science* **343**:665–670. doi: 10.1126/science.1244811.
- Wilcox RR**. 2012. *Introduction to robust estimation and hypothesis testing, 3rd edn.* Academic Press, San Diego.
- Wilcoxon F**. 1945. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin* **1**:80. doi: 10.2307/3001968.
- Williams S**, Johnston D. 1989. Long-term potentiation of hippocampal mossy fiber synapses is blocked by postsynaptic injection of calcium chelators. *Neuron* **3**:583–588. doi: 10.1016/0896-6273(89)90268-7.

- Woodruff ML**, Sampath AP, Matthews HR, Krasnoperova NV, Lem J, Fain GL. 2002. Measurement of cytoplasmic calcium concentration in the rods of wild-type and transducin knock-out mice. *J. Physiol.* **542**:843–854. doi: 10.1113/jphysiol.2001.013987.
- Wu LG**, Saggau P. 1994. Presynaptic calcium is increased during normal synaptic transmission and paired-pulse facilitation, but not in long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. *J. Neurosci.* **14**:645–654.
- Yan Q**, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennett L, Welcher AA. 1997. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* **78**:431–448.
- Yasuda R**, Nimchinsky EA, Scheuss V, Pologruto TA, Oertner TG, Sabatini BL, Svoboda K. 2004. Imaging calcium concentration dynamics in small neuronal compartments. *Sci. STKE* **2004**:pl5. doi: 10.1126/stke.2192004pl5.
- Yeckel MF**, Kapur A, Johnston D. 1999. Multiple forms of LTP in hippocampal CA3 neurons use a common postsynaptic mechanism. *Nat. Neurosci.* **2**:625–633. doi: 10.1038/10180.
- Yoshino M**, Sawada S, Yamamoto C, Kamiya H. 1996. A metabotropic glutamate receptor agonist DCG-IV suppresses synaptic transmission at mossy fiber pathway of the guinea pig hippocampus. *Neurosci. Lett.* **207**:70–72. doi: 10.1016/0304-3940(96)12486-1.
- Yuste R**, Denk W. 1995. Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* **375**:682–684. doi: 10.1038/375682a0.
- Yuste R**, Majewska A, Cash SS, Denk W. 1999. Mechanisms of Calcium Influx into Hippocampal Spines: Heterogeneity among Spines, Coincidence Detection by NMDA Receptors, and Optical Quantal Analysis. *J. Neurosci.* **19**:1976–1987.
- Zalutsky R**, Nicoll R. 1990. Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science* **248**:1619–1624. doi: 10.1126/science.2114039.
- Zimmer J**, Gahwiler BH. 1984. Cellular and connective organization of slice cultures of the rat hippocampus and fascia dentata. *J. Comp. Neurol.* **228**:432–446. doi: 10.1002/cne.902280310.
- Zipfel WR**, Williams RM, Christie R, Nikitin AY, Hyman BT, Webb WW. 2003. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *PNAS* **100**:7075–7080. doi: 10.1073/pnas.0832308100.

8 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem kürzlich verstorbenen Doktorvater Herrn Prof. Michael Frotscher. Ich danke Ihn für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut anfertigen zu können und für seine wertvolle Unterstützung in den vergangenen Jahren in Freiburg und Hamburg. Ich werde Ihn stets in bester Erinnerung an diese sehr lehrreiche Zeit halten.

Herrn Prof. Thomas Oertner möchte ich an dieser Stelle herzlich danken, dass er sich kurzerhand bereit erklärt hat, das Erstgutachten zu übernehmen. In diesem Sinne bedanke ich mich ebenfalls herzlich bei Herrn Prof. Christian Lohr für das Interesse und die Bereitschaft, sich als Zweitgutachten zur Verfügung zu stellen.

Mein Dank geht im Besonderen an meinen wissenschaftlichen Mentor Herrn Dr. Alexander Drakew für die außergewöhnlich gute Betreuung und für die anspruchsvolle fachliche Ausbildung über die gesamte Promotionszeit hinweg. Seine fundierten Kenntnisse, sein technisches Verständnis und die vielseitigen Anregungen haben mein Interesse stets befeuert und damit diese Arbeit erst ermöglicht. Bei Engpässen war immer auf seine Hilfe Verlass.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Kollegen des Instituts für Strukturelle Neurobiologie bedanken, besonders bei Dung Ludwig und Janine Grawe für die sachkundige Hilfe in der Gewebekultur sowie bei Frau Dr. Bianka Brunne und Jasmin Pahle für die kompetente Hilfe bei der Organisation der Mauszucht. Für die engagierte und gut strukturierte Organisation des „Inst_Fro“-Labors geht mein Dank an Janice Graw.

Zudem möchte ich mich bei Silvana Deutsch und Kristian Schacht für die langjährige Betreuung der Synpo-Mäuse bedanken. Weiterhin bestand seitens der ZMNH-Werkstatt stets die Bereitschaft zu technisch versierter Unterstützung, wofür ich Torsten Renz und Fritz Kutschera herzlich danken möchte.

Bei meiner Mutter bedanke ich mich sehr für die fortwährende Unterstützung in der Zeit des Studiums und der Promotion - und natürlich für das Korrekturlesen.

Meiner Frau Anne und meiner kleinen Tochter Edda widme ich diese Arbeit und danke für die vielen wunderbaren Familienmomente, die mich durch diese Zeit gebracht haben.