

Untersuchung der synaptischen
Neurotransmitterfreisetzung
mit kombiniert elektrophysiologischen
und bildgebenden Verfahren

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Albrecht Sigler
aus Gadderbaum (Bielefeld)

Göttingen 2005

D7

Referent: Prof. Dr. Jürgen Troe

Koreferent: Prof. Dr. Axel Zeeck

Tag der mündlichen Prüfung: 27. April 2005

Zusammenfassung

Neuronale Netzwerke im Gehirn bestehen aus exzitatorischen und inhibitorischen Nervenzellen. Die exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen spielen offensichtlich unterschiedliche Rollen im funktionalen Netzwerk, denn die von exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen freigesetzten Neurotransmitter haben unter nativen Bedingungen auf die empfangenen Neuronen einen entgegengesetzten Effekt. Es ist sehr naheliegend, daß Synapsen, die so unterschiedlich wirkende Neurotransmitter freisetzen, sich auch morphologisch und in der Funktionsweise des zugrundeliegenden Freisetzungsprozesses unterscheiden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, experimentell zu überprüfen, ob exzitatorische und inhibitorische Synapsen tatsächlich unterschiedliche funktionale Eigenschaften haben. Dazu wurden Neuronen aus primärer autaptischer Zellkultur von Gewebe aus dem Hippocampus beziehungsweise Striatum der Maus gewonnen, mit der Patch-Clamp-Technik in Kombination mit bildgebenden Verfahren funktional untersucht und miteinander verglichen. Zum Einsatz kamen dabei Färbungen mit dem Styrylfarbstoff FM1-43 sowie immunozytochemische Färbefahrten.

An den so untersuchten inhibitorischen Neuronen ließen sich jeweils im Mittel etwa halb so viele Synapsen zählen wie die an exzitatorischen. Für den Anteil aktiver Synapsen wurde in beiden Gruppen indes ein ungefähr gleicher Wert bestimmt. Exzitatorische Synapsen setzten aber dreimal häufiger einzelne Vesikel spontan frei. An den inhibitorischen Synapsen wurde dagegen jeweils eine ungefähr dreimal größere vesikuläre und synaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit gefunden als an den exzitatorischen. Offenbar sind inhibitorische Synapsen an die Erfordernisse ihrer allgemeinen Funktion im Gehirn als Regulationsglieder und Zeitgeber durch eine besonders hohe Effizienz und Zuverlässigkeit ihrer synaptischen Transmission angepaßt.

Mit der gleichen kombinierten Untersuchungstechnik aus elektrophysiologischen und bildgebenden Verfahren wurden auch Neuronen untersucht, denen die genetische Information für die Expression der synaptischen Proteine Munc13-1, Munc13-2, Bassoon oder VGLUT1 fehlten. An solchen Zellen gelang es, die jeweiligen Phänotypen zu beschreiben und darauf basierend den Proteinen eine Funktion bei der synaptischen Freisetzung von Neurotransmittern zuzuordnen. Derartige Befunde sind potentiell wichtig, um künftig die elementaren Mechanismen der Signalverarbeitung durch Synapsen im Gehirn auf molekularer und zellulärer Ebene auch beim Menschen besser verstehen zu können.

English Summary

Neuronal networks in the brain are comprised of a mixture of excitatory and inhibitory neurons. The excitatory and inhibitory cells play distinct roles in the functional network since the excitatory and inhibitory neurotransmitters naturally have opposite effects on the receiving neuron. It is thought that synapses that release neurotransmitters that are functionally distinct, can be distinguished based not only on their morphology but also based on different molecular mechanisms of synaptic transmission and plasticity. The goal of this project was to determine if excitatory and inhibitory synapses indeed display different properties of synaptic transmission. Neurons from mouse hippocampus and striatum tissue were grown in primary autaptic cell culture and functionally characterized with patch-clamp techniques in combination with FM1-43 dye imaging.

With this approach, several parameters were determined. The number of synapses was counted for each neuron. On average, autaptic inhibitory neurons had only half as many synapses as autaptic excitatory neurons. The fraction of active synapses, however, was similar for both. Excitatory synapses nevertheless showed a three-fold higher frequency of spontaneous release of single vesicles, although the size of the readily releasable pool was smaller than in inhibitory cells. In contrast, the synaptic release probability was found to be about three times larger in inhibitory neurons compared with excitatory neurons. These findings underscore the distinct functional needs of inhibitory synapses in neuronal networks of the brain.

Furthermore, neurons deficient for the synaptic proteins Munc13-1, Munc13-2, Bassoon, or VGLUT1 were examined with the combined electrophysiological and imaging techniques. The observed phenotypes led to the assignment of the proteins to their apparent function in the mechanism of neurotransmitter release of a neuronal synapse. These studies thereby contribute to the understanding of elementary mechanisms of signal processing in the brain at the molecular and cellular level.

Gliederung

1. Einleitung	1
Organische Basis von Gedächtnis und Informationsverarbeitung im Gehirn – Zelluläre Grundlagen: Signalübertragung zwischen Neuronen – Molekulare Mechanismen der synaptischen Signalübertragung	
2. Material und Methoden	11
Autaptische Zellkultur – Elektrophysiologischer Versuchsaufbau / <i>Patch-Clamp</i> -Technik – Versuchsaufbau der kombinierten elektrophysiologischen und bildgebenden Messungen – Identifikation aktiver Synapsen mittels FM1-43-Färbung – Immunocytochemische Identifikation von Synapsen – Das Zählen der Synapsen – Visuelle Zählmethodik der Synapsen – Direkte Kolo-kalisation von FM1-43- und immunocytochemischer Färbungen – Fixierung von FM1-43fx	
3. Ergebnisse	
I. Morphologie exzitatorischer und inhibitorischer Neuronen	39
Spezifische Färbung von Neuronen – Spezifische Färbung von Synapsen	
II. Elektrophysiologische Charakterisierung der Neuronen	49
Spontane Neurotransmitter-Freisetzung – Größenbestimmung des synaptischen Vorrats an freisetzungskompetenten Vesikeln (<i>readily releasable pool</i>) – Bestimmung synaptischer Parameter – Bestimmung der „synaptischen Freisetzungswahrscheinlichkeit“ – Vergleich des synaptischen Vesikelvorrats – Vergleich der Häufigkeit spontaner Freisetzungseignisse – Übersicht: Vergleich exzitatorischer mit inhibitorischen Synapsen	
III. Die Rolle von Munc13-1 bei synaptischer Transmission	68
Charakterisierung des Phänotyps der Munc13-1-Defizienz – Charakterisierung des Phänotyps in Synapsen – Charakterisierung des Phänotyps der Munc13-2-Defizienz (und der Munc13-1/2-Doppeldefizienz) – Der Einfluß von Munc13-1 und Munc13-2 auf die Plastizität exzitatorischer Synapsen – Übersicht: Phänotyp der	

Munc13-1-Defizienz und der Munc13-1/2-Doppeldefizienz in exzitatorischen Synapsen

IV. Untersuchung des Einflusses des Proteins Bassoon auf die synaptische Transmission 87

Übersicht: Phänotyp der Bassoon-Defizienz in exzitatorischen Synapsen

V. Neurotransmitter-Vesikel ohne Neurotransmitter: die Rolle von VGLUT1 94

Übersicht: Phänotyp der VGLUT1-Defizienz

4. Diskussion

I. Anmerkungen zur Kombination von elektrophysiologischen mit bildgebenden Verfahren 99

Das Modellsystem zur Untersuchung der Eigenschaften zentraler Synapsen – Prinzipielle Überlegungen zur Interpretation der erhaltenen Ergebnisse – Besondere Annahmen und Einschränkungen für die morphologischen Befunde – Besondere Einschränkungen für die elektrophysiologischen Befunde – Wie „leise“ sind die stillen, inaktiv klassifizierten Synapsen tatsächlich? – Resümee

II. Anwendung der Kombinationstechnik zur Charakterisierung mutierter Neuronen 104

Munc13-1 / Munc13-2 – Bassoon – VGLUT1

III. Diskussion: Vergleichende Untersuchungen an exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen 107

5. Literaturverzeichnis 109

6. Danksagungen 117

7. Tabellarischer Lebenslauf 119

1. Einleitung

Sich zu erinnern ist für jeden Einzelnen eine große Selbstverständlichkeit. Das findet nicht nur explizit statt, wenn man sich eine bestimmte Begebenheit oder einen Sachverhalt zu vergegenwärtigen sucht, sondern auch implizit bei jeder bewußt oder unbewußt erlernten Handlung. Welche Menge an Informationen dafür jeweils ständig abgerufen und neu gespeichert wird, wird erst anschaulich, wenn ein Teil dieses komplexen Prozesses nicht funktioniert. Die immer wieder verblüffende Leistung des Gehirnes kommt dabei nicht von ungefähr: jeder Mensch hat etwa 100 Milliarden Nervenzellen, *Neuronen*¹, in seinem Kopf, die untereinander über unzählige Synapsen miteinander in Kontakt stehen. Jedes einzelne dieser Neuronen benötigt Energie, um Aktionspotentiale übertragen zu können und um durch seine Synapsen Neurotransmitter zu anderen Neuronen zu senden. So hat die Leistung des menschlichen Gehirns auch physiologisch einen Preis, den vermutlich kein anderes Wirbeltier erbringt und den es bei den in freier Natur nur sehr begrenzt vorhandenen Nahrungsquellen auch in der Regel nicht aufbringen könnte: das Gehirn, das nur zwei Prozent der Körpermasse ausmacht, verbraucht allein etwa 20 Prozent des Ruhe-Energieumsatzes des menschlichen Körpers (Rolfe und Brown 1997).

Vor dem Hintergrund des enorm hohen Energieverbrauchs müssen neuronale Prozesse im Gehirn zugleich im höchsten Maße auf minimalen Energieverbrauch und – bei somit sehr begrenzter Redundanz – auf geringe Fehleranfälligkeit evolutiv optimiert worden sein. Besonderes Augenmerk bei der Forschung sollte demzufolge den Elementarprozessen der neuronalen Signalverarbeitung und -speicherung gelten, die den beiden genannten Anforderungen gleichermaßen genügen müssen. Wichtig wird insbesondere sein, Mechanismen der Prozesse zu formulieren, die die zerebrale Aktivität kontrollieren und synchronisieren. Das ist an sich schon eine hohe Anforderung; die logische Basis des menschlichen Gedächtnisses, also des komplexesten und am weitesten entwickelten Gehirnes in der Klasse der Wirbeltiere, elementar zu ergründen – und damit auch die Grundlage des

¹ Obwohl sich in den letzten Jahren die alternative Pluralbildung „*Neurone*“ des aus dem Griechischen abgeleiteten Wortes „*Neuron*“ vor allem in Primärquellen mehr und mehr durchzusetzen scheint, zieht der Autor vor, es dennoch bei der Hauptform „*Neuronen*“ zu belassen. Eine inzwischen antiquierte und im Gegensatz zu den beiden vorgenannten Formen in einem aktuellen Wörterbuch nicht mehr genannte weitere Alternative ist „*Neuren*“. Duden: Das große Wörterbuch der deutschen Sprache in 10 Bänden. Aktualisierte Online-Ausgabe. Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich: Dudenverlag 1999-2004.; <http://duden.de> am 10.03.2005.

individuellen Bewußtseins und der Persönlichkeit² – wird voraussichtlich auch in ferner Zukunft noch die wohl größte Herausforderung der Neurowissenschaften bleiben. Die vorliegende Arbeit soll dazu einen Beitrag leisten.

Seit Mitte des letzten Jahrhunderts gelingt es nach und nach, die geistigen Leistungen des Gehirns denjenigen Gehirnregionen wissenschaftlich zuzuordnen, durch deren neuronale Aktivität sie repräsentiert sind. Ein inzwischen schon klassisches Beispiel ist eine Struktur unterhalb des *Cortex* (Großhirnrinde), die essentiell ist für das Einspeichern expliziter Gedächtnisinhalte: der *Hippocampus*. An hippocampalen Neuronen sind auch Prozesse nachweisbar, die als eine Form der elementaren Informationsspeicherung angesehen werden: diejenigen Synapsen, die Signale von einem Neuron zum nächsten übertragen, können durch ihre sogenannte Langzeitplastizität mit der Übertragung des Signals auch dauerhaft die Eigenschaften ändern, mit denen sie weitere Signale in die gleiche Richtung zur nächsten Zelle übermitteln (Nicoll und Malenka 1995). In der vorliegenden Arbeit werden Experimente an Neuronen aus dem Hippocampus der Maus behandelt, die unter anderem auch Rückschlüsse auf die molekulare Grundlage einer weiteren Form der synaptischen Plastizität zulassen. Neben Neuronen des *Hippocampus* wurden für die vorliegende Arbeit auch solche aus dem *Striatum* für Untersuchungen herangezogen. Das *Striatum* (oder *corpus striatum*, „Streifenkörper“) ist wie der Hippocampus eine subcortikale Formation. Sie gehört zu der Gruppe der Basal-Ganglien, die im allgemeinen an der Regulation der neuronalen Aktivität und im speziellen an der Steuerung der Motoraktivität beteiligt sind (Albin, Young *et al.* 1989; Afifi 2003). Hippocampus und Striatum übernehmen verschiedene Aufgaben im Gehirn. Auch die Neuronen, die man in den beiden Formationen findet, sind von unterschiedlicher Morphologie und Funktionalität. Darauf soll im Folgenden noch eingegangen werden.

² Wie weit menschliches Gedächtnis und Persönlichkeit einander bedingen, zeigen medizinische Befunde dementer Patienten, deren Persönlichkeit fast immer mit dem Zugrundegehen des Gedächtnisses zerfällt. Retz-Junginger, P., Retz, W. und Rösler, M. (2000). *Über die Bedeutung von Persönlichkeitsmerkmalen bei der Alzheimer-Demenz*. Z. Gerontol. Geriatr. **33**(1): 52-58.

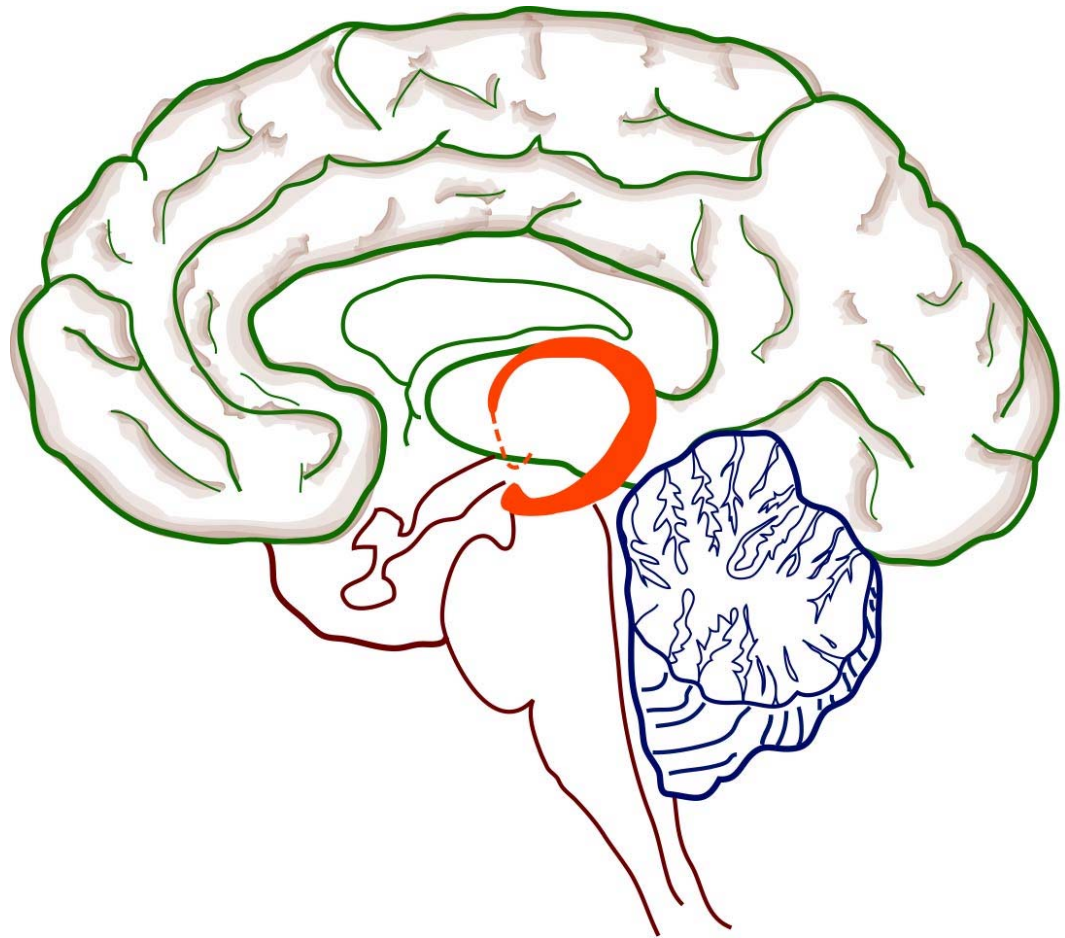


Abbildung 1.01

Lage des *Hippocampus* – oder besser gesagt der Hippocampusformation – im menschlichen Gehirn, modifiziert und vereinfacht nach (Nicholls, Martin *et al.* 1992). Schematisch dargestellt ist – grün umrandet – die rechte Hälfte des Großhirns (*Cortex*) sowie der *Thalamus*; die hier nicht wiedergegeben Augen wären somit auf den linken Rand der Seite gerichtet. In blau ist schematisch das Kleinhirn (*Cerebellum*) eingezeichnet. Der rot markierte Hippocampusformation gehört zur linken Hemisphäre des Gehirns, der rechte Hippocampus ist verdeckt. Morphologisch ist der Hippocampus ein Teil des Cortex; er wird vom zugehörigen Temporallappen des Cortex weitgehend umschlossen (in diesem Schema nicht sichtbar). Aus zahlreichen Tierversuchen und auch aus experimentellen Befunden am Menschen weiß man, daß diese Region vielfältig in zerebrale Funktionen involviert ist, vor allem beim Einspeichern von Gedächtnisinhalten (Eichenbaum 2004). Das gleiche gilt auch für das Gehirn der Maus (Nicoll und Malenka 1995). Für die vorliegende Arbeit wurden exzitatorische Neuronen untersucht, die ursprünglich aus dem Hippocampus der Maus kamen. Inhibitorische Neuronen wurden aus dem Striatum gewonnen. Das humane *Striatum* ist in dieser schematischen Abbildung zu Gunsten der Übersichtlichkeit ebenfalls nicht eingezeichnet. Es befindet sich in der Tiefe des Cortex ungefähr im Schwerpunkt der jeweiligen Hemisphäre (Kahle 1979).

Signalübertragung zwischen Neuronen

Elementarer und im Prinzip universaler Baustein des Gehirns ist das Neuron. Die Informationsverarbeitung aller Gehirnstrukturen findet im Wesentlichen innerhalb und zwischen Neuronen statt. Innerhalb eines Neurons fließen Informationen als räumliche und zeitliche Veränderung des elektrischen und chemischen Potentials beiderseits der Plasmamembran, die es umgibt. Zwischen den Neuronen befinden sich Synapsen, die elektrische Signale umsetzen und weitergeben, indem sie lokal und zeitlich begrenzt Botenstoffe, die *Neurotransmitter*, ausschütten. Empfangende Neuronen verfügen über Rezeptoren, die dort wiederum elektrische Signale direkt und indirekt erzeugen (siehe Abbildung 1.02). Die Art und Weise, in der Synapsen Signale umsetzen, ist nicht nur nicht plastisch, also zeitlich veränderlich, sondern auch keineswegs uniform im Gehirn. Welche markanten Unterschiede es gibt, soll mit der vorliegenden Arbeit ebenfalls exemplarisch behandelt werden. Die Wahrscheinlichkeit, mit der Synapsen ein elektrisches Signal in eine Ausschüttung von Neurotransmittern umsetzen (vgl. Abbildung 1.02), kann sehr unterschiedlich sein und sich dynamisch ändern (Zucker 1989). Sie ist einer der wichtigsten elementaren Parameter zur Beschreibung der neuronalen Funktion im Gehirn (Kullmann 1994; Kullmann, Erdemli *et al.* 1996).

Generell werden Synapsen, die Neurotransmitter freisetzen, unter anderem nach Art des auszuschüttenden Stoffes klassifiziert. *Exzitatorische* Neurotransmitter, zum Beispiel die Aminosäure Glutamat, bewirken eine Depolarisation der empfangenden Zelle, die damit neue Aktionspotentiale auslösen kann. *Inhibitorische* Neurotransmitter, wie zum Beispiel das Glutamat-Derivat γ -Aminobuttersäure (*GABA*) bewirken ungefähr das Gegenteil: durch eine zusätzliche Cl^- -Leitfähigkeit der Rezeptoren kommt es zur Hyperpolarisation der Membranen. Dann wird es in der entsprechenden Zelle erschwert, Aktionspotentiale auszulösen; die Aktivität der Zelle wird abgedämpft. Neuronen bilden entweder Synapsen des einen oder des anderen Typs aus, mit denen sie den entsprechenden Neurotransmitter ausschütten. In der vorliegenden Arbeit sollen unter anderem Synapsen aus glutamatergen, also Glutamat ausschüttenden, exzitatorischen und GABAergen, also inhibitorischen Neuronen miteinander funktional verglichen werden.

Im Hippocampus ist die große Mehrheit aller Neuronen glutamaterg. Daneben findet man noch eine Minderheit GABAerger Neuronen im Hippocampus (Miles 1990). Seit mehr als zwanzig Jahren sind die Neuronen aus dem Hippocampus der Maus in primärer Zellkultur (siehe Abschnitt „Material/Methoden“) etabliert, um die Funktion insbesondere der exzitatorischen Synapsen zu studieren (Bekkers und Stevens 1991). Auch für die vorliegende Arbeit kamen hippocampale Neuronen zum Einsatz. Inhibitorische

Neuronen wurden hingegen aus dem Striatum gewonnen. Ungefähr 90 Prozent der Neuronen im Striatum sind GABAerg (Kita und Kitai 1988; Afifi 1994; Plenz und Aertsen 1996).

Mechanismen der synaptischen Signalübertragung

Während Neuronen die Informationen zumeist durch Ausschüttung und Rezeption von Neurotransmittern zur nächsten Zelle übertragen, erfolgt die wichtigste Übertragung von Signalen innerhalb eines Neurons durch räumliche und zeitliche Potentialänderungen an der Zellmembran. Im Ruhezustand liegt in einem Neuron an der Zellmembran eine Spannung zwischen -70 mV und -50 mV an. Es handelt sich hier um das sogenannte Ruhepotential, das aktiv, also unter Energieverbrauch aufrecht erhalten werden muß und das durch die dominierende Permeabilität der Plasmamembran für K^+ -Ionen im Ruhezustand bedingt ist. Eine kurzzeitige Depolarisierung der Membran über einen charakteristischen Schwellenwert löst im Neuron ein *Aktionspotential* aus, das sich mittels spannungsgesteuerter Ionenkanäle entlang des Axons ausbreitet. Dieses elektrische Signal bewirkt in Synapsen einen massiven Einstrom von Ca^{++} -Ionen aus dem extrazellulären Raum ins Zellinnere durch spezifische Kanäle, deren Öffnungszustand auch spannungsabhängig ist (Robitaille, Adler *et al.* 1990). Solche indes kurzzeitigen und örtlich begrenzten Erhöhungen der Zell-inneren Ca^{++} -Konzentration an Synapsen geben den Auslöser zur Freisetzung der Neurotransmitter, indem der Inhalt von Neurotransmitter-Vesikeln in den extrazellulären Raum ausgeschüttet wird (Katz und Miledi 1968; Heuser, Reese *et al.* 1974; Llinás, Sugimori *et al.* 1982). Diese Vesikel sind relativ kleine, unter mechanischer Spannung stehende sphärische Lipidmembran-Strukturen mit einem äußeren Durchmesser von weniger als 50 Nanometer (Zampighi und Fisher 1997). Zur Freisetzung des Inhalts eines Vesikels, das sich an der Plasmamembran im Inneren der Synapse befindet, muß die Vesikelmembran ganz oder zumindest teilweise mit der Plasmamembran fusioniert werden – ein Prozeß, der in Abwesenheit eines Katalysators der Überwindung einer hohen Energiebarriere bedürfte. Dementsprechend selten können unter solchen Umständen dann auch Freisetzungseignisse beobachtet werden (vgl. die Ausführungen zu Abbildung 3.21). Sind indes die essentiellen Proteine des Freisetzungapparates in den aktiven Zonen der Synapsen vorhanden, können dort Vesikel unter Energieverbrauch „geprägt“ werden (*priming*). Dann bildet sich ein trimerer Komplex, der aus den sogenannten *SNARE*-Proteinen (Syntaxin 1, SNAP-25 und Synaptobrevin), der die Vesikelmembran eng an die Plasmamembran zieht, so daß dann die (mittelbare) Wechselwirkung weniger Ca^{2+} -Ionen genügt, um die Fusion auszulösen und damit den Vesikelinhalt schnell und synchron freizusetzen (Südhof 1995;

Gundelfinger, Kessels *et al.* 2003; Jahn, Lang *et al.* 2003). An der vesikulären Freisetzung sind in Synapsen noch eine Reihe weiterer Proteine funktional involviert, wie zum Beispiel Munc18-1, das mit den *SNARE*-Proteinen während der Membranfusion interagiert, Synaptotagmin 1, das mit Ca^{2+} direkt wechselwirkt und die Freisetzung synchronisiert und Rab3, das als vesikuläres Protein durch Interaktion mit den an der Plasmamembran lokalisierten RIM1 α und RIM2 α auch für die Regulation der Freisetzung wichtig ist (Südhof 2004).

Die Freisetzung des Inhalts der Neurotransmitter-Vesikel durch Membranfusion bedingt, daß Membranmaterial in die Plasmamembran übergeht. Bei der Exozytose findet dann sogar ein vollständiger Übergang der Vesikelmembran in die Plasmamembran statt. Offensichtlich um eine daraus resultierende Vergrößerung der Fläche der Plasmamembran zu kompensieren, werden in Synapsen zeitnah zur Freisetzung von Neurotransmittern endozytotisch neue Vesikel gebildet (Ryan, Reuter *et al.* 1993). Desweiteren sind aber auch Regulationen für die Membranfusion bekannt (Jahn, Lang *et al.* 2003), die bewirken, daß Vesikel nach Freisetzung des Inhalts wieder von der Plasmamembran abziehen (Alvarez de Toledo, Fernández-Chacón *et al.* 1993). Stofflich wiedergewonnene oder neu gebildete Vesikel werden dann erneut mit Neurotransmittern befüllt und freisetzungskompetent gemacht. Dieser auch *Vesikelzyklus* genannte Kreisprozeß ist in Abbildung 1.02 mit zusätzlich einigen weiteren ausgewählten Details schematisch dargestellt. In der vorliegenden Arbeit werden als Beispiele für Proteine, die in dem Prozeß eine wichtige Rolle spielen, VGLUT1, Isoformen des Munc13 sowie Bassoon behandelt (vgl. Abschnitte „Ergebnisse“, Seiten 68ff. und „Diskussion“, Seiten 104ff.).

Daß in Synapsen mit der Freisetzung von Neurotransmittern zeitnah neue freisetzungskompetente Vesikel gebildet werden, ist unter anderem eine Schlußfolgerung aus der Beobachtung, daß die Synapsen mit Derivaten des Fluoreszenzfarbstoffes FM1-43 spezifisch gefärbt und mit erneuter Stimulation wieder entfärbt werden können (Betz und Bewick 1992; Ryan, Reuter *et al.* 1993; Betz, Mao *et al.* 1996). Das entsprechende Nachweisverfahren wird in der vorliegenden Arbeit genutzt, Neurotransmitter freisetzende Synapsen zu identifizieren; Funktionsweise und praktische Anwendung sind im Abschnitt „Methoden“ auf Seiten 20ff. detaillierter beschrieben.

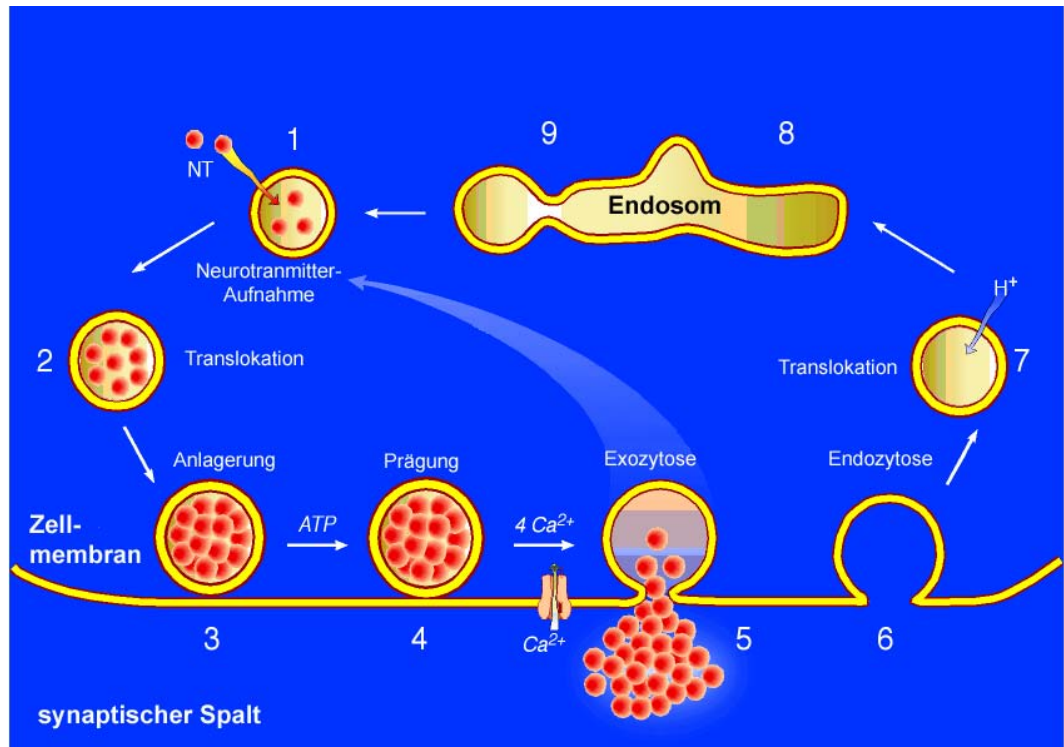


Abbildung 1.02

Schematische Darstellung des synaptischen Vesikelzyklus' nach Fernández-Chacón (Fernández-Chacón und Südhof 1999). Mit Neurotransmittern gefüllte Vesikel (1) werden an die Zellmembran herantransportiert (2) und dort angelagert (3). Unter ATP-Verbrauch werden sie dann durch sogenannte *priming*-Faktoren „geprägt“, also freisetzungskompetent gemacht (4), so daß es nur noch des Einstromes einiger Ca^{2+} -Ionen bedarf, damit sie mit der Zellmembran fusionieren und den Neurotransmitterinhalt in den synaptischen Spalt freisetzen (5). Entweder werden Vesikel unter Erhalt ihrer Identität schnell wieder rezykliert und mit Neurotransmittern beladen (großer Pfeil) oder sie verschmelzen ganz mit der Zellmembran und werden anschließend durch Endozytose neu gebildet (6). Endozytotisch gebildete Vesikel werden reacidifiziert (7), verschmelzen mit endosomalen Kompartimenten (8) und werden auch aus ihnen durch Knospung wieder neu gebildet (9).

Hinsichtlich ihrer Eigenschaften, mit denen sie Neurotransmitter freisetzen, sind Synapsen im Gehirn keineswegs uniform, so daß es generell eine grobe Vereinfachung sein muß, die Eigenschaften einer „typischen“, nicht spezialisierten Synapse zu diskutieren.

Ein „klassisches“ Beispiel für eine zentrale Synapse, die sich funktional und morphologisch besonders von anderen unterscheidet, ist die sogenannte *Held'sche Calyx*, eine Riesensynapse, die so groß ist, daß sie das Soma der Signal empfangenden, postsynaptischen Zelle kelchförmig umschließt³. Sie ist eine erregende Verbindung zweier Kerngebiete des auditorischen Systems und spielt dort eine wichtige Rolle für die Wahrnehmung der Richtung, aus der ein Schallsignal eintrifft, was nur bei sehr schneller Signalverarbeitung möglich ist. Die Eigenschaften der Synapse sind durch elektrophysiologische Messungen experimentell zugänglich (Forsythe 1994). In Held'schen Calices fand man jeweils mehrere hundert Kontaktstellen, sogenannten aktive Zonen, an denen Vesikelfusion parallel stattfinden kann (Meyer, Neher *et al.* 2001).

Ein weiteres prominentes Beispiele für eine zentrale Synapse mit ungewöhnlicher Funktionalität und Morphologie sind die inhibitorischen Nervenendigungen der *Purkinje'schen Zellen*⁴ des Kleinhirns (*Cerebellum*; vgl. Abbildung 1.01). Die Purkinje'schen Zellen sind sehr große Neuronen, die jeweils mehr als zehntausend Synapsen ausbilden. Sie sind im Cerebellum sehr wichtig, das in ebenfalls sehr schneller und zudem parallelisierter Verarbeitung von sensorischen Informationen aus dem Rückenmark mit motorischen Signalen aus dem Cortex den zeitlichen Ablauf von Bewegungen und Aktivitätsmustern der Skelettmuskulatur koordiniert (Jahnsen 1986; Medina und Mauk 2000). Purkinje'sche Zellen können in ihren Synapsen mit Frequenzen von weit über 100 Hz Neurotransmitter-Signale freisetzen, und selbst unter solcher Beanspruchung geht die Amplitude der synaptischen Ströme nur geringfügig durch Depression zurück. Diese inhibitorischen Synapsen haben durchschnittlich zehn bis sechzehn aktive Zonen (Telgkamp, Padgett *et al.* 2004).

³ Die Held'sche Calyx wurde bereits im 19. Jahrhundert beschrieben. Der Name verweist auf ihre charakteristische Morphologie; κάλυξ = Kelch. Held, H. (1893). *Die zentrale Gehörleitung*. *Arch. Anat. Physiol.* **17**: 201-248.

⁴ Der Begriff „große Purkinje'sche Zellen“ wurde 1866 von L. A. Besser nach dem böhmischen Anatomen und Physiologen Jan E. Purkyně benannt. V. Kruta, *A note on the history of Purkyně cells*, in: V. Kruta [Hrsg.], *J. E. Purkyně 1787-1869. Centenary Symposium*. Brno: 1971, Seiten 125-136.

Die Synapsen der inhibitorischen Neuronen in Hippocampus und Striatum sind – im funktionalen Vergleich mit exzitatorischen Synapsen – Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit. Inhibitorische Zellen nehmen offensichtlich sehr vielfältige Aufgaben, insbesondere bei der Regulation der neuronalen Aktivität der exzitatorischen Zellen und als Taktgeber für Oszillationen verschiedenster Frequenzbereiche ein (Freund und Buzsáki 1996). Netzwerke inhibitorischer Interneuronen regulieren im Gehirn zudem auch komplexere Prozesse (LeDoux 1993; Afifi 1994; Benes und Berretta 2001) (siehe auch den Abschnitt „Diskussion“, Seite 107ff).

Es ist naheliegend, daß sich inhibitorische Neuronen aus dem Hippocampus und Striatum von ihren exzitatorischen Nachbarn entsprechend der unterschiedlichen Anforderungen, die an sie bei der Signalverarbeitung gestellt werden, auch darin unterscheiden, wie ihre Synapsen die jeweiligen Neurotransmitter freisetzen. Seit die beiden Klassen von Neuronen voneinander unterschieden werden können, werden sie und die jeweils zugehörigen Subtypen auch morphologisch und funktional miteinander verglichen (Parra, Gulyas *et al.* 1998). Trotzdem fehlt in der dem Autor zugänglichen Literatur bis dato ein allgemeiner Vergleich der Synapsen, die in den exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen gefunden werden. Die vorliegende Arbeit soll diese Lücke schließen. Die Funktionalität der Synapsen soll untersucht werden, indem sie durch Bestimmung verschiedener Parameter quantifiziert werden. Zum Einsatz kommen dabei elektrophysiologische Messungen in Kombination mit bildgebenden Verfahren. Die Kombination der beiden Verfahren wurde desweiteren angewandt, um einigen in Synapsen exprimierten Proteinen eine Funktion im Mechanismus der synaptischen Neurotransmitter-Freisetzung zuzuordnen. Die Ergebnisse sollten weitere Rückschlüsse darauf zulassen, wie die untersuchten Synapsen auf die jeweiligen Erfordernisse angepaßt sind beziehungsweise Erkenntnisse über molekulare Mechanismen liefern, die der synaptischen Neurotransmitterfreisetzung zugrunde liegen. Solch elementare Befunde können hilfreich sein, Aussagen über die Funktionsweise derjenigen Gehirnformationen zu treffen, aus denen die untersuchten Neuronen stammten.

Ziel dieser Arbeit ist die spezifischen Möglichkeiten der quantitativen Funktionsanalyse zu nutzen, die sich durch Kombination von elektro-physiologischen und bildgebenden Verfahren ergeben. Damit sollen synaptische Charakteristika – insbesondere die Freisetzungswahrscheinlichkeit und der Anteil aktiver Synapsen in der Gesamtpopulation der Synapsen – für unterschiedliche Klassen von Neuronen untersucht werden. Synapsen, die eine relativ hohe synaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit haben, werden jeweils nach objektivierbaren Kriterien als „aktive Synapsen“ definiert. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf dem Vergleich exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen. Anhand von Untersuchungen an deletionsmutierten Neuronen soll gezeigt werden, ob und wie weit diese Kombination von Methoden auch geeignet ist, diesen ihre Funktion in der Synapse und damit in der Signalverarbeitung der Neuronen im Gehirn zuzuordnen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen einen Beitrag dazu leisten, auf molekularer Ebene die Mechanismen der Neurotransmitter-Freisetzung in den Synapsen zu studieren und damit auf zellulärer Ebene die neuronale Signalverarbeitung des Gehirns künftig besser zu verstehen.

2. Material und Methoden

Mit der vorliegenden Studie sollen funktionale Eigenschaften von Synapsen aus dem zentralen Nervensystem untersucht und miteinander quantitativ verglichen werden. Exemplarisch für exzitatorische und für inhibitorische Zellen wurden Neuronen aus dem Hippocampus und aus dem Striatum der Maus in sogenannter autaptischer primärer Zellkultur (Segal und Furshpan 1990; Bekkers und Stevens 1991) genommen. Dazu wurden neugeborene, bis zu 24 Stunden alte Mäuse dekapitiert, Hippokampi und Striata freigelegt und den Tieren das entsprechende Gehirngewebe entnommen. Aus diesem Gewebe wurden einzelne Neuronen isoliert und diese dann in jeweils einem Kulturmedium räumlich so voneinander in Distanz gehalten, daß sie keine synaptischen Kontakte zu anderen Neuronen entwickeln konnten (Bekkers und Stevens 1991; Rosenmund und Westbrook 1993). Bevor die Zellen aus dem Gewebe mechanisch gelöst wurden, mußten interzelluläre Bindungen durch die Protease Papain (fünf bis 20 U/ml, Worthington, USA) enzymatisch aufgebrochen werden. Dies erfolgte unter langsamer Agitation bei 37 °C für 60 Minuten. Nach zehnmütiger Behandlung mit einer Trypsin inhibierenden Enzympräparation (aus Hühnerei, Sigma, München, T9253), wurden die Gewebeteile durch eine handelsübliche Polyethylen-Pipette (200 µl Nennvolumen; Eppendorf, Hamburg) passiert („*treturiert*“). Qualität und Dichte der erhaltenen Zellsuspension wurden mit einem Durchlicht-Mikroskop visuell kontrolliert (Abbildung 2.01). Dann wurden die Zellen auf bereits vorbehandelte Glas-Objekträger in Kulturschalen auf einen Bewuchs von Astrozyten gesetzt. Die Dichte der Neuronen wurde so gewählt, daß möglichst viele der Neuronen außer Reichweite von anderen wachsen. Der Untergrund wurde wie folgt vorbehandelt: Zunächst wurde auf die erst mit 1 n HCl, dann mit 1 n NaOH gereinigte und sorgfältig gewaschene Glasoberfläche mit Agarose (Typ II-A, Sigma, München) beschichtet, worauf erfahrungsgemäß – wegen negativer Partiaalladungen auf der Oberfläche – Zellen kaum haften. Darauf wurden dann runde Flecken („*Inseln*“) mit einem Durchmesser ungefähr von 200 µm aus einem Material mit zahlreichen positiven Partiaalladungen gestempelt (siehe Abbildung 2.03), was gewährleisten sollte, daß Zellen darauf gut haften; gestempelt wurde mit einer Lösung von 0,5 % Kollagen (Typ I, aus Rattenschwänzen, BD Bioscience, San Jose, CA, USA) und 10 µM Poly-L-Lysin (Sigma, München) in 10 mM Essigsäure.

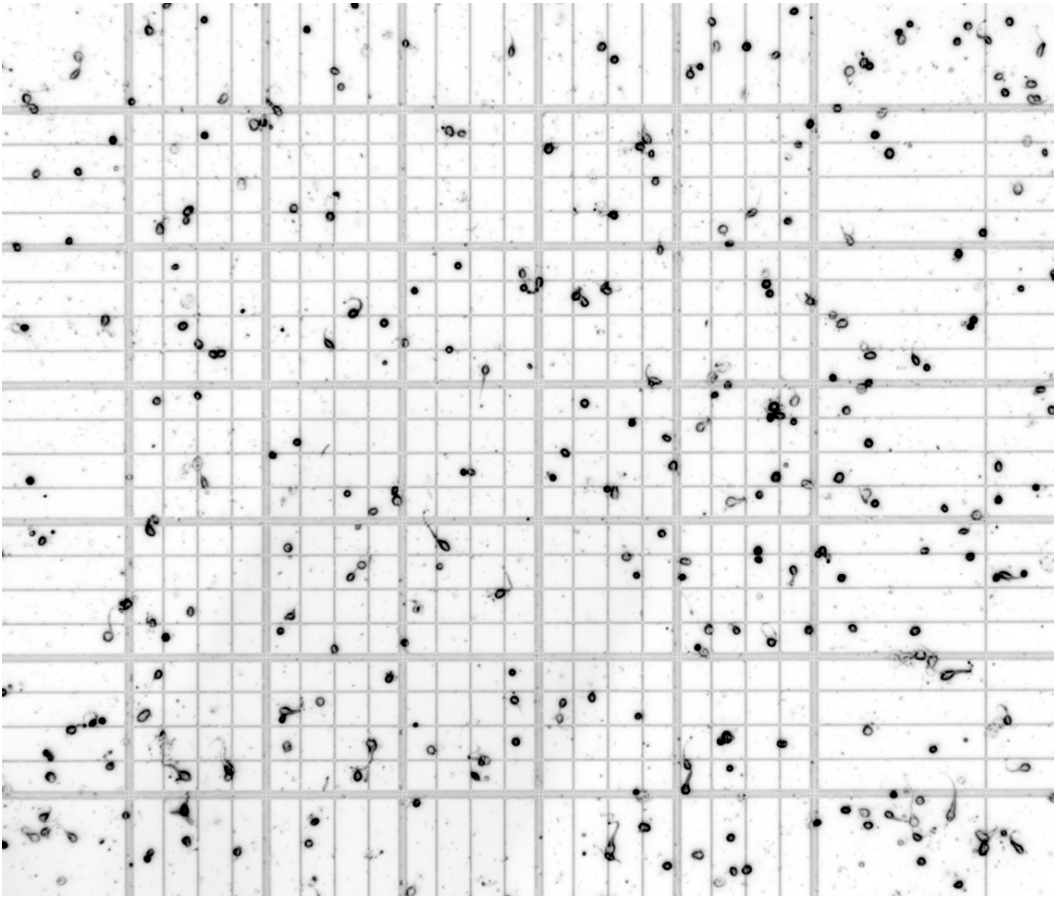


Abbildung 2.01

Zellen aus der Hippocampus einer neugeborenen Maus. Gewebe aus dem Hippocampus wurde enzymatisch behandelt und trituriert; die Zellen wurden mechanisch vereinzelt. Gezeigt ist das Negativ der mikroskopischen Aufnahme einer auf diese Weise erhaltenen Zellsuspension im Durchlicht. Der Abstand zwischen zwei Linien im engen Raster entspricht $100\ \mu\text{m}$. Einige der Zellen haben bereits kleine Fortsätze, befinden sich aber alle in ihrer morphologischen Differenzierung noch in einem sehr frühen Stadium. Wenn sich diese Zellen noch innerhalb des funktionierenden Organismus der Maus befänden, könnten die Neuronen darunter in den nächsten Tagen ein enges Geflecht mit Axonen, Dendriten und funktionalen Synapsen ausbilden. Man kann indes auch künstlich die passenden Bedingungen schaffen: die auf den folgenden beiden Abbildungen gezeigten Neuronen entwickelten sich aus einer solchen Suspension tritrierter Zellen aus dem Hippocampus in Zellkultur, auf einem Untergrund, in einem Medium, bei einer Temperatur und unter einer Atmosphäre, die den nativen Umgebungsbedingungen im ursprünglichen Gehirn der Maus offenbar ähnlich genug waren. Weitere Details dazu werden im umstehenden Text (Seiten 11-15) genannt.

Erwartungsgemäß wurden fast nur diesen gestempelten Flächen in der Zellkultur vitale Zellen gefunden. In zwei Schritten wurden darauf zunächst Astrozyten und, nachdem sich diese bereits hinreichend entwickelt hatten, Neuronen auf den Untergrund „gesetzt“: im ersten Schritt wurden wie oben beschrieben präparierte Zellen in 10 % fetalem Kälberserum (Seromed S 0115, Biochrom, Berlin) suspendiert. In diesem Medium wachsen erfahrungsgemäß Astrozyten gut, nicht aber Neuronen. In Stichproben wurde dies an den verwendeten Präparationen regelmäßig visuell überprüft. Neuronen wurden in keinem Fall gefunden. Ungefähr zehn bis dreißig Tage später wurde dann das Medium durch Neuro-Basalmedium (NBA, 10888-022, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) ausgetauscht. Dieses serumfreie Medium hat sich im Gegensatz zu dem vorhergehenden für die Kultur von Neuronen bewährt. In diesem wurde dann erneut eine wie oben beschrieben präparierte Zellsuspension gesetzt, wobei die Konzentration der Zellen so gewählt wurde, daß auf jede Polylysin/Kollagen-gestempelte, mit Astrozyten bewachsene Fläche nicht mehr als ein Neuron kam. Für Experimente wurden nur solche Neuronen herangezogen, die auf einer sonst nur mit Astrozyten bewachsenen „Insel“ alleine saßen. Die Zellen wurden generell gleichbleibend unter einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit bei 37 °C kultiviert.

Obwohl die Zellen, wenn sie voneinander separiert wurden, offensichtlich mechanisch so starken Belastungen ausgesetzt waren, daß in der Zellsuspension danach keine morphologisch differenzierten Neuronen mehr zu finden waren (Abbildung 2.01), entwickelten sich in autaptischer Kultur neuronale Zellen mit voll funktionalen Axonen, Dendriten und Synapsen (Bekkers und Stevens 1991), was auch hier reproduziert werden konnte (Abbildung 2.02). Für in primärer Zellkultur gezogene Neuronen kann man somit das physiologische „Alter“ als die Zeitdifferenz zwischen Zellpräparation und Experiment zumindest als einen Maximalwert angeben, weswegen sich die Zellen aus primärer Kultur auch insbesondere dazu eignen, die Morphogenese der Neuronen zu studieren. Für die vorliegende Arbeit wurden indes nur Eigenschaften von Neuronen in nicht signifikant unterschiedlichem „Alter“ nach Präparation miteinander verglichen. Wenn nicht anders angegeben, wurden zwischen zweieinhalb bis vier Wochen „alte“ Neuronen untersucht, um den Anforderungen der beiden parallel verwendeten Methoden gleichermaßen gerecht zu werden. Versuche mit elektro-physiologischen Ganzzell-Ableitungen sind erfahrungsgemäß in der Regel an Kulturen in der zweiten Woche nach der Präparation am erfolgreichsten; dann sind die Synapsen zwar schon in hinreichend großer Zahl funktional entwickelt, aber der zu erwartende synaptische Strom in einem Größenbereich, der noch nicht außerhalb des hinreichend quantitativ Erfassbaren liegt. Für Färbungen mit FM1-43 oder immunozytochemische Färbun-

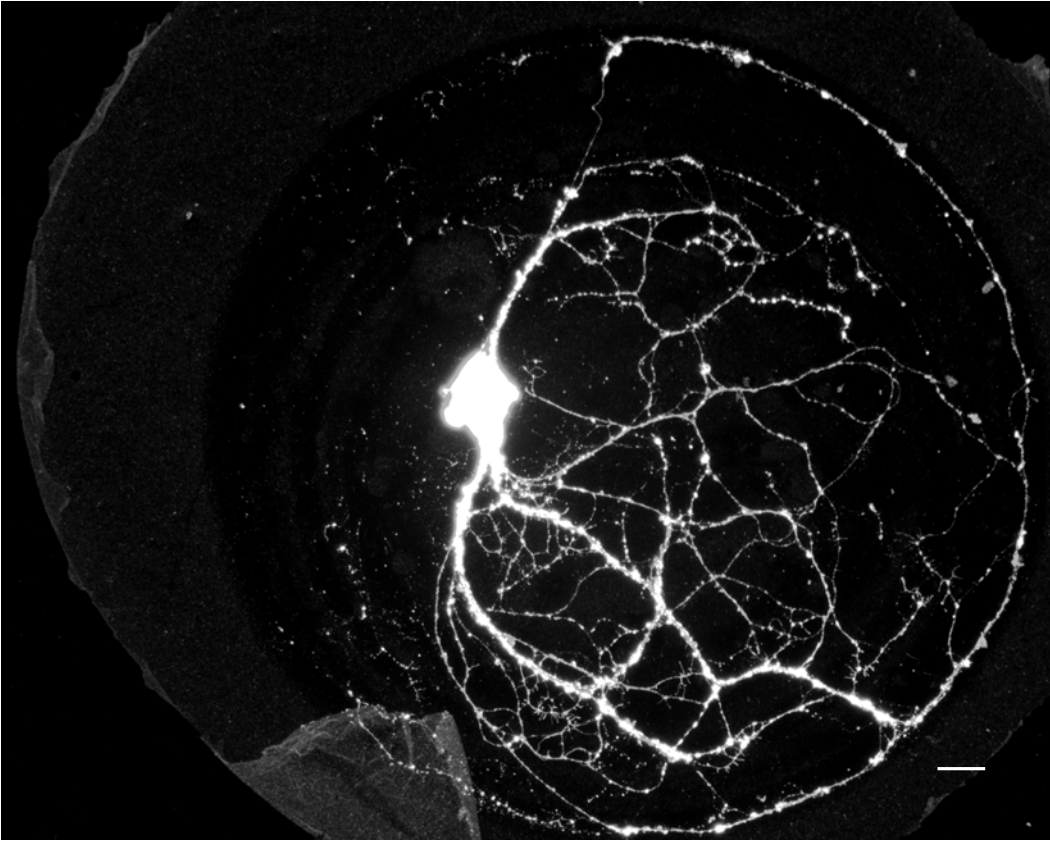


Abbildung 2.02

Immunozytochemische Färbung eines exzitatorischen Neurons aus autaptischer Kultur gegen Synaptophysin. Durch Verstärkung des Kontrastes wird in dieser Darstellung die sonst kaum wahrnehmbare nicht Synapsen-spezifische Fluoreszenz sichtbar. Das (Hintergrund-)Fluoreszenzsignal vom Untergrund aus Agarose erscheint hier indes noch dunkel. Die darauf gestempelte „Insel“ aus Collagen und Polylysin ist in schwacher Tönung zu erkennen. Bereiche darauf, die von Astrozyten abgedeckt sind, welche kein Synaptophysin enthalten, erscheinen im Bild wiederum dunkler. Für das darüber gewachsene autaptische Neuron wurde für Soma, Axon, Dendrit und Synapse ein stärkeres – beziehungsweise für letzteres ein erheblich stärkeres – Fluoreszenzsignal gemessen, was die Darstellung jedoch nicht im Einzelnen auflöst. Die Länge des weißen Größenbalkens unten rechts entspricht 20 μm im Präparat.

gen gegen synaptische Proteine würden sich hingegen Zellen aus einigen Wochen „alten“ Kulturen besser eignen; an solchen sind Fluoreszenzsignale mit höheren Intensitäten nach Färbung mit FM1-43 zu erwarten.

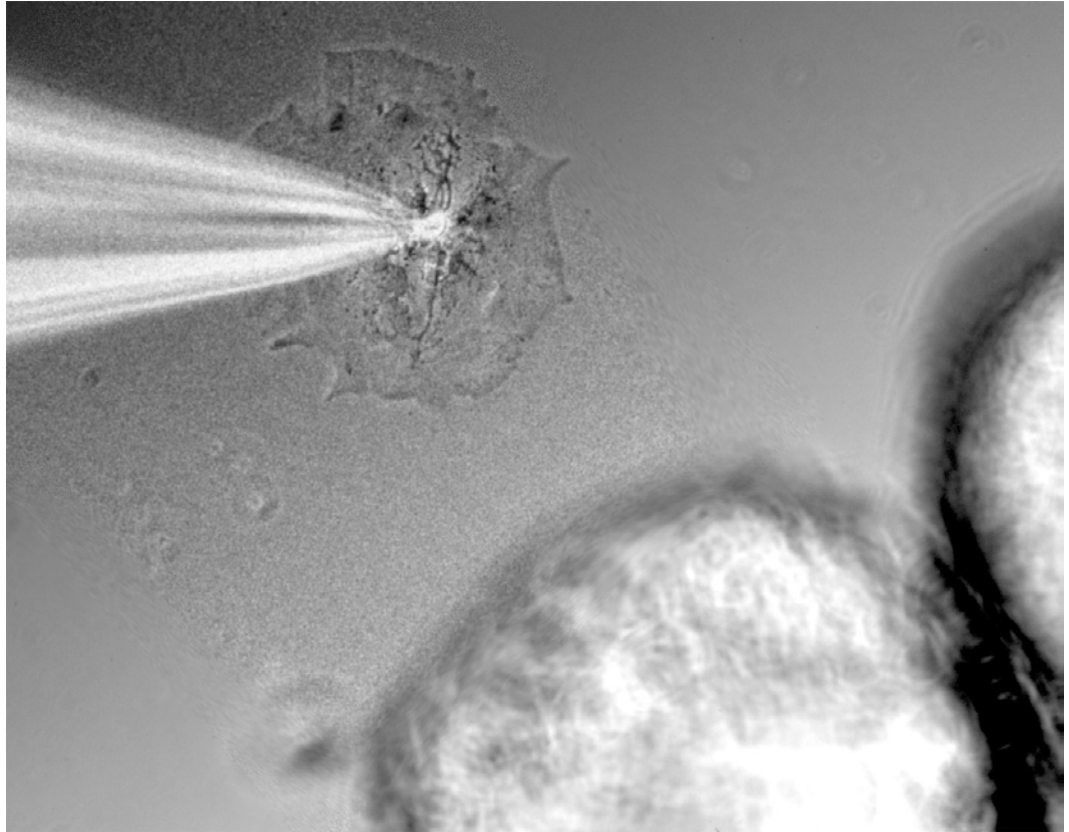


Abbildung 2.03

Neuron aus autaptischer Zellkultur während einer elektrophysiologischen Ableitung aus Spannungsklemme. Auf das Neuron, das sich allein auf einem Untergrund von einigen Astrozyten befindet, wurde eine Glaspipette aufgesetzt, die mit einem Elektrolyten befüllt war. Von der Pipette ist auf obiger Abbildung nur die Spitze sichtbar. In der Pipette befindet sich eine Elektrode zur Ableitung der synaptischen Ströme aus der untersuchten Nervenzelle. Am Bildrand rechts unten sind die Öffnungen von Quarzröhren zu sehen, mit denen ein schneller Austausch der externen Lösung realisiert wurde. Durch dieses Schnellfluß-Applikationssystem wird die Zelle stets mit frischer, sauerstoffreicher Lösung versorgt. Bei Bedarf kann auch kurzzeitig und reproduzierbar Lösung mit anderer Zusammensetzung appliziert werden. Die Reservoirs, mit denen die Quarzröhren über elektrische Ventile verbunden sind, enthalten unterschiedliche Lösungen. Die Positionierung der Quarzröhren kann durch eine ebenfalls elektrisch gesteuerte Vorrichtung verändert werden (siehe Text). Größenmaßstab: Eine Röhre hat einen Durchmesser von 500 μm .

Elektrophysiologischer Versuchsaufbau

In chemischen Synapsen werden elektrisch meßbare Signale, Aktionspotentiale oder Aktionspotentialsequenzen *präsynaptisch* durch Freisetzung von Neurotransmittern übertragen und anschließend wieder durch entsprechende Rezeptoren *postsynaptisch* als elektrisches Signal an die empfangende Zelle weitergegeben. Prinzipiell sollte diese sogenannte *synaptische Transmission* entweder chemisch, also durch Nachweis des Neurotransmitters im Spalt zwischen Axon und Dendriten, oder elektrophysiologisch nachgewiesen werden können, also durch Ableitung des Rezeptorstroms oder Messung der Spannung an der Zellmembran. Für ein anderes Modellsystem, die Chromaffin-Zelle, sind chemische, amperometrische Nachweismethoden des freigesetzten Neurotransmitters etabliert (Chow, von Rüden *et al.* 1992). Für zentrale Synapsen ist der elektrophysiologische Nachweis mittels der *Patch-Clamp*-Technik (Hamill, Marty *et al.* 1981) seit Jahren Mittel der Wahl. Elektrisches Potential und Strom sind Meßgrößen, die sich mit hoher Empfindlichkeit und Zeitauflösung quantifizieren lassen. Da die Rezeptoren unter natürlichen Bedingungen nicht mit Neurotransmittern gesättigt sein sollten (McAllister und Stevens 2000; Ventriglia 2004), ist der gemessene Strom als ein Maß für die Stärke der synaptischen Transmission an Synapsen mit gleichem Neurotransmitter anzusehen.

Um die synaptische Transmission an Neuronen quantitativ zu erfassen, wurden mit der *Patch-Clamp*-Technik an autaptischen Zellen synaptische Ströme abgeleitet. Verwendet wurde dazu die in Abbildung 2.04 schematisch dargestellte Apparatur. Aus Borosilikat-Glaskapillaren (Typ GB150F-8P, Science Products, Hofheim Ts) wurden Pipetten mit einer Computergesteuerten Pipettenzugvorrichtung (Flaming/Brown *Pipette Puller* P-87, Sutter Instruments, Novato, USA) gezogen, deren Öffnungen ungefähr 1 µm groß waren. Diese Pipetten wurden mit einer künstlichen intrazellulären Lösung befüllt. Die Konzentrationen der darin enthaltenen Elektrolyten simuliert mit Ausnahme von Chlorid ungefähr die nativen Verhältnisse im intrazellulären Lumen des Neurons im zentralen Nervensystem: 135 mM KCl, 4,6 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 15 mM Kreatinphosphat, 10 mM HEPES, 4 mM Mg²⁺-ATP, 0,3 mM Na⁺-GTP, 50 U/ml Kreatinphosphokinase. Der Serienwiderstand der mit diesem Elektrolyt befüllten Pipetten war zwischen 2,0 und 3,5 MΩ. Für die elektrophysiologischen Untersuchungen am Neuron wurde eine solche Pipette auf das Soma der Zelle aufgesetzt, so daß sie die Aufsetzstelle auf der Membranoberfläche elektrisch mit einem Widerstand von mehr als 1 GΩ umschloß. Durch einen geringen Unterdruck in der Pipette wurde die Abdichtung zur Membran befördert. Sobald dies erreicht war, wurde durch einen Saugstoß die Membran zwischen Pipette und Neuron zum Platzen gebracht. Wenn dies gelang und dennoch der mechanische Kontakt zwischen Pipette und Zellmembran hin-

reichend dicht blieb, konnte der elektrische Zugang zum Zellinneren durch die neu entstandene Öffnung unter Erhalt der Vitalität der Zelle genutzt werden.

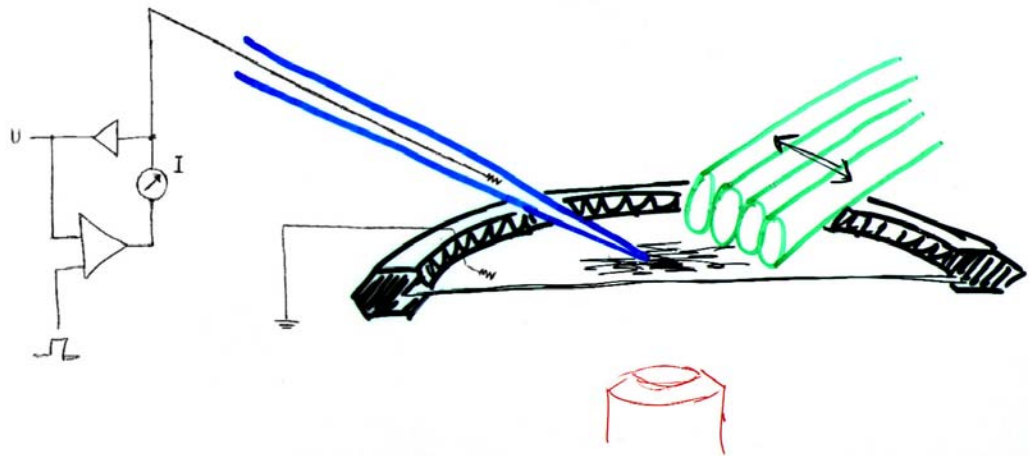


Abbildung 2.04

Schematische Darstellung des elektrophysiologischen Versuchsaufbaus zur Ableitung synaptischer Ströme an Neuronen aus primärer Zellkultur. Die Zellen wurden auf Glasplatten kultiviert, diese wurden da in eine Kammer eingespannt. Durch ein Schnellfluß-Applikationssystem kann die externe Lösung, die die Zelle umspült, rasch ausgetauscht werden. Mit einer hier schematisch blau skizzierten Glaspipette, die mit einem Verstärker verbunden ist, können Ströme in der Zelle abgeleitet oder Membranpotentiale bestimmt werden. Unter dem Objekträger befinden sich Objektive des Mikroskops; mittels bildgebender Verfahren können Eigenschaften der Zelle parallel charakterisiert werden.

Über eine in der Pipette und eine im Bad befindlichen Silberchloridelektrode wurde die Spannung der Zellmembran mittels eines Verstärkers (Axopach 200B, Axon Instruments, Union City, USA) im „*voltage-clamp*“-Modus kontrolliert. Synaptische Ströme wurden abgeleitet und durch ein daran angeschlossenes Meßsystem registriert, das aus einem Analog/Digitalwandler (Digidata 1200; Axon Instruments) und einem PC mit handelsüblicher Software (PClamp 8; Axon Instruments) bestand. Als nominelle Haltespannung des Neurons wurde -70 mV eingestellt. Unter Berücksichtigung des Nernst-Potentials von Chlorid an den Silberchloridelektroden ergab sich daraus an der Zellmembran eine Klemmspannung von etwa -75 mV, was dem Üblichen an einem zentralen Neuron *in vivo* entspricht (Neher 1992). In den zu untersuchenden Neuronen wurde jeweils durch 2 ms lange Depolarisation auf effektive -5 mV die Auslösung von Aktionspotentialen stimuliert. Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich autaptische Neuronen verwendet. Diese bilden nur Synapsen mit sich selbst, und so konnten wenige Millisekunden nach Auslösung des Aktionspotentials in dieser Versuchsanordnung die synaptische Antwort an derselben Zelle als ein von der Aktivierung der Neurotransmitter-Rezeptoren herrührender Strom abgeleitet und charakterisiert werden. Für Stimulation und zeitversetzte Registrierung der synaptischen Antwort wird unter diesen Umständen somit nur ein Elektrodenpaar benötigt (Abbildung 2.04). Voraussetzung für eine quantitative Registrierung der Antworten aller Synapsen ist, daß über die Pipette zum Soma und dem gesamten Dendritenbaum – nicht aber zum Axon – ein elektrischer Zugang mit praktisch vernachlässigbarem Widerstand besteht, soweit sich auf Soma und Dendriten aktive Synapsen befinden. Unter welchen Voraussetzungen dies als gegeben zu betrachten ist, wird im Abschnitt „Diskussion“ vertiefend behandelt.

Der elektrophysiologische Meßplatz war mit einem Schnellfluß-Applikationssystem ausgerüstet, das einen schnellen Austausch der extrazellulären Lösung ermöglicht und dadurch einen schnellen Gasaustausch gewährleistet. Desweiteren wurde das Applikationssystem so konstruiert, daß in beliebiger Reihenfolge unterschiedliche Lösungen im Wechsel appliziert werden konnten. Dazu wurden sechs Quarzkapillaren von je 500 µm Durchmesser parallel miteinander verbunden und durch Polyethylenschläuche mit ventilgesteuerten Reservoirs verbunden, die je nach Bedarf unterschiedliche extrazelluläre Lösungen enthielten. Die Positionierung der Kapillaren erfolgte durch einen Stepper-Motor und wurde wie die Ventile über eine Analog/Digitalkarte am Computer mit der Akquisitionsoftware kontrolliert. Durch programmiertes Öffnen und Schließen der Ventile bei zeitgleicher Bewegung der Quarzkapillaren wurde je nach Bedarf die Lösung gewechselt. Die Zeitkonstante für Lösungsaustausch in Ganzzelleableitungen lag in dem Bereich von 60 bis 100 ms. Mit piezo-kontrollierter Positionierung lag diese im Bereich von bis 16 bis 22 ms. Desweiteren waren die

Quarzkapillaren mit einem Thermosensor und temperaturgeregelter Heizvorrichtung ausgestattet. Alle bildgebenden und kombinierten elektrophysiologischen/bildgebenden Experimente wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 30 °C ausgeführt. Rein elektrophysiologisch durchgeführte Versuche fanden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur (21 bis 25 °C) statt. Es wurden ausschließlich Befunde miteinander verglichen, die jeweils bei näherungsweise gleicher Temperatur erhoben worden sind.

Versuchsaufbau der kombinierten elektrophysiologischen und bildgebenden Messungen

Die autaptischen Neuronen wurden auf runden Objektträgern aus Glas mit einem Durchmesser von 18 mm oder 35 mm und einer Stärke von 0,17 mm kultiviert. Zur Messung wurde dieser Objektträger dann in eine Perfusionskammer gespannt und dann auf ein invers aufgebautes Mikroskopstativ (Olympus IX70) gebracht, wobei der zuvor beschriebene elektrophysiologische Versuchsaufbau vollständig räumlich oberhalb der Probe angeordnet wurde. Unter der Probe befanden sich als bildgebender Versuchsaufbau die Objektive des invers aufgebauten Mikroskops sowie eine Kamera. Es wurde ein Olympus-Öobjektiv mit 40-facher Vergrößerung und regelbarer Blende verwendet. Die numerische Apertur des Objektivs war bei offener Blende 1,35. Die Bilder wurden mit einer CCD-Kamera vom Typ MicroMAX 1300 YHS (Princeton Instruments, Princeton, USA) mit einer Auflösung von 1296 mal 1050 Bildpunkten in 12-bit-Dynamik aufgenommen. Die Kamera wurde von einem PC aus unter Verwendung der Software „Axon Imaging Workbench“ (Version 2.2.154; Axon Instruments, Union City, USA) gesteuert. Mittels der Software wurde auch die Fluoreszenzlichtquelle, eine Xenonlampe und einen Spaltmonochromator Polychrome 2 (T.I.L.L Photonics, Planegg) kontrolliert. Die akquirierten Bilder wurden in einem vom TIFF abgeleiteten Format, dem AIF, als Rohdaten gesichert.

Identifikation aktiver Synapsen mittels FM1-43-Färbung

Die elektrophysiologischen Verfahren eignen sich dazu, die synaptische Antwort einer ganzen Zelle mit einer Messung quantitativ zu erfassen. Es gibt nur wenige elektrophysiologische und auch nur indirekte Verfahren, mit denen an einer autaptischen Zelle auch auf die Anzahl der Synapsen, die zur synaptischen Transmission der Zelle beitragen, sowie auf die Heterogenität der Aktivität geschlossen werden kann. Zum Beispiel gilt dies für die Verwendung des Offenkanal-spezifischen Inhibitors MK801 (Rosenmund, Clements *et al.* 1993). Bildgebende Verfahren haben diesen prinzipiellen Nachteil nicht; mit diesen kann jedes einzelne erkannte Objekt registriert und gezählt werden.

Zur Identifizierung aktiver Synapsen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Derivat des Fluoreszenzfarbstoffes FM1-43 verwendet: FM1-43, FM1-43fx und FM5-95 (alle von Molecular Probes, Eugene, USA). FM1-43 ist ein Styryl-Farbstoff mit amphophiler Struktur und ähnlicher Größe eines Lipids, was dem Farbstoff eine hohe Membranaffinität verleiht. Im Gegensatz zu Lipiden trägt FM1-43 als quartäres Ammoniumsalz konstitutiv eine zweifach positive Ladung, wodurch es eine vergleichsweise nur sehr geringe Membrangängigkeit aufweist. FM1-43 ist in fluorimetrisch gut nachweisbaren Konzentrationen wasserlöslich und bindet an biologischen Membranen reversibel. Die Membranbindung bewirkt einen Anstieg der Fluoreszenzausbeute um eine bis zwei Größenordnungen (Betz, Mao *et al.* 1996); in der lipophilen Umgebung, die das Molekül innerhalb einer Membran hat, entfallen die in der wässrigen Lösung zusätzlich auftretenden strahlungslosen Löschungseffekte („*Quenching*“), deren Stärke in der Regel proportional zur Konzentration der Lösers⁵ ist. In diesem System ist der Löscher das Wasser, also das Lösungsmittel selbst, sowie die darin gelösten Ionen.

⁵ Diesen Zusammenhang beschreibt die Stern-Vollmer-Beziehung. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York, London (Plenum press): 1983, Seiten 257-261.

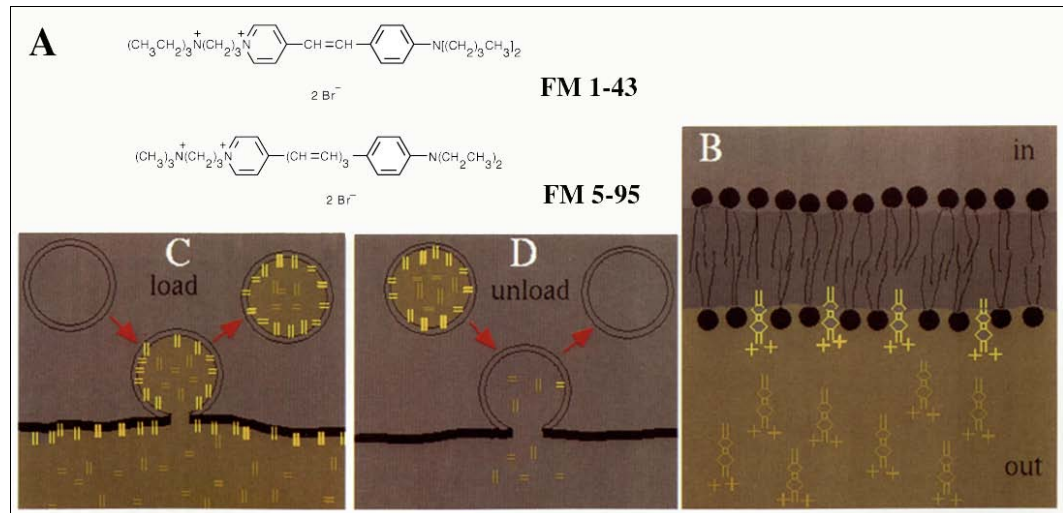


Abbildung 2.05

Nachweis der endo- und exozytischen Aktivität an Synapsen durch Färbung und Entfärben mit den Membran-affinen Fluoreszenzfarbstoffen FM1-43 und FM5-95 [ergänzt nach (Betz, Mao *et al.* 1992)]. **A.** Strukturformeln der beiden Farbstoffe. FM5-95 trägt einen größeren Fluorophor als FM1-43; Anregung und Emission sind rot-verschoben. Beide Farbstoffe haben eine Lipid-ähnliche Struktur, was erklärt, daß sie generell leicht an Membranen binden und dann mit ihrem Fluorophor zwischen den Membranlipiden interkalieren. Durch zwei konstitutiv positive Ladungen sind sie jedoch vergleichsweise schlecht membrangängig. **B.** Weil diese Farbstoffe an der Lipidmembran eine höhere Fluoreszenzausbeute aufweisen, können Membranen mit ihnen fluorimetrisch nachgewiesen werden. **C.** Die Bindung der Farbstoffe an die Membranoberfläche ist reversibel; sie lassen sich leicht ein- und auswaschen. Davon ausgenommen sind Membranbestandteile, die endozytiert wurden. **D.** Wird der Inhalt eines Vesikels exozytisch freigesetzt, gelangt mit der Freisetzung des Neurotransmitters auch endozytierter Farbstoff wieder ans Freie; eine zuvor gefärbte aktive Synapse verliert dann spezifisch ihre Fluoreszenz.

FM1-43 läßt sich innerhalb von einigen Sekunden in eine Lipidmembran sättigend einbringen und in wenigen Minuten wieder auswaschen. Für zwischenzeitlich endozytierte Membranbestandteile in Synapsen gilt letzteres dann nicht, sie behalten ihre FM1-43-Färbung bei (Abbildung 2.05, Abbildung 2.07). Einige Autoren berichten sogar, daß von ihnen die Fluoreszenz der Färbung eines einzelnen Vesikels (Liu und Tsien 1995) oder nur die eines Teiles davon (Aravanis, Pyle *et al.* 2003) fluorimetrisch nachgewiesen worden wäre. In der vorliegenden Studie ging es indes lediglich darum, die Fluoreszenz aktiver Synapsen nachzuweisen und diese zudem von solchen zu diskriminieren, die keine oder nur geringfügige exozytische Aktivität aufweisen. Aktive chemische Synapsen exozytieren die mit Neurotransmittern gefüllten Vesikel und endozytieren zeitnah neue, was

mit einem Recycling der Membran in Verbindung gebracht wird. Durch Färbung der Zelloberfläche mit FM1-43 während der Endozytose, gefolgt vom Auswaschen des nicht endozytierten Farbstoffes wurde dieser Prozeß sichtbar gemacht. Die Exozytose konnte als Abnahme der Fluoreszenz bei erneuter Stimulation der so gefärbten Regionen nachgewiesen werden (Betz, Mao *et al.* 1996), Abbildung 2.06.

Neben FM1-43 wurden auch mit einem gesonderten Protokoll (siehe unten) das immunozytochemisch fixierbare Derivat FM1-43fx (Renger, Egles *et al.* 2001), das niedriger membranaffine Derivat FM2-10 (Ryan, Smith *et al.* 1996) sowie das Derivat FM5-95 mit einer ins Rote verschobene Fluoreszenz eingesetzt (Biederer, Sara *et al.* 2002). Mit diesem konnten aktive Synapsen auch in Neuronen sichtbar gemacht werden, die nach Infektion mit einem entsprechenden *Semliki-Forest-Virus* GFP oder ein GFP-Fusionsprotein exprimierten (Ashery, Betz *et al.* 1999). Abgesehen davon waren die Eigenschaften von FM5-95 denen von FM1-43 sehr ähnlich.

Um aktive Synapsen an Neuronen mit FM1-43 oder FM5-95 zu identifizieren, wurden die Zellen in Gegenwart von 15 μ M Farbstoff stimuliert. Das erfolgte entweder durch Auslösen einer schnelle Folge von Aktionspotentialen (15 Hz, 10 s) oder durch eine 500 ms lange Depolarisation der Zelle mit 150 mM K^+ in der externen Lösung. Die Fluoreszenz von FM1-43 und FM2-10 wurde bei 488 ± 7 nm, die von FM5-95 bei 546 ± 7 nm angeregt. Im Abstand von sieben Sekunden wurde jeweils ein Bild aufgenommen. Nach 180 Sekunden wurde die Zelle erneut stimuliert und zwar entweder durch Auslösung schneller Aktionspotential-Folgen (15 Sekunden lang bei 20 Hz) oder erneuter Depolarisation der Zelle mittels extrazellulären 150 mM K^+ . Um Bleichungseffekte zu vermeiden, erfolgten die ersten 150 Sekunden des Waschvorgangs mit geschlossener Blende an der Fluoreszenz-Anregungsquelle. Die Soma der untersuchten Neuronen befanden sich entweder in Spannungsklemme oder der Farbstoff wurde in den ersten 150 Sekunden in Gegenwart von 200 mM TTX (Tocris, Ellisville, MO, USA) ausgewaschen, um spontane synaptische Aktivität zu unterbinden.

Um die Entfernung von überschüssigem FM1-43 zu beschleunigen, wurde in einem Versuch in Gegenwart von 1mM ADVASEP-7, (Sulfobutylether- β -cyclodextrin; Cydex, Overland Park, KS, USA) ausgewaschen, das nach Herstellerangaben eine hohe Affinität für FM1-43 hat und folglich den Prozeß beschleunigen sollte. Unter Verwendung des in Abbildung 2.04 beschriebenen Schnellfluß-Applikationssystems nahm die Intensität der Fluoreszenz an einer mit FM1-43 gefärbten Zelloberfläche in Gegenwart

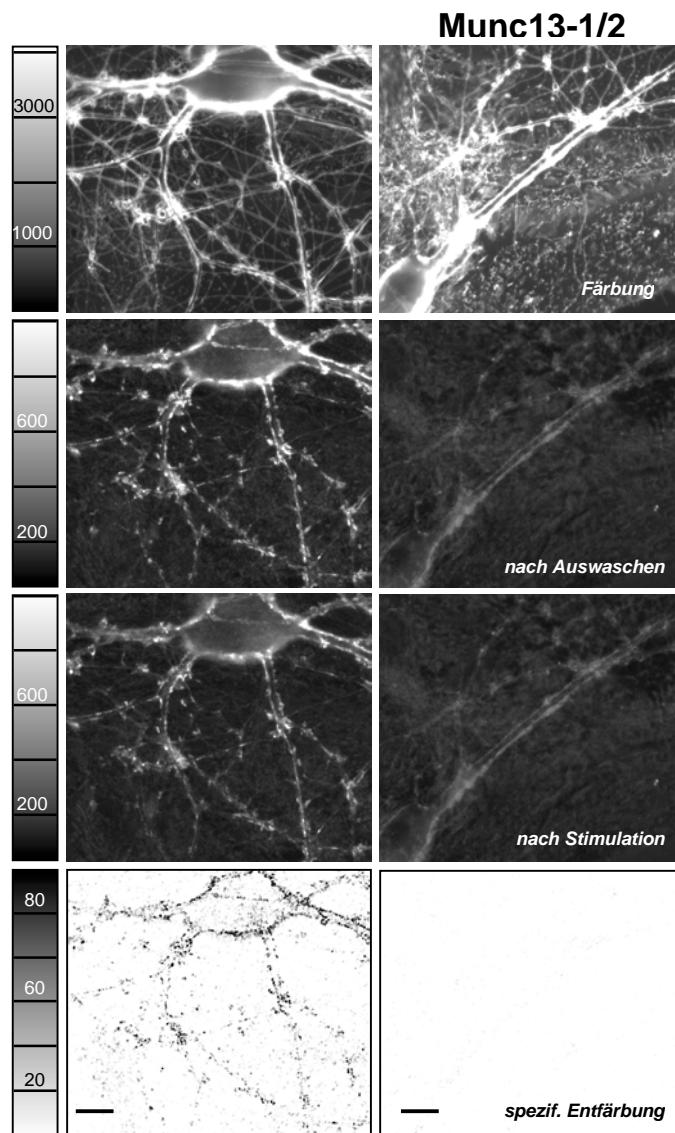
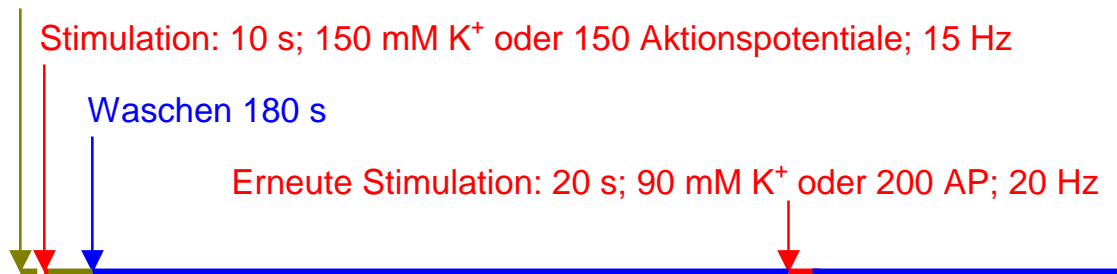


Abbildung 2.06

Nachweis der endo- und exozytotischen Aktivität durch Färbung und anschließende Entfärbung mit dem Farbstoff FM1-43. Linke Spalte: Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen eines Neurons aus autaptischer Kultur, in dem wildtypisch Endo- und Exozytose nachgewiesen wurde. Rechte Spalte: als Negativkontrolle dazu Aufnahmen unter jeweils gleichen Bedingungen eines Munc13-1/2-doppeldefizienten Neurons, in dem keine spezifische synaptische Transmission nach Stimulation nachweisbar ist (siehe Seiten 79ff.; Varoqueaux, Sigler et al. 2002). **Obere Reihe:** Fluoreszenzbild der Neuronen in Gegenwart von 15 μM FM1-43 in der umgebenden Lösung. Währenddessen wird synaptische Aktivität für eine Sekunde mit 90 mM K^+ stimuliert. **Zweite Reihe:** Aufnahme der gleichen Präparate nach 180 Sekunden Waschens. Man beachte die andere Helligkeitsskala. Helle Färbung ist ein Indikator für endozytotische Aufnahme des Farbstoffes, vor allen in den Synapsen der abgebildeten Zelle. **Dritte Reihe:** Gleicher Bildausschnitt, nach erneuter Stimulation der Neuronen für 15 Sekunden mit 90 mM K^+ aufgenommen. **Untere Reihe:** Differenz der jeweiligen Bilder aus der dritten Reihe von der zweiten Reihe in inverser Grauwert-Darstellung. Die Länge der beiden schwarzen Größenbalken in der linken unteren Ecke der Bilder entspricht jeweils 20 μm im Präparat.

Färbung: 15 μM FM 1-43



Fluoreszenz-
intensität

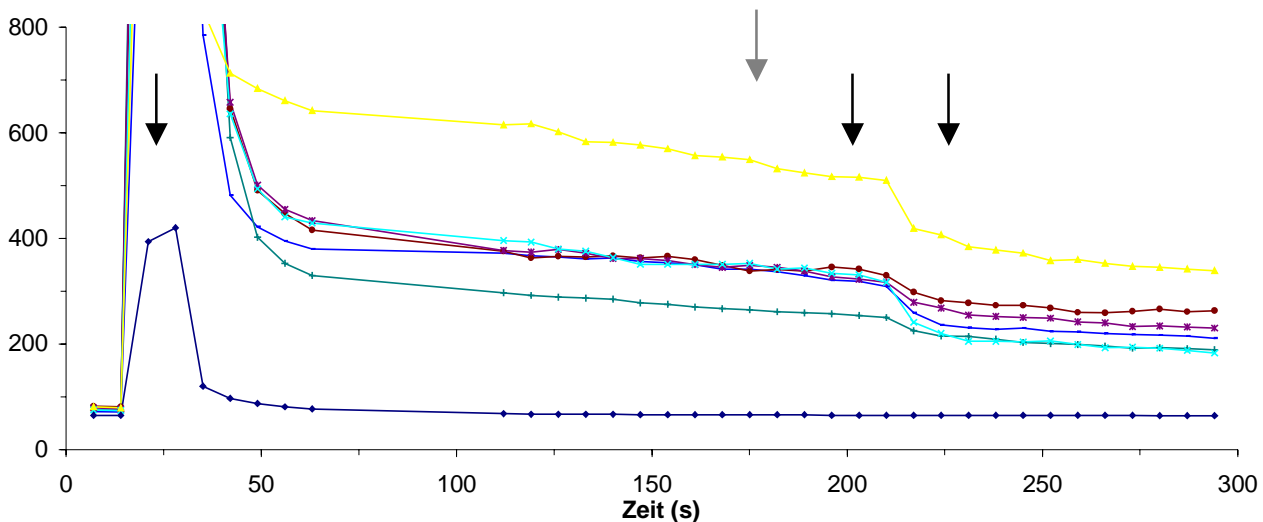


Abbildung 2.07

Oben: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls zur Färbung und Entfärbung aktiver Synapsen mit dem Fluoreszenzfarbstoff FM 1-43. Die Färbung mit FM 1-43 (grüner Balken) wird für eine Sekunde zwecks Stimulation mit 150 mM K^+ unterbrochen. Bei einer spannungsgeklammten Zelle können alternativ auch während der Färbung 150 Aktionspotentiale ausgelöst werden. Nach 180 Sekunden Waschens (blauer Balken) wird das Neuron erneut stimuliert, entweder durch Depolarisation mit K^+ oder durch Auslösen von Aktionspotentialen. **Unten:** gemessene Fluoreszenzintensität einzelner Regionen in einem Fluoreszenzbild eines Neurons, die synaptischer Aktivität zugeordnet werden konnten sowie als Negativkontrolle einer Region, die außerhalb des Neurons liegt. Die beiden schwarzen Pfeile markieren den relativen Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenzbilder der darauffolgenden Abbildung aufgenommen wurden. Der graue Pfeil markiert den Zeitpunkt einer zusätzlichen Aufnahme, die als Kontrolle für unspezifische Entfärbung durch Auswaschen und Bleichung diente (siehe Text).

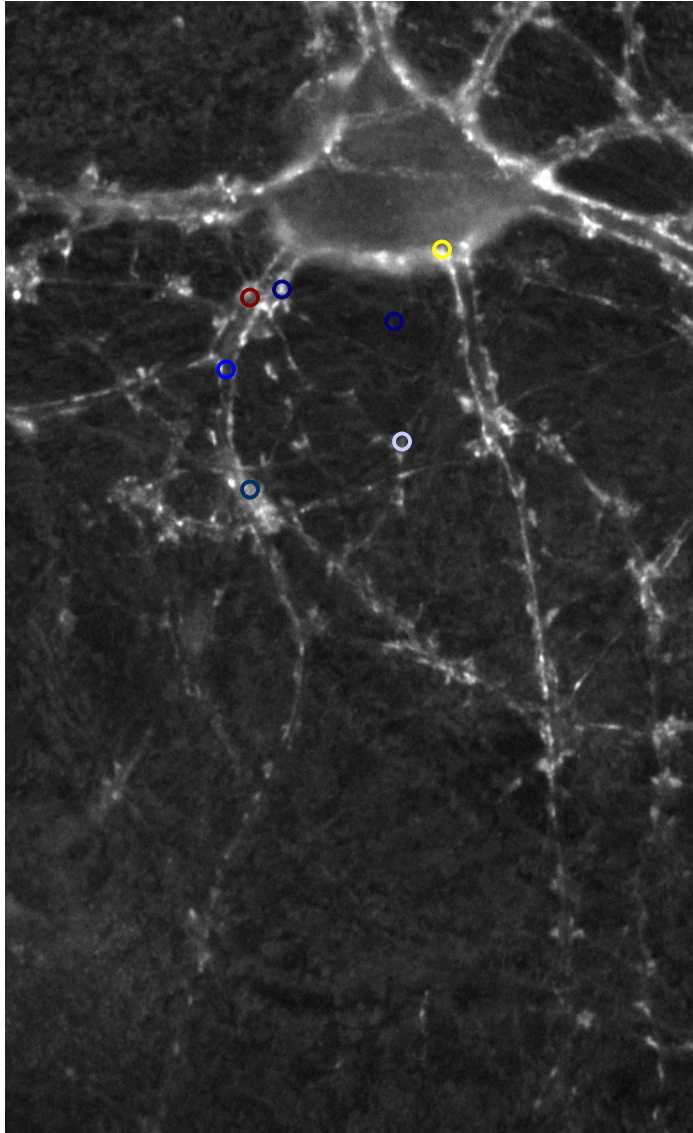


Abbildung 2.08

Fluoreszenzbild eines autaptischen Neurons, 180 Sekunden nach Färbung mit FM1-43. Die farbigen Kreise demonstrieren ungefähr die Lage der Zone, für die Fluoreszenz zeitlich im Verlauf von Färbung und Entfärbung erfolgt und in der links nebenstehenden Abbildung 2.07 mit der jeweiligen Farbcodierung dargestellt wurde. Aus technischen Gründen kann die Lage der tatsächlich für die Messung herangezogenen Pixel etwas von der Lage der Kreise abweichen.

von ADVASEP-7 allerdings nur unwesentlich schneller ab als ohne den Beschleuniger (Daten nicht gezeigt), weswegen auf dessen weitere Verwendung verzichtet wurde.

Die quantitative Auswertung der mit der Kamera aufgenommenen Bilddaten erfolgte mittels vom Autor entwickelter Algorithmen in TILL visION 3.5 oder 4.0 (TILL Photonics, Planegg). Dazu wurde die Differenz der Bilder, die kurz vor der und kurz nach der zweiten Stimulation aufgenommen wurden, von einer Differenz zweier Kontrollbilder abgezogen, die im gleichen Zeitabstand kurz vor der Stimulation aufgenommen worden waren. Es wurde zudem der für die Veränderung der Fluoreszenz mutmaßlich unspezifische Anteil abgezogen, der dem Bleichen, dem Auswaschen oder anderen Artefakten zuzuordnen ist. Um das Rauschen in den Differenzbildern zu verringern, werden mehrere Bilder vor und nach der Stimulation und mehrere Differenz-Bilderpaare zur Auswertung herangezogen und die jeweiligen Ergebnisse gemittelt. Falls möglich, wurden die Zellen 30 Sekunden danach noch ein drittes Mal stimuliert und aus den dann aufgenommenen Bildern erneut eine Differenz und Kontrolldifferenz gebildet. Die resultierenden Differenzbilder wurden dann auch bei der Mittelung berücksichtigt.

Immunozytochemische Identifikation von Synapsen

Der fluorimetrische Nachweis der Färbung und Entfärbung mit FM1-43 oder FM5-95 ermöglicht es, endo- und exozytotisch aktive Stellen in der Zelle zu finden, die bei diesen Versuchsbedingungen als aktive Synapsen interpretiert werden können. Um ihren Anteil an der Gesamt-Synapsenpopulation zu bestimmen, war es notwendig, mit einer anderen Methode auch die Synapsen sichtbar zu machen, die nur eine geringe Freisetzungswahrscheinlichkeit haben oder exozytotisch inaktiv sind. Durch eine zweite, unabhängige Färbung konnten auch potentiell falsch positive Signale in der ersten auffindig gemacht werden. Deshalb wurde an allen mit FM1-43 oder FM5-95 untersuchten Präparaten im Anschluß daran eine sogenannte immunozytochemische Färbung vorgenommen. Das Verfahren basiert auf der Eigenschaft von bestimmten Antikörpern, sich sehr spezifisch an bestimmte synaptische Proteine zu binden sowie auf der Möglichkeit, die Antikörper sichtbar zu machen, womit dann die für Synapsen typischen Proteinstrukturen bildgebend nachgewiesen werden konnten.

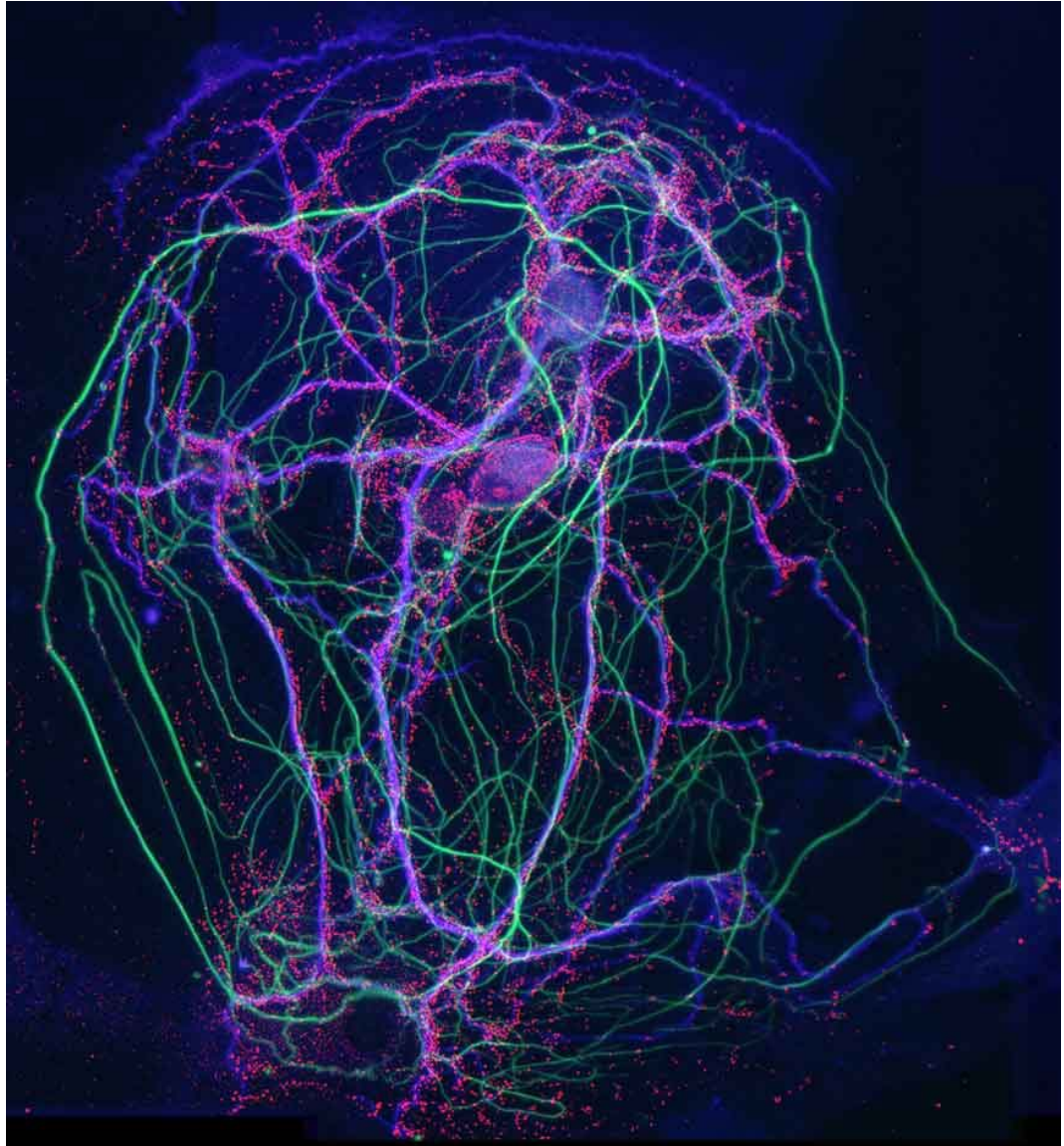


Abbildung 2.09

Beispiel für eine immunozytochemische Färbung. Zwei Neuronen aus autaptischer Kultur wurden fixiert und dann parallel mit Antikörpern gegen MAP-2 (in Dendriten, blau), durch Neurofilament M (in Axonen, grün), Piccolo (in Synapsen, rot) und den zugehörigen Fluoreszenzfarbstoff-gebundenen sekundären Antikörpern gefärbt, wodurch im Präparat die Stellen, an denen sich Dendriten, Axone und Synapsen befanden, bei entsprechend unterschiedlicher Wellenlänge fluoreszieren sollten. Gezeigt ist eine Kollage von überlappend aufgenommenen Fluoreszenzbildern in „Falschfarben“; die hier wiedergegebenen Farben entsprechen nicht denen des tatsächlich aufgenommenen Fluoreszenzlichtes. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 20 μM im Präparat.

Die immunozytochemischen Färbungen wurden wie folgt bei– wenn nicht anders angegeben – Raumtemperatur durchgeführt:

1. Direkt nach Beendigung der Fluoreszenzmessung der mit FM1-43 oder FM5-95 gefärbten Proben wurden diese für zehn Minuten mit vierprozentigem Formaldehyd in PBS (Phosphat-gepufferter Salzlösung: 4,2 mM K⁺, 145,7 mM Na⁺, 140,4 mM Cl⁻, 9,5 mM HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻; pH 6,9) fixiert, gewaschen und dann einige Stunden bis Wochen gelagert. Formaldehyd denaturiert den Proteinanteil und vernetzt ihn kovalent, so daß auch lösliche Proteine ausfallen und an ein makromolekulares Proteingerüst gebunden werden, das die Struktur der ehemaligen Zelle hat. Nach der Fixierung waren die Proben im Kühlschrank lagerfähig, insbesondere wenn sie langsam trockneten. Innerhalb einiger Stunden konnte die ursprüngliche Morphologie der Zellen ohne signifikante zusätzliche Verzerrung rekonstituiert werden.
2. Um bei den so fixierten Proteinen für die weiteren Schritte reaktive Carbonylfunktionen abzufangen, wurden die mit Formaldehyd fixierten Proben zunächst mindestens 15 Minuten lang mit 25 mM Glycin in PBS gewaschen.
3. Als nächstes wurden die Proben mit 0,25 % TRITON-X100 behandelt. Das Detergens bildet Mizellen, in die sich Membranlipide und weitere Zellbestandteile quantitativ einlagern⁶. Durch den Verlust dieser Strukturen werden die Zellen mit Ausnahme des zuvor ausgefallenen, denaturierten Proteingerüsts vollständig aufgelöst.
4. Danach wurden die Proben mindestens 20 Minuten lang mit 0,25 % TRITON-X100 und zehnprozentigem Ziegen Serum in PBS inkubiert, um einen großen Überschuß an unspezifischer Bindung vorzulegen, bevor sich die Antikörper spezifisch an die Probe binden.
5. Die Objektträger mit den so vorbehandelten Zellen werden dann bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit für zwei bis zwölf Stunden auf einen Tropfen (50-80 µl) Lösung von primären Antikörpern in PBS/TRITON-X100/Ziegen Serum – mit Zusammensetzung wie im vorausgehenden Schritt – gelegt.

⁶ In wäßriger Lösung bilden Detergenzien spontan Mizellen, in denen Lipide sehr gut löslich sind; sie haben ungefähr die gleiche Molekülgröße und Hydrophytie-Struktur, so daß die Bildung gemischter Mizellen („mixed micelles“) aus Lipid und Detergens entropisch begünstigt ist. Mazer, N. A., Benedek, G. B. und Carey, M. C. (1980). *Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions*. *Biochemistry* **19**(4): 601-615.

Als primäre Antikörper dienen in Kombination oder einzeln:

- anti-Synaptophysin (Kaninchen; *Synaptic Systems*, Göttingen), Verdünnung 1:400. Das Protein Synaptophysin wird an synaptischen Vesikeln gefunden. Die immunozytochemische Färbung dagegen diente der Identifizierung von präsynaptischen Strukturen (Jahn, Schiebler *et al.* 1985).
- anti-Synaptophysin (Maus; *Synaptic Systems*, Göttingen), Verdünnung 1:500, zur präsynaptischen Identifizierung von Synapsen mittels monoklonalem Antikörper (Jahn, Schiebler *et al.* 1985).
- anti-Piccolo (Meerschweinchen; zur Verfügung gestellt von E. Gundelfinger, Universität Magdeburg), Verdünnung 1:400. Piccolo ist als Zytomatrix-Protein an der Strukturbildung des Neurotransmitter-Freisetzungsapparates beteiligt (siehe Abschnitt „Ergebnisse“). Die Färbung diente, wie die gegen Synaptophysin, der Identifizierung von präsynaptischen Strukturen (Altrock, tom Dieck *et al.* 2003). Der Antikörper konnte zur Dreifachfärbung in Kombination mit einem Maus- und einem Kaninchen-Antikörper eingesetzt werden.
- anti-ProSap1 (Kaninchen; zur Verfügung gestellt von E. Gundelfinger, Universität Magdeburg), Verdünnung 1:400. ProSap1, oder *Proline-rich synapse-associated protein-1*, tritt in der „postsynaptisch dichten Zone“ (PDZ) der Synapsen angereichert vor. ProSap1 ist offenbar funktional an der Ausbildung dieser postsynaptischen Strukturen beteiligt (Boeckers, Kreutz *et al.* 1999). Der Antikörper wurde entsprechend zur Identifizierung von Synapsen eingesetzt. Im Gegensatz zu dem gegen ProSap1 gerichteten Antikörper ergaben Färbungen gegen mehrere andere postsynaptische Proteine – insbesondere gegen Glutamatrezeptoren – keine spezifische Lokalisation der Synapsen und wurden daher auch nicht weiter verfolgt (Daten nicht gezeigt).
- anti-MAP-2 (Maus; *Chemicon*, Temecula, CA, USA), Verdünnung 1:200. MAP-2, oder *Microtubule-Associated Protein 2*, ist am zellulären Aufbau der Mikrotubuli beteiligt (Binder, Frankfurter *et al.* 1984). Dendriten enthalten Mikrotubuli; der gegen MAP-2 gerichtete Antikörper diente somit deren Nachweis. Mit der gegen MAP-2 gefärbten Fläche wurden die Größen der zu untersuchenden Neuronen bestimmt, unter anderem, um die Synapsendichten berechnen zu können.

- anti- NFM (Kaninchen; *Chemicon*, Temecula, CA, USA, AB1987), Verdünnung 1: 400. Das Protein NFM, oder *Neurofilament M*, ist für Zellen ein Baustein, mit dem sie ebenfalls als Zytoskelett Neurofilamente aufbauen. Der hier verwendete Antikörper ist nur gegen ein C-terminales Fragment von Neurofilament M gerichtet (Harris, Ayyub *et al.* 1991). Im Gegensatz zu Dendriten findet man in Axonen Neurofilamente. Der Antikörper diente der spezifischen Färbung axonaler Strukturen (z. B. für Abbildung 2.09).

Antikörper aus unterschiedlicher tierischer Herkunft konnten jeweils miteinander kombiniert werden. Durch Beschränkung auf das relativ kleine Lösungsvolumen wurde der Verbrauch an Antikörpern optimiert. Die hohe relative Luftfeuchtigkeit wurde gewählt, um die Verdunstung gering zu halten.

6. Die Proben wurden erneut gewaschen und dann auf einen Tropfen sekundärer Antikörper gebracht, die gegen die verwendeten primären gerichtet sind. Diese sekundären Antikörper sind mit unterschiedlichen Fluorophoren (Alexa 488, Alexa 546, Alexa 630, Cy5; alle von Molecular Probes, Eugene, USA) kovalent verbunden.
7. Nach Abschluß dieser immunozytochemischen Färbung wurden die Objektträger nicht wie üblich gerahmt, sondern wieder in die Kammer des Mikroskops eingesetzt und dort so positioniert, wie sie sich zuvor – also während der FM-Färbungsexperimente – befunden hatten, um dieselben Zellen wiederzufinden, die zuvor elektrophysiologisch untersucht und mit FM1-43/FM5-95 gefärbt worden waren. Als Orientierungshilfe zum Wiederfinden der untersuchten Zellstrukturen diente ein Kratzer, der auf dem Objektträger mit einem Diamantbohrer angebracht worden war: Unter dem Mikroskop lassen sich Kratzer auf der Glasoberfläche relativ leicht visuell wiederfinden. Zur Aufbewahrung über einen längeren Zeitraum wurden die Proben mit wenig PBS in den Kühlschrank gestellt; bei 4 °C und niedriger Luftfeuchtigkeit trocknen die Proben langsam ein. Um sie dann für weitere Experimente nutzen zu können, wurden sie anschließend ein bis zwei Stunden angefeuchtet. Dabei wurde beobachtet, daß sich dann die lichtmikroskopisch sichtbaren Strukturen annähernd vollständig rekonstituieren. Im trockenen Zustand waren die immunozytochemisch gefärbten Präparate über Jahre ohne wesentlichen Qualitätsverlust haltbar, während sich bei feucht gerahmten Proben schon innerhalb einiger Wochen ein Verlust der Fluoreszenzfärbung zeigte.

Das Zählen der Synapsen

Die von der immunocytochemischen Färbung und FM1-43- oder FM5-95-Fluoreszenzfärbung aufgenommenen Bilder zeigen Strukturen, in denen man visuell Synapsen, beziehungsweise exozytotisch aktive Synapsen erkennt. Die visuelle Erkennung ist nicht genormt; sie beinhaltet eine subjektive Interpretation des Bildes. Bildgebende Verfahren sind für daraus entstehende Fehler und folgende Fehlinterpretationen besonders empfindlich, viel empfindlicher jedenfalls als beispielsweise die Strommessungen der synaptischen Transmission an autaptischen Zellen, deren Ergebnisse sich mit geringem Aufwand objektiv quantifizieren lassen. Vermeiden kann man in vielen Fällen Fehler, indem sowohl Experiment als auch Auswertung blind erfolgen. Werden beispielsweise Proben mit unterschiedlichen Genotypen miteinander verglichen, erfährt der Experimentator erst nach Abschluß der Auswertung, welcher Phänotyp welchem Genotypen zuzuordnen ist. Sollen aber etwa inhibitorische und exzitatorische Neuronen einer Zellkultur miteinander verglichen werden, steht diese Möglichkeit nicht zur Verfügung. Um dennoch objektiv zu Ergebnissen zu kommen, wurde deshalb für die vorliegende Arbeit versucht, die Erkennung von Synapsen so weit wie möglich zu automatisieren unter gleichzeitiger Beibehaltung einer hohen Objekt-Erkennungsrate. Alle Algorithmen zur Objekterkennung in Bildern wurden vom Autor im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Visual-Basic als OLE-Applikationen für die TILL-VisIon-Umgebung, Version 3.5 oder 4.0 (Till Photonics, Planegg) entwickelt. Sie sind grundsätzlich von modularem Aufbau und greifen für jede einzelne Rechenoperation auf Funktionen der für VisIon entwickelten Programmbibliotheken zurück. Die zu untersuchenden Bilder wurden auf einem Detektor mit einer Pixel-Kantenlänge von $6,5 \mu\text{m}$ und einem 40fach vergrößernden Objektiv wie oben beschrieben aufgenommen. Ein Pixel auf dem Bild repräsentiert also eine Fläche von $0,028 \mu\text{m}^2$ im Objekt. Runde Strukturen, deren Durchmesser deutlich größer als $1 \mu\text{m}$ war, wurden durch *Laplace*-Filterung nach folgendem Kern aus dem Bild entfernt:

$$\begin{array}{ccc} -1 & -1 & -1 \\ -1 & 9 & -1 \\ -1 & -1 & -1 \end{array}$$

Die *Laplace*-Filterung wichtet die Differenz des Signals für jeden Pixel zu einem Nachbarn, ist also eine erste Ableitung nach Länge und Breite. Die *Laplace*-Filterung verstärkt das Rauschen, also die Abweichung des Signals einzelner Pixel von deren räumlicher Umgebung. Dieses Rauschen wurde

durch eine nachfolgende Filterung durch Mittelung über einen quadratischen Kern mit drei Pixeln Kantenlänge entfernt. Die Kombination beider Filter ergeben einen Bandpaß: großflächige Strukturen werden aus der Bildinformation durch die *Laplace*-Filterung entfernt, kleine Strukturen durch die anschließende Mittelwertbildung. Die Parameter wurden so gewählt, daß Strukturen, deren Größe in einem Bereich liegt, in den Synapsen fallen können, im Bild erhalten bleiben. Herausgefiltert wurden hingegen weitgehend die Signale einzelner Pixel, deren Wert sich deutlich von den acht umgebenden Pixeln abhebt sowie größere Strukturen, vor allem solche mit „weichen“ Rändern.

Das Zählen der identifizierten Synapsen setzt eine Alles-oder-Nichts-Entscheidung voraus; es muß zuerst entschieden werden, welche Pixel einer gefärbten Synapse zuzuordnen sind und welche nicht. Entsprechend wurden die gefilterten Bilder binarisiert: Graustufenbilder wurden zu Schwarzweißbildern reduziert, in denen dann alle Flächen von nebeneinander liegenden „schwarz“ gefärbten Pixeln registriert und gezählt wurden. Flächen, deren Pixel-Anzahl der Größe einer Synapse entspricht, wurden als Synapse gezählt. Kritisch für das Zählergebnis ist die Höhe des Grenzwertes, an dem zwischen „schwarz“ und „weiß“ entschieden wird. Bei einem zu niedrigen Grenzwert ist mit einem hohen Auftreten von Artefakten zu rechnen; es ist zu erwarten, daß bei niedrigem Grenzwert im Signalhintergrund viele Strukturen von zusammenhängenden Pixeln gefunden werden, die nicht zur Synapsenfärbung zu zählen sind. Bei einem zu hohen Grenzwert werden hingegen viele Synapsen nicht erkannt. Der optimale Grenzwert muß dazwischen liegen. In handelsüblichen Programmen (auch von TILL Vision selbst) wird der optimale Grenzwert durch eine Analyse des Histogramms über Häufigkeitsverteilung der Werte aller Pixel abgeschätzt. Nachteilig an diesem Verfahren ist, daß die Höhe des Grenzwertes abhängig ist davon, was durch die Analyse bestimmt werden soll. Dieser Wert ist zudem abhängig von Anzahl und Dichte der Strukturen im Bild, die als Synapse erkannt werden: Je weniger Strukturen sich im untersuchten Bild befinden, desto niedriger liegt der Grenzwert. Deshalb wurden in einem neuen Verfahren statt des ganzen Bildes nur die jeweils gefundenen Strukturen zur Analyse herangezogen, um den optimalen Grenzwert zu finden. Strukturen, also Flächen von zusammenhängenden Pixeln, deren Wert über dem jeweiligen Grenzwert liegt, wurden nach Anzahl der zugehörigen Pixel klassifiziert und gezählt. Außerdem wurde der durchschnittliche Wert über alle Pixel bestimmt. Die Berechnung wurde für unterschiedliche Grenzwerte vorgenommen, um unter diesen dann das Optimum zu finden, bei dem die Summe der Werte aller Pixel von Strukturen einer Größenklasse am größten ist. Diese Summe wurde für Strukturen unterschiedlicher Größenklassen gebildet. Es ist zu erwarten, daß sie am größten ist für Objekte, die am häufigsten gut zählbar sind. Naturgemäß waren die meisten Strukturen in

jedem Bild durch das Rauschen gegeben, also Flächen von nur wenigen zusammenhängenden Pixeln. Auch für sehr große Strukturen – im Extremfall das gesamte Bild bei niedrigem Grenzwert – kann die Summe einen sehr hohen Wert annehmen. Daher wurden für zählbare Strukturen in allen Bildern eine Mindestgröße und eine Maximalgröße festgelegt; die Optimierung der Zählbarkeit beschränkte sich jeweils auf lokale Maxima, die sinnvoll waren.

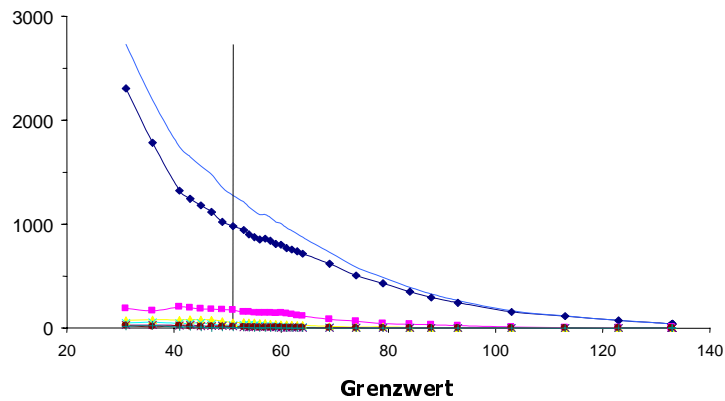
Neben der Anzahl der gefundenen Strukturen ergab dieses Zählverfahren auch Informationen über die meist anzutreffende Größe der Strukturen sowie Informationen über die Qualität der Daten. Die Genauigkeit, mit der das genannte lokale Maximum lokalisiert werden konnte, sollte ein Maß dafür sein, wie gut das Gezählte numerisch quantifizierbar war. Um es noch einmal präzise zu formulieren: Gezählt wurde also in jedem Bild das, was sich am meisten mit größter Genauigkeit zählen ließ. In inhibitorischen Neuronen waren die gezählten Strukturen größer als in exzitatorischen Neuronen, woraus auf die Größe der Synapsen geschlossen werden kann.

Visuelle Zählmethodik der Synapsen

Die Bilder von Färbungen und Entfärbungen mit FM1-43 und FM5-95 sowie von immunozytochemischen Färbungen wurden mit dem im vorausgehenden Abschnitt beschriebenen Verfahren analysiert. Damit wurden für jeweils gleiche Regionen im Neuron die aktiven Synapsen beziehungsweise alle Synapsen gezählt. Unberücksichtigt blieb dabei jedoch die Bildinformation, wie viele immunozytochemisch identifizierte Synapsen mit exozytotischen aktiven Stellen kolokalisierten und umgekehrt. Daraus ließ sich der Anteil der „stillen“, also nicht exozytotisch aktiven Synapsen direkt bestimmen. Desweiteren könnten damit auch Aussagen darüber gemacht werden, wie viele als exozytotisch aktiv erkannte Stellen nicht immunozytochemisch definierten Synapsen zugeordnet werden können und daher als Artefakte nicht mitgezählt werden sollten.

Am einfachsten und damit auch am direktesten würde man zwei Färbungen am gleichen Präparat vergleichen, indem man Bilder von jeweils gleichen Regionen im Präparat übereinanderlegt und kolokalisierte Strukturen registriert, in denen die Pixel jeweils mit einem hohem Wert übereinander liegen. Im vorliegenden Fall setzt das voraus, daß die Präparate während der immunozytochemischen Behandlung nicht schrumpfen oder verzerrt werden, sondern ihre Struktur in hinreichender Qualität beibehalten. Die

**Anzahl der
zusammenhängenden
Flächen einer
Größenklasse mit Pixeln
über Grenzwert**



**Integral über den Wert aller
Pixel aus vorstehender
Abbildung**

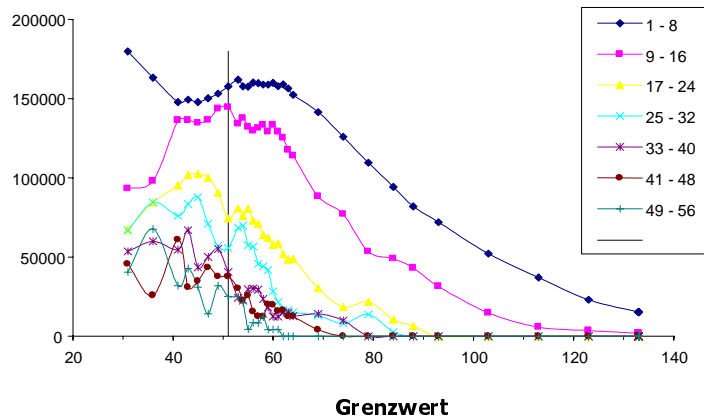


Abbildung 2.10

Objektkritische Analyse von Bildern synaptischer Färbungen. Fluoreszenzbilder liegen von der Messung als Graustufenbilder vor und werden unter Verwendung variabler Grenzwerte binarisiert, also in Schwarzweißbilder umgesetzt, auf denen dann Objekte bestimmter Größe durch Abzählen der zusammenhängenden „schwarzen“ Pixel direkt identifiziert werden können. Obere Graphik: die Anzahl gefundener Strukturen zusammenhängender „schwarzer“ Pixel nimmt mit zunehmendem Grenzwert ab. Untere Grafik: bei optimalem Grenzwert nimmt das Integral über alle Pixelwerte, die Strukturen bestimmter Größe zugeordnet werden können, einen Maximalwert an. Dieses Prinzip wurde angewandt, um den Grenzwert zur Strukturerkennung zu optimieren und Aussagen über die Größe der am häufigsten auftretenden Strukturen (Synapsen) machen zu können.

Versuche ergaben aber, daß nach Abschluß der FM1-43-Färbungsexperimente sich die Morphologie der Zelle fast immer veränderte; synaptische Strukturen verlagerten sich um mehrere Synapsen-Durchmesser. Ein Beispiel ist in Abbildung 2.11 gezeigt.

Visuell lassen sich die Strukturen – mit etwas Übung etwa so gut wie Sternbilder am nächtlichen Himmel – trotz der Verzerrungen auf jeweils gleichen Bildausschnitten aber durchaus wiedererkennen. Anordnungen von leicht wiedererkennbaren Synapsenfärbungen können so vom Experimentator als Leitstrukturen für die Wiedererkennung der übrigen Strukturen eingesetzt werden. Solche Mustererkennung wäre – wenn überhaupt – nur mit erheblichem Programmier- und Rechenaufwand realisierbar; die Methodenentwicklung hätte dann den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt.

Für die Bildanalyse wurden die Vorteile und Einsatzmöglichkeiten beider Verfahren miteinander kombiniert: Zum einen galt es, die Objekterkennung objektivierbar zu parametrisieren, was nur durch eine computerunterstützte Bildanalyse zu bewerkstelligen war. Zum anderen sollten die zu zählenden Synapsen als gefärbte Strukturen in den Bildern der FM1-43- und der immunocytochemischen Behandlung als Strukturen wiedererkannt und jeweils zugeordnet werden, was nur durch Zählen nach visueller Erkennung der Synapsen anhand der bildeten Muster realisierbar war. Dazu wurde zuerst der Grenzwert für eine Binarisierung computerunterstützt optimiert. Basierend darauf wurden dann die mit einer Dynamik von 12 Bit vorliegenden Bilder in 8-bit-Graustufen skaliert und ausgedruckt. Die Reduktion der Helligkeitsauflösung war ohnehin erforderlich, weil eine Dynamik von 12 Bit auf einem Computerausdruck nicht differenziert dargestellt werden kann. Mit beiden Verfahren wurden parallel die Synapsen gezählt. Vorausgesetzt, daß keine Fehler auftraten, sollten die Ergebnisse ungefähr gleich sein. Die weiteren computerunterstützt ermittelten Größen wie Synapsengröße und Signal-Intensitätsverteilung dienen dabei als Kontrollparameter für die objektive Vergleichbarkeit der Zählergebnisse für die entsprechend verglichenen Proben.

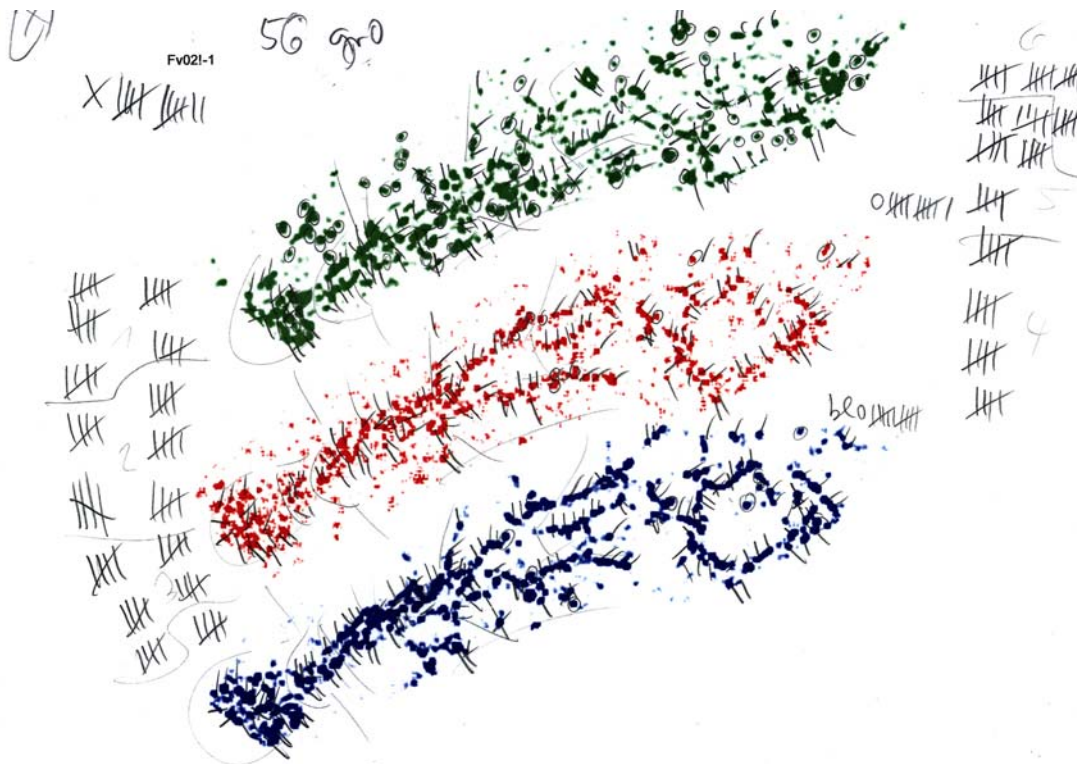


Abbildung 2.11

Typisches Beispiel eines Computer-Ausdrucks, mit dessen Hilfe Synapsen nach visueller Erkennung durch den Autor differenziert gezählt wurden. Anhand morphologischer Kriterien wurden in Fluoreszenzbildern jeweils Bildausschnitte herausgesucht, die der gleichen Subregion an der untersuchten Zelle zugeordnet werden konnten, und nebeneinander in unterschiedlicher Farbe in eine gemeinsame Bilddatei kopiert. Diese wurde dann auf Din A4 vergrößert und – wie hier zu sehen – invertiert ausgedruckt. Der rot wiedergegebene Zellbereich kommt aus einem *Laplace*-gefilterten und helligkeitsskalierten Differenz-Fluoreszenzbild der FM1-43-Färbung. Der in grüner Farbe ausgedruckte Bereich kommt von einer ebenfalls gefilterten immunozytochemischen Färbung gegen das synaptisch exprimierte Protein Synaptophysin, der blau ausgedruckte Bereich von einer eben solchen Färbung gegen das synaptische Piccolo. Durch den direkten Vergleich der drei Bilder, die jeweils von den unterschiedlich gewonnenen Färbungen einer Zell-Subregion aufgenommen wurden, ist es möglich, die Synapsen in der Subregion getrennt zu zählen und zwar unter Berücksichtigung der Färbung, mit der sie sichtbar gemacht worden waren. Obwohl es im entscheidenden Schritt nicht automatisiert – und damit objektiviert – werden konnte, erwies sich dieses Verfahren trotz des teilweisen Verzichts auf elektronische Datenverarbeitung als das zuverlässigste. Für jede untersuchte Zelle wurden mehrere solcher Bildausschnitte analysiert und von diesen schließlich das Zählergebnis – dann allerdings wieder mit Computernutzung – auf die gesamte Zelle extrapoliert.

Direkte Kollokalisierung von FM1-43- und immunozytochemischen Färbungen

Das im vorausgegangenen Abschnitt beschriebene Kombinationsverfahren zum Zählen von Synapsen ist relativ aufwendig, gerade auch, wenn es zusätzlich mit elektrophysiologischen Verfahren kombiniert wird. Um daneben auch ein einfaches, schnelles Verfahren zur Verfügung zu stellen, um „aktive“ und „stille“ Synapsen in einem Neuron nachzuweisen und zu zählen, wurde eine weitere Methode etabliert, FM1-43-Färbungen zu fixieren und so einem Direktvergleich mit immunozytochemischen Färbungen zugänglich zu machen.

Ein Derivat des FM1-43 mit kovalent gebundenem Aminorest, FM1-43fx (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) kann laut Herstellerangabe mit Aldehyden fixiert, wodurch eine Färbung damit bei einer immunozytochemischen Behandlung in der Probe mit fixiert werden soll (Renger, Egles *et al.* 2001). Beim Fixieren von Proben mit Formaldehyd für immunozytochemische Reaktionen werden in der Zelle Proteine in vielfältigen Reaktionen an unterschiedlichen chemischen Funktionen durch Methylenbrücken miteinander vernetzt (Werner, Chott *et al.* 2000). Somit ist die Vermutung naheliegend, daß auch der Amino-derivatisierte Farbstoff durch Formaldehyd kovalent an das Proteingerüst gebunden werden könnte. Nach den angegebenen Protokollen wurden Neuronen mit 20 µM FM1-43fx gefärbt. Nach Zugabe des Detergens 0,8 mM (0,05 %) Triton-x100 (Sigma, München) zur Permeabilisierung der Zellen war jedoch keine Fluoreszenz von FM1-43fx mehr in den Proben nachweisbar, was die Vermutung nahelegt, daß FM1-43fx auch nach der Fixierung nicht kovalent an vernetzte Proteinstrukturen gebunden war. Wegen der Lipid-ähnlichen Struktur muß davon ausgegangen werden, daß FM1-43 ebenso leicht wie ein Lipid mit dem Detergens gemischte Mizellen bildete. Die Konzentration, in der das Triton X-100 eingesetzt wurde, war zwar kleiner als die „kritische mizellare Konzentration“ (CMC) von 0,25 mM (Kumbhakar, Nath *et al.* 2004), ab der Mizellen in Wasser thermodynamisch stabil sind, aber es ist aus zwei Gründen nicht auszuschließen, daß unter den gegebenen Bedingungen dennoch solche Mizellen vorhanden waren: Zum einen wurde an Mizellen Metastabilität beschrieben (Grand, Arrault *et al.* 1997). In der Triton-X-100-Stammlösung, deren Konzentration oberhalb der CMC lag, können demnach auch noch in der Verdünnung Mizellen vorhanden gewesen und dann möglicherweise durch interkalierende Membranlipide thermodynamisch stabilisiert worden sein (Mazer, Benedek *et al.* 1980). Zum anderen ist zu berücksichtigen, daß die CMC wesentlich von der Ionenstärke in der Lösung abhängt. Der verwendete Puffer PBS ist eine isotonische wäßrige Salzlösung (genaue Zusammensetzung: siehe Seite 28), für die die CMC des Detergens erheblich niedriger liegen sollte als für Wasser; es stand zu

erwarten, daß sich Mizellen in PBS bereist bei erheblich niedrigeren Konzentrationen bilden. Bei immunozytochemischen Standardverfahren ist ihre Bildung indes durchaus erwünscht. Sie absorbieren mit hoher Effizienz Lipide der fixierten Zellen, was zur Folge hat, daß sich Membranen auflösen und Antikörpern ein ungehinderter Zugang an die entsprechenden Epitope gewährleistet wird.

Um herauszufinden, ob unter Bedingungen, bei denen die Mizellenbildung vermieden wird, die FM1-43fx-Färbung trotz Permeabilisierung erhalten bleibt, wurde deshalb in weiteren Versuchen Triton X-100 durch 1 mM Natriumcholat (Sigma, München) ersetzt. Mit diesem Detergens wurden die Proben für zehn bis 15 Minuten inkubiert. Natriumcholat permeabilisiert Membranen durch Bildung von stabilen Poren (Schubert und Schmidt 1988), bildet aber nicht wie Triton-X Mizellen, sondern trimerisiert thermodynamisch stabil ab einer zwanzigmal höheren kritischen Konzentrationen ≥ 4 mM (Stopar, Spruijt *et al.* 1998). Außerdem wurde die Ionenstärke der Lösung minimiert, indem der Puffer durch eine isotonische Lösung von 300 mM Saccharose ersetzt wurde. Das Detergens wurde mindestens 30 Minuten vor Versuchsbeginn auf die Endkonzentration verdünnt, um Adukten zum Dissoziieren genügend Zeit zu geben. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten wieder in PBS, weil Antikörper in Lösungen mit niedriger Ionenstärke erfahrungsgemäß weniger spezifisch und mit geringerer Affinität an die Epitope binden. Abweichend vom obengenannten Standardprotokoll für die immunozytochemische Färbung wurden zum PBS dann keine Detergenzien gegeben. Unter diesen Bedingungen konnte FM1-43fx trotz Permeabilisierung fixiert und die Proben weiter immunozytochemisch gefärbt werden. Verglichen mit Bildern von lebenden Zellen, die mit FM1-43 oder FM5-95 gefärbt wurden, sind FM1-43fx gefärbte Strukturen an permeabilisierten Zellen etwas unscharf. Dessenungeachtet war die räumliche Auflösung ausreichend, um aktive Synapsen mit einiger Sicherheit zu lokalisieren. FM1-43 wurde hingegen bei gleichen Bedingungen durch das Detergens ausgewaschen (Daten nicht gezeigt). Die zusätzliche Amino-Funktion bewirkt demnach, daß FM1-43fx zumindest schwach fixiert wird. Dessenungeachtet konnte nicht endozytotisch aufgenommenes FM1-43fx in Abwesenheit von Formaldehyd wie FM1-43 aus Neuronen ausgewaschen werden (Daten nicht gezeigt). Vermutlich bildete FM1-43fx mit Lipiden oder anderen Membranbestandteilen (zum Beispiel via *Man-nich*-Reaktion) Oligomere, die in Triton-X100-Mizellen interkalierten. Jedenfalls konnte durch die Wahl der äußeren Bedingungen erreicht werden, daß Bilder von Färbungen mit FM1-43fx und immunozytochemischen Färbungen aktiver beziehungsweise aller Synapsen mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und anschließend gemeinsam und Software-basiert analysiert werden konnten.

Ergebnisse

Mit der vorliegenden Arbeit werden funktionale Eigenschaften von exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen vergleichend untersucht. Dazu wurden zunächst elektrophysiologische und bildgebende Techniken kombiniert und Parameter bestimmt, die die synaptische Funktion quantitativ beschreiben. Um weiterhin die synaptische Funktion auf molekularer Ebene zu studieren, wurden mit dem Kombinationsverfahren auch Neuronen untersucht, denen einzelne synaptische Proteine nach Deletionsmutation fehlten, wodurch dann durch den Vergleich mit den wildtypischen Kontrollen den jeweiligen Proteinen ihre Funktion zugewiesen werden konnte.

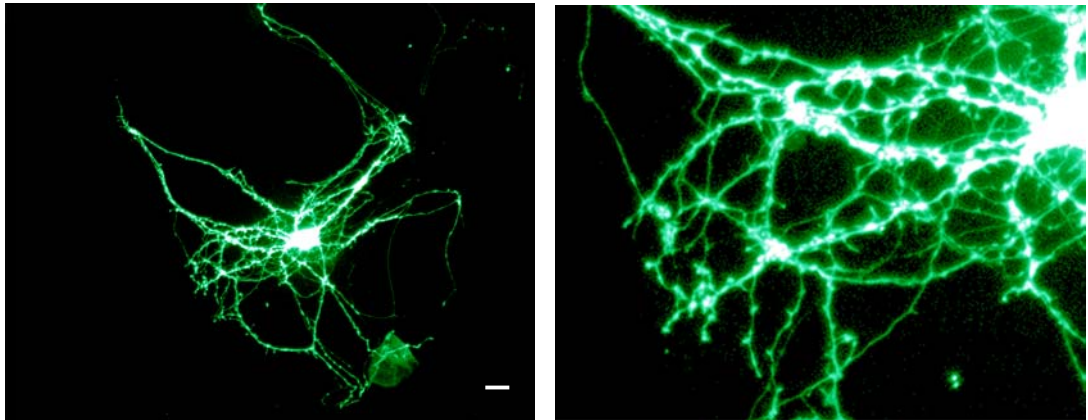
Morphologie exzitatorischer und inhibitorischer Neuronen

Die in der primären Zellpräparation vorgefundenen exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen ließen sich allein anhand von morphologischen Kriterien visuell voneinander unterscheiden, insbesondere nach Anfärbung mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Abbildung 3.03 und Abbildung 3.04) oder mit einem fluoreszierenden Protein (Abbildung 3.01). An exzitatorischen Neuronen wurden charakteristische „Dendritenbäume“ (von δένδρον, Baum) mit weitverzweigten Ästen gesehen. Mit hinreichender Vergrößerung (Abbildung 3.01 B) erkennt man an den exzitatorischen Dendriten die typischen feinen Dornen („spines“), auf denen sich Synapsen befinden (Nimchinsky, Sabatini *et al.* 2002). Diese Dornen werden mit Prozessen der reversiblen Informationsspeicherung durch funktionale Plastizität (Nimchinsky, Sabatini *et al.* 2002; Sala 2002), aber auch morphologisch durch Bildung (Engert und Bonhoeffer 1999) und Abbau (Nägerl, Eberhorn *et al.* 2004) in Verbindung gebracht.

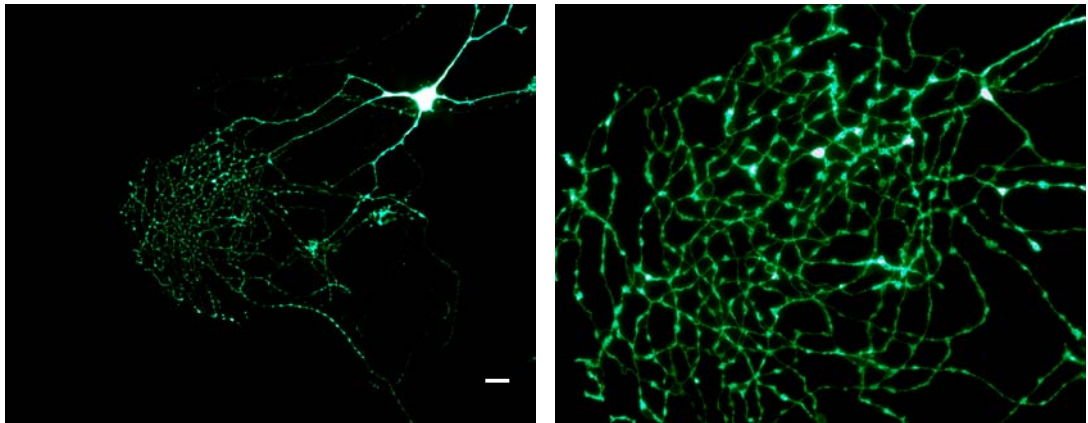
Wie beschrieben ließen sich die inhibitorischen Neuronen morphologisch von den exzitatorischen unterscheiden. An inhibitorischen Dendriten waren keine Dornen nachweisbar (Abbildung 3.01 B), zudem waren sie dünner und weitaus weniger häufig verzweigt als die exzitatorischen. Die inhibitorischen Synapsen waren im Gegensatz zu exzitatorischen mit regelmäßigem Abstand zueinander und quasi perlenschnurartig auf den Dendriten angeordnet; die Bezeichnung „Dendrit“ ist für exzitatorische Neuronen offensichtlich weitaus zutreffender. (Für die inhibitorischen würde wohl eine Wasserpflanze einen besser passenden Namenspatron geben als ein Baum oder Dornbusch.) Die vorgefundene gleichmäßige Verteilung der

Synapsen auf inhibitorischen Dendriten legt die Vermutung nahe, daß die Lokalisation der Synapsen primär sich nicht aus dem Wachstum der axonalen Endigungen ergibt, sondern postsynaptisch, also von den Dendriten bestimmt wird. Diese für sich genommen vage Hypothese bestätigen neuere Befunde, wonach die beiden dendritisch lokalisierten Proteine Neuroligin-2 (in inhibitorischen Synapsen) und PSD-95 (in exzitatorischen Synapsen) durch gegenseitige Abstoßung die Positionierung inhibitorischer Synapsen neben den exzitatorischen ausbalancieren (Graf, Zhang *et al.* 2004).

In global fluoreszierenden, EGFP exprimierenden Neuronen waren die inhibitorischen Synapsen im visuellen Vergleich offensichtlich größer als die exzitatorischen. Erstere würden vermutlich schon räumlich kaum auf die für Dendriten typischen Dornen der exzitatorischen Synapsen passen. Dies steht im Einklang mit der inzwischen klassischen Beobachtung, daß cortikale inhibitorische Synapsen *in vivo* sich bevorzugt axo-somatisch, exzitatorische Synapsen hingegen axo-dendritisch bilden (Gray 1959). Anhand dessen konnten die beiden Synapsenformen bereits lange vor Entwicklung der *Patch-Clamp*-Technik unterschieden werden. Inzwischen wurden auch spezifische Fluoreszenz-Anfärbungsmethoden für Synapsen entwickelt, worauf im Folgenden näher eingegangen werden soll.



A



B

Abbildung 3.01

Typisches exzitatorisches (A) und inhibitorisches Neuron (B) aus hippocampaler autaptischer Kultur nach Infektion mit einem Semliki-Forest-Virus, der das fluoreszierende Protein GFP überexprimieren läßt (Ashery, Betz *et al.* 1999). Gezeigt werden Fluoreszenz-Aufnahmen bei Anregung 488-nm-Licht. Die Bilder rechts sind jeweils vergrößerte Ausschnitte von den Bildern links. Die Länge des weißen Größenbalkens entspricht jeweils 20 μm .

Immunozytochemische Färbung von Neuronen

Bereits nach unspezifischer Färbung mit grün fluoreszierendem Protein GFP, das durch Infektion mit einem Semliki-Forest-Virus (Ashery, Betz *et al.* 1999) eingebracht wurde, konnten inhibitorische Synapsen neben anderen Zellbestandteilen des Neurons sichtbar gemacht werden (Abbildung 3.01 B). Für exzitatorische Synapsen gelang dies nicht (Abbildung 3.01 A). Um die Morphologie der Neuronen differenzierter vergleichen zu können, wurden Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen das dendritisch vorkommende Protein MAP-2 (Binder, Frankfurter *et al.* 1984) gefärbt. Die Größe der so gefärbte Dendritenfläche unterschied sich für die untersuchten exzitatorischen Neuronen nicht signifikant von der Größe der gefärbten Fläche für die inhibitorischen (Abbildung 3.02).

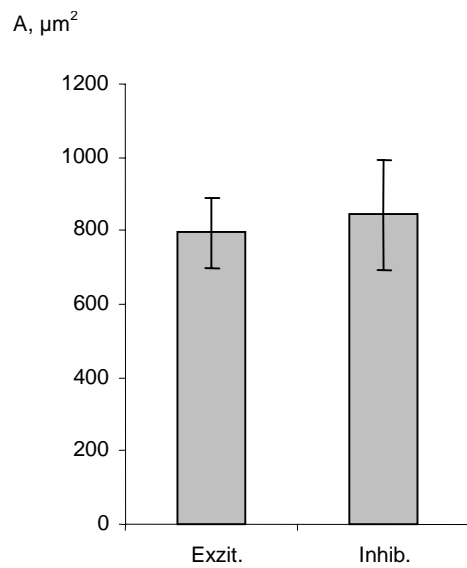
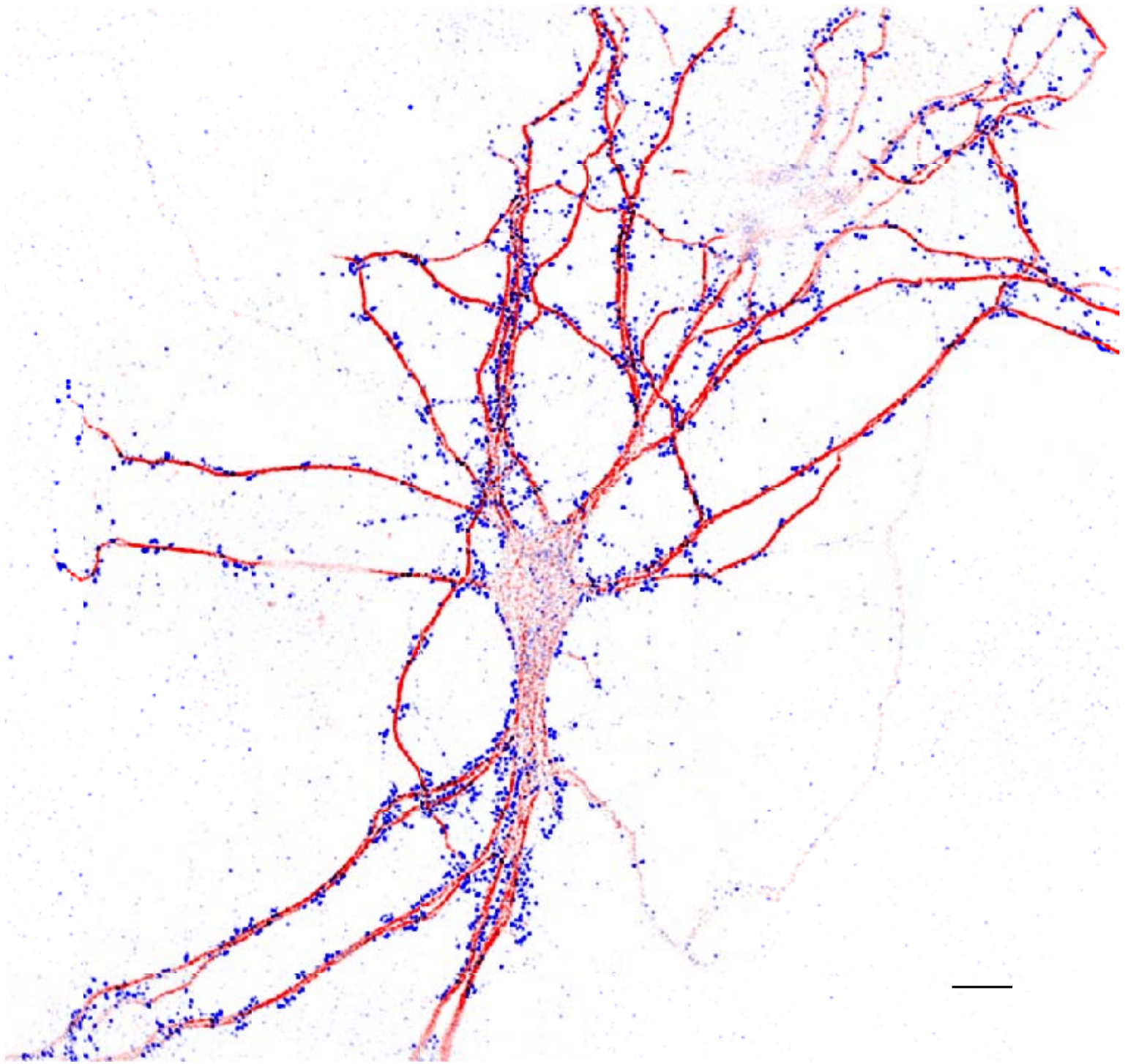


Abbildung 3.02

Größenvergleich der untersuchten inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen. Die Zellen wurden fixiert und gegen das dendritische Protein MAP-2 immunocytochemisch gefärbt. Verglichen wurde die Größe der jeweils fluoreszierenden Fläche. Die untersuchten exzitatorischen Neuronen waren mit $794 \mu\text{m}^2 \pm 98 \mu\text{m}^2$ ($n = 15$) etwa gleich groß wie die inhibitorischen mit $843 \mu\text{m}^2 \pm 150 \mu\text{m}^2$ ($n = 8$).



←Abbildung 3.03

Morphologie eines autaptischen exzitatorischen Neurons aus dem Hippocampus. In dieser Negativdarstellung ist die immunozytochemische Färbung gegen das dendritische Protein MAP-2 rot wiedergegeben, die synaptische Färbung gegen Synaptophysin blau. Beide wurden *Laplace*-gefiltert, um Hintergrundsignale zu entfernen. Dadurch erscheinen alle Bildobjekte, die sich nicht in der Fokus-Ebene befanden, entsprechend ungefärbt. Die Länge des schwarzen Größenbalkens unten rechts entspricht 10 μm .

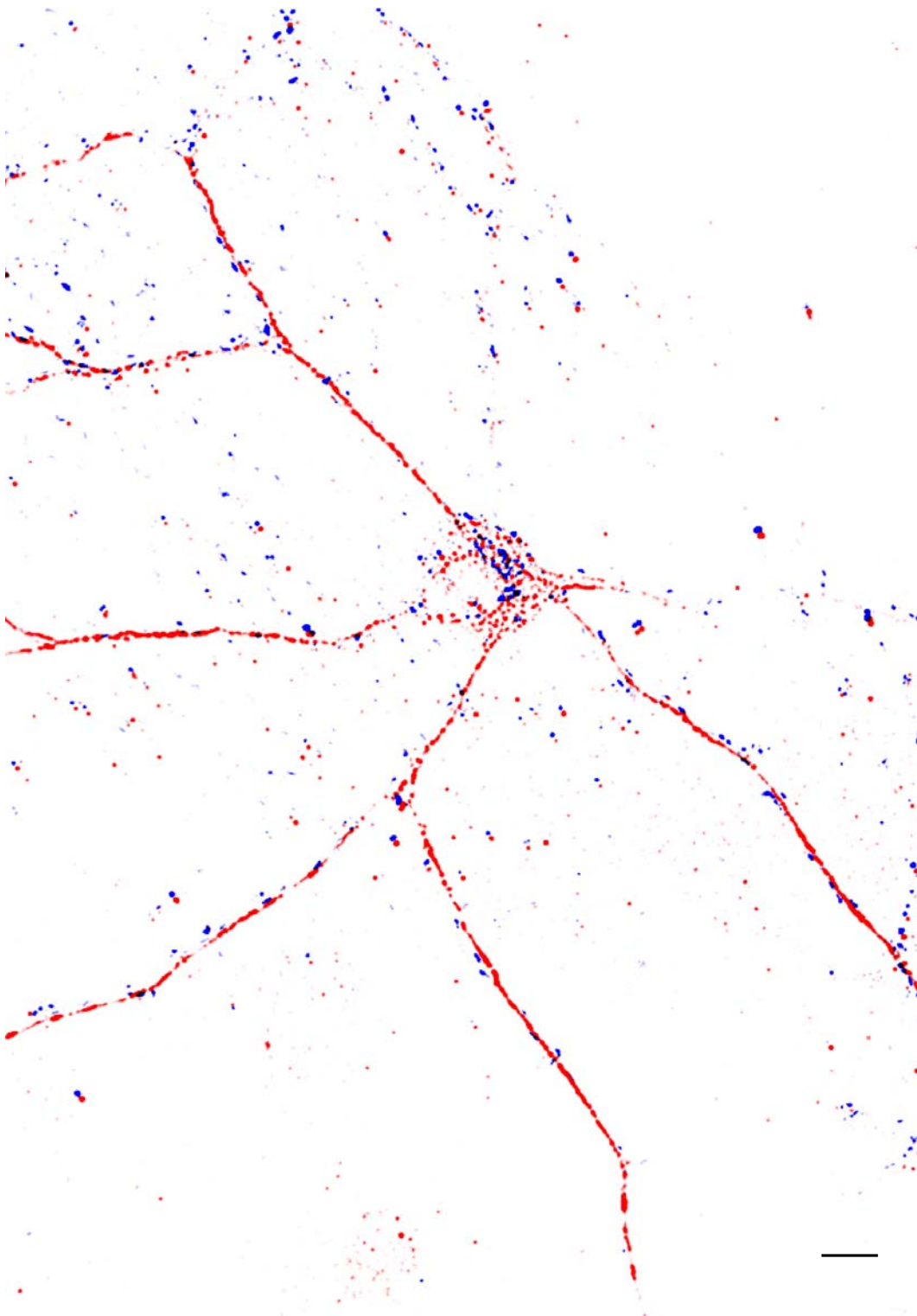


Abbildung 3.04

Morphologie eines typischen inhibitorischen Neurons aus autaptischer striataler Kultur. Die gezeigte Färbung wurde analog zu dem in vorausgehender Abbildung gewonnen. Dendriten erscheinen rot, Synapsen blau. Die Länge des schwarzen Größenbalkens entspricht 10 μm .

Parallel zur Färbung gegen dendritische Proteine wurden die Neuronen auch mit einem polyklonalen Antikörper gegen das synaptische Protein Synaptophysin (Jahn, Schiebler *et al.* 1985) oder gegen Piccolo (Altrock, tom Dieck *et al.* 2003) spezifisch gefärbt, was in entsprechend mehrfach gefärbten Stichproben das Zählergebnis der anhand ihrer Färbung im Bild identifizierten Synapsen nicht veränderte. Mindestens 95 Prozent der mit der einen Färbung identifizierten Synapsen konnten jeweils mit der in der anderen wiedergefunden werden, was einen Anhaltspunkt zur Abschätzung eines Mindestwertes für die Ungenauigkeit des Nachweises gibt (Daten nicht gezeigt).

In exzitatorischen Neuronen wurden etwa doppelt so viele Synapsen immunozytochemisch nachgewiesen wie in inhibitorischen (Abbildung 3.05 A). Bei im Mittel ungefähr gleich großer Dendritenfläche war die Synapsendichte in exzitatorischen Neuronen somit entsprechend höher (Abbildung 3.05 C). Das gleiche gilt auch für die Exo- und Endozytose sensitive Synapsenfärbung mit FM1-43 (Abbildung 3.05 B und Abbildung 3.05 D).

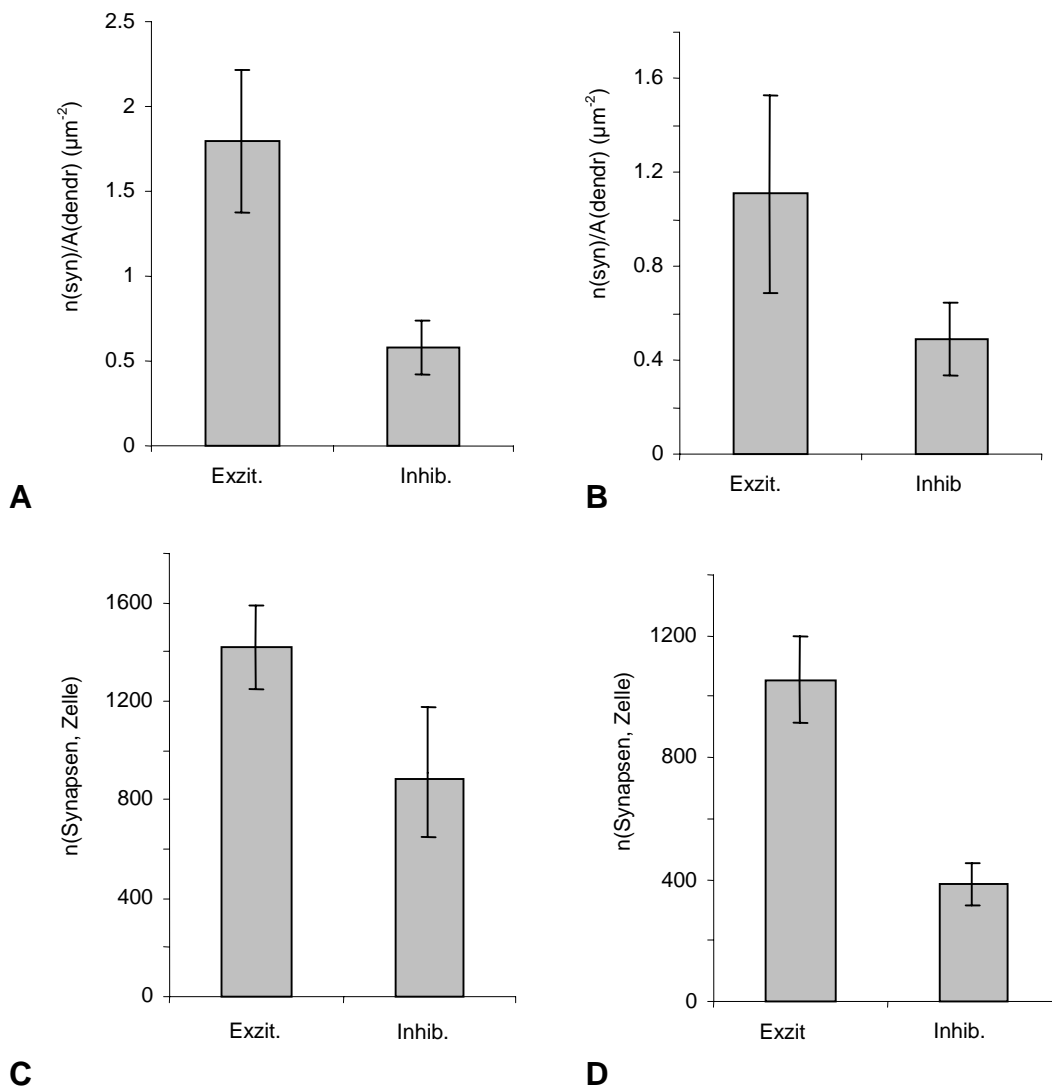


Abbildung 3.05

Morphologischer Vergleich exzitatorischer und inhibitorischer Neuronen nach immunozytochemischer Färbung sowie Färbung/Entfärbung mit FM1-43.

A. Die Synapsendichte, bestimmt als Anzahl immunozytochemisch identifizierter Synapsen pro dendritisch gefärbte Fläche, war in exzitatorischen Neuronen mit $1,79 \pm 0,4$ ($n = 9$; $n(\text{Synapsen}) = 2528$) etwa drei mal größer als in inhibitorischen Neuronen mit $0,58 \pm 0,16$ ($n = 6$; $n(\text{Synapsen}) = 1548$).

B. Die Dichte aktiver Synapsen, bestimmt als Anzahl synaptischer Färbungen, die mit FM1-43 exozytotischer Aktivität zugeordnet werden konnten, war in exzitatorischen Neuronen mit $1,1 \pm 0,3$ ($n = 8$; $n(\text{Synapsen}) = 1641$) größer als in inhibitorischen Neuronen mit $0,49 \pm 0,2$ ($n = 6$; $n(\text{Synapsen}) = 1001$).

C. Die absolute Anzahl an Synapsen an den exzitatorischen Neuronen war mit 1417 ± 172 ($n = 16$) bei durchschnittlich ungefähr gleicher Fläche entsprechend höher als in inhibitorischen Neuronen mit 1196 ± 263 ($n = 12$).

D. Auch die Anzahl aktiver Synapsen war an exzitatorischen Neuronen mit 1056 ± 142 ($n = 16$) höher als in inhibitorischen Neuronen mit 383 ± 69 ($n = 8$).

Elektrophysiologische Charakterisierung der exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen

Um die Aktivität der Neurotransmitter freisetzenden Synapsen eines Neurons mit einer quantitativen Methode zu erfassen, wurde mit der *Patch-Clamp*-Methode an autaptischen Neuronen aus Spannungsklemme die Stärke des synaptische Stroms gemessen. Mittels der jeweils spezifischen Inhibitoren NBQX (Zeman und Lodge 1992) und Bicucullin (Curtis, Duggan *et al.* 1970) konnte dann jedes Neuron eindeutig als glutamaterg, also exzitatorisch, oder GABAerg – inhibitorisch – zugeordnet werden (Abbildung 3.06). In Regelfall erfolgte die Zuordnung indes mit hinreichender Sicherheit anhand von morphologischen Kriterien (Abbildung 3.03 und 3.04) oder anhand der Zeitverläufe der evozierten synaptischen Antworten (Abbildung 3.06) und der spontanen Freisetzungereignisse (Abbildung 3.08) mit hinreichender Sicherheit.

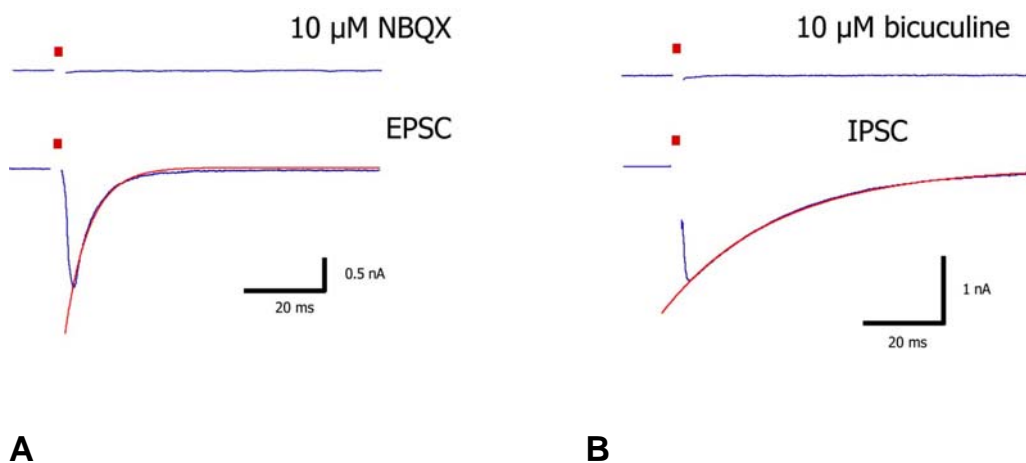
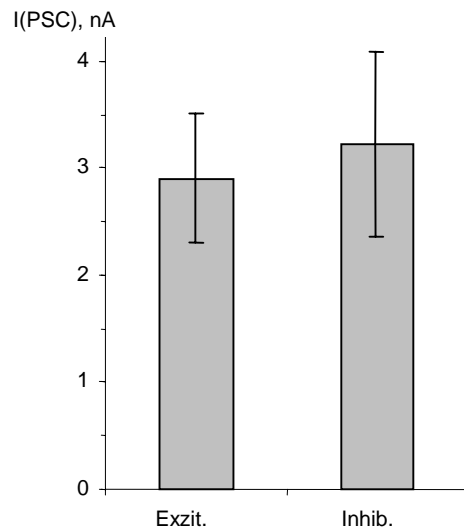
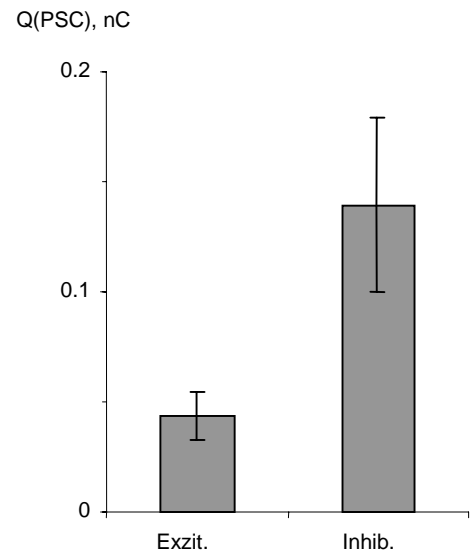


Abbildung 3.06

Typische evozierte autaptische Antworten eines exzitatorischen (A) und eines inhibitorischen Neurons (B). Gemessen wurde jeweils die Stärke des mit der *Patch-Clamp*-Technik aus Spannungsklemme an dem autaptischen Neuron abgeleiteten synaptischen Stroms. Die roten Balken markieren den jeweiligen Zeitpunkt, an dem durch eine 2 ms lange Depolarisation von -70 mV auf 0 mV die Zelle stimuliert wurde. Der anschließend gemessene Strom hängt von Art und Konzentration des freigesetzten Neurotransmitters ab und ist somit ein Maß für die Stärke der synaptischen Antwort. Ströme durch exzitatorischen Neurotransmitter wurden daran eindeutig erkannt, daß sie mit $10 \mu\text{M}$ NBQX und 4 mM Mg^{++} in der externen Lösung vorübergehend nicht mehr nachweisbar waren. Inhibitorische wurden analog in $10 \mu\text{M}$ Bicucullin blockiert (jeweils obere Stromspuren). Die Abfallzeiten der Antworten wurden monoexponential gefittet (rote Graphen): $5,9 \text{ ms} \pm 0,3 \text{ ms}$ für die exzitatorischen synaptischen Antworten, $28 \text{ ms} \pm 0 \text{ ms}$ für inhibitorische Antworten.



A



B

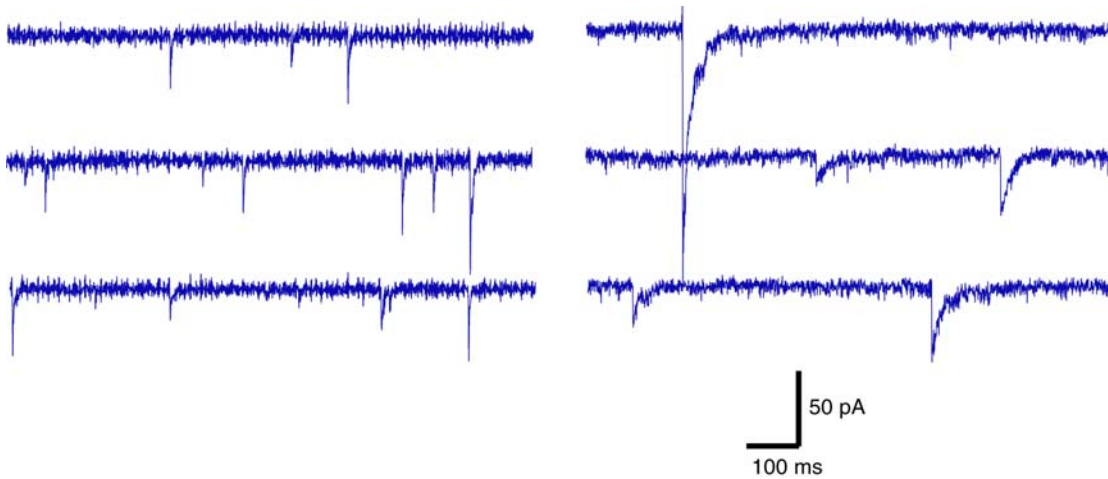
Abbildung 3.07

Quantifizierung der synaptischen Transmission für exzitatorische (jeweils links) und inhibitorische Neuronen (jeweils rechts). Gemessen wurde jeweils der synaptische Strom der Antwort auf ein einzelnes Aktionspotential. Der maximale Wert der Amplitude war mit 2,9 nA \pm 0,6 nA (n = 26) für exzitatorische und 3,2 nA \pm 0,9 nA (n = 16) für inhibitorische Neuronen ungefähr gleich. Die Ladung, die mit der synaptischen Antwort auf ein Aktionspotential floß – ein relatives Maß für die Menge an freigesetzten Neurotransmittern – war für inhibitorische Neuronen mit 0,14 nC \pm 0,04 nC (n = 16) mehr als drei mal größer als für exzitatorische Neuronen mit 0,04 nC \pm 0,01 nC (n = 26).

Spontane Neurotransmitter-Freisetzung

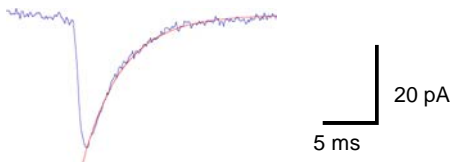
Die Amplitude des synaptischen Stroms ist ein relatives Maß für die vesikuläre Freisetzung von Neurotransmittern. Wenn diese anhand der elektrophysiologischen Meßergebnisse für Neuronen verglichen werden sollen, die in ihren Synapsen nicht die gleichen Neurotransmitter freisetzen, müssen alle Faktoren, die in der Signalkette der Freisetzung nachfolgen – zum Beispiel die spezifischen Eigenschaften der Rezeptoren – berücksichtigt werden, um zu vergleichbaren Zahlen zu kommen. Dazu müssen die Meßergebnisse auf einen weiteren elektrophysiologischen Parameter, dessen Größe von der zu untersuchenden synaptischen Vesikel-Freisetzung unabhängig ist, normiert werden. Für die vorliegende Arbeit wurde dazu jeweils die Ladung bestimmt, die bei Freisetzung des Inhalts eines einzelnen Vesikels fließt. Daraus wurden dann Parameter der synaptischen Transmission als Zahl von Vesikeln berechnet und für exzitatorische und inhibitorische Neuronen verglichen (Abbildung 3.12).

An Synapsen, die Neurotransmitter freisetzen, erfolgt dies nicht nur wie oben beschrieben als Antwort auf Stimulation, sondern auch – im geringeren Umfang – spontan in einzeln nachweisbaren Freisetzungseignissen. Dann wird jeweils nur der Inhalt eines einzelnen Vesikels spontan freigesetzt (Abbildung 3.08). Die in Abbildung 2.04 beschriebene, hier verwendete Meßapparatur war empfindlich genug und ermöglichte eine ausreichend hohe zeitliche Auflösung bei der Messung, so daß auch der Neurotransmitter eines einzelnen freigesetzten Vesikels als charakteristische kurzzeitige Änderung des Stroms quantitativ erfaßt werden konnte (Bekkers und Stevens 1989; Bekkers, Richerson *et al.* 1990). Um die dem Vesikelinhalt entsprechende Ladung zu bestimmen, wurde an Neuronen für drei bis fünf Minuten ohne Stimulation der Haltestrom der Spannungsklemme gemessen und spontane Ereignisse von kurzzeitigen Stromänderungen registriert. Detektiert wurden die Freisetzungseignisse mittels skaliertener Mustererkennung (*Scaled-Template-Methode*), (Clements und Bekkers 1997), welche in dem Programmpaket Axograph (Version 4.6, Axon Instruments, Union City, USA) implementiert ist. Dabei wird zunächst eine doppelt-exponentielle Funktion als Muster definiert, deren Zeitkonstanten so gewählt sind, daß sie möglichst genau dem Zeitverlauf der Freisetzungseignis-Ströme entspricht. Das Muster wird dann unter Variation der Anfangszeit punktweise mit der aufgenommenen Stromspur verglichen und gleichzeitig auf ein minimales Abweichungsquadrat skaliert. Wurde diese während eines Freisetzungseignisses aufgenommen, so sollte sich für den entsprechenden Zeitraum ein signifikantes lokales Minimum in der Abweichungsquadratfunktion finden. Identifizierte Minima wurden registriert. Die Frequenz, sowie Amplitudenmaximum und Ladung der Freisetzungseignisse wurden statistisch ausgewertet (Abbildung 3.09).



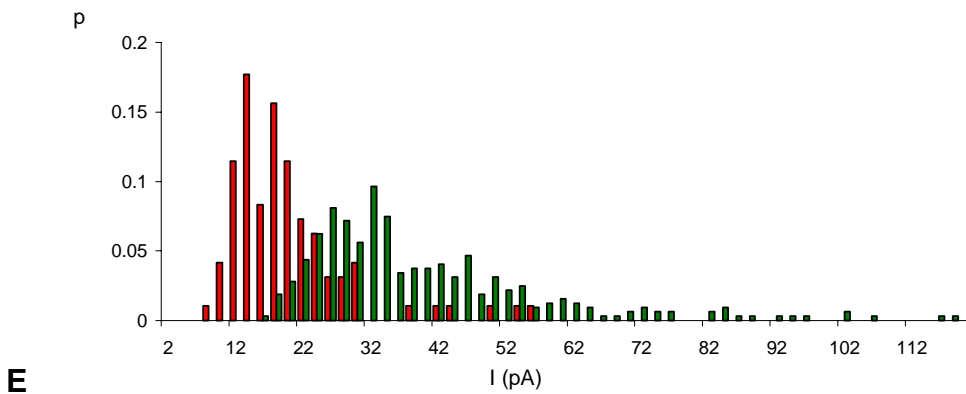
A

B



C

D



E

Abbildung 3.08

Spontane Freisetzung von Neurotransmittern in einer exzitatorischen (**A**) und in einer inhibitorischen Zelle (**B**). Die Stromfluß-Ereignisse (sogenannte *mEPSC* und *mIPSC*) wurden der Freisetzung des Inhalts einzelner Neurotransmitter-Vesikel zugeordnet. **C, D**: der Durchschnitt über die Stromspur aller identifizierten Ereignisse jeweils einer typischen exzitatorischen (**C**) und inhibitorischen (**D**) Zelle. **E**: histogrammischer Vergleich der Strom-Amplitudenmaxima von registrierten Ereignissen.

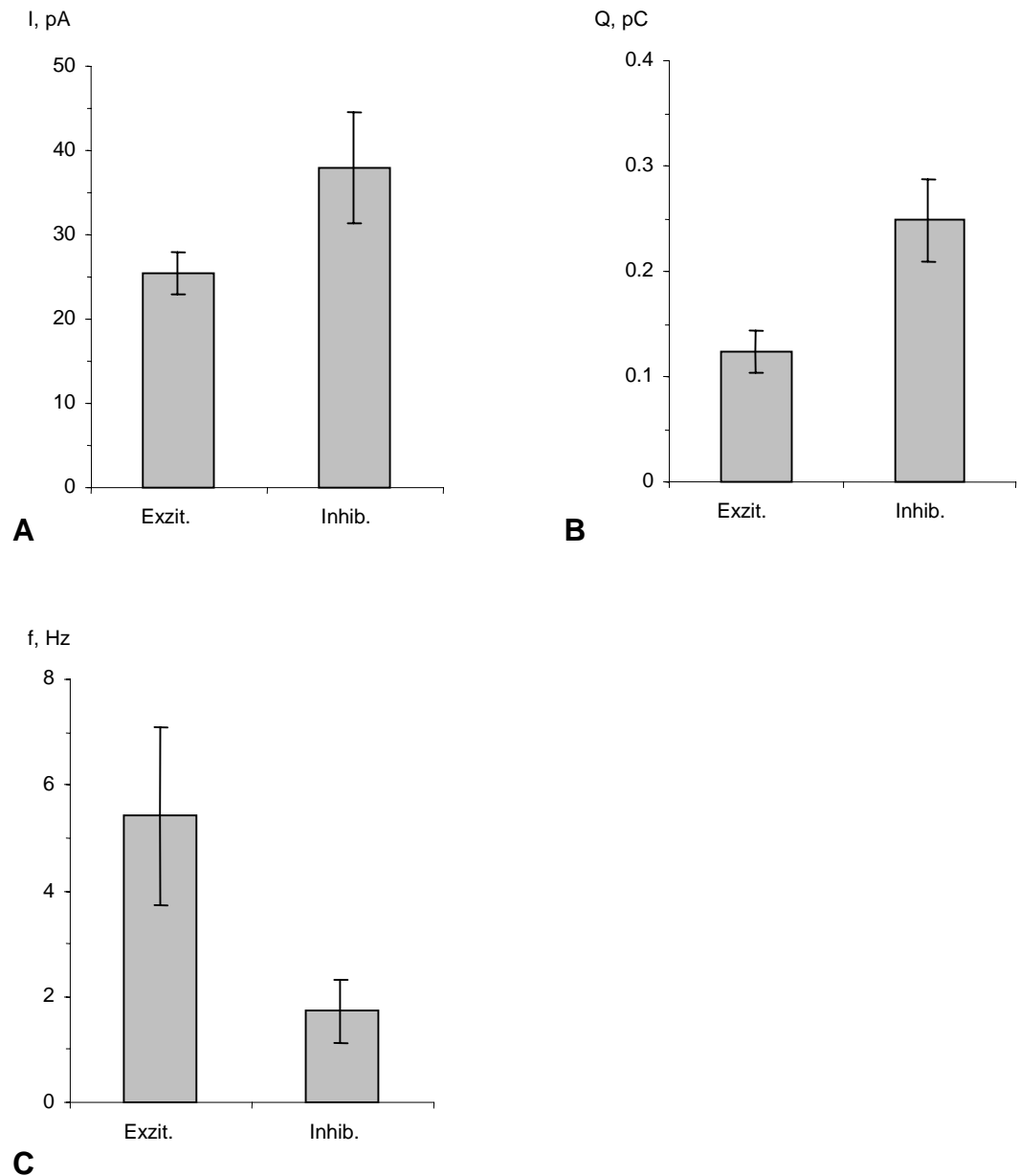


Abbildung 3. 09

Charakterisierung der spontanen Vesikelfreisetzung. Für mindestens drei Minuten wurde an Neuronen aus Spannungsklemme der synaptische Strom gemessen und transiente Ereignisse registriert. **A.** Die jeweilig maximale Amplitude der Ereignisse war in exzitatorischen Neuronen mit $25,4 \text{ pA} \pm 2,5 \text{ pA}$ ($n = 16$) kleiner als in inhibitorischen Neuronen mit $37,9 \pm 6,6$ ($n = 15$). **B.** Dementsprechend waren die exzitatorischen Ereignisse mit $0,12 \text{ pC} \pm 0,02 \text{ pC}$ ($n = 16$) kleiner als die inhibitorischen mit $0,25 \text{ pC} \pm 0,04 \text{ pC}$ ($n = 16$). **C.** Exzitatorische Ereignisse wurden mit einer Frequenz von $5,4 \text{ Hz} \pm 1,7 \text{ Hz}$ ($n = 15$) ungefähr dreimal so häufig registriert wie inhibitorische, die auf $1,7 \text{ Hz} \pm 0,6 \text{ Hz}$ ($n = 15$) kamen.

Größenbestimmung des synaptischen Vorrats an freisetzungskompetenten Vesikeln (*readily releasable pool*)

Ein weiterer wichtiger Parameter für die Charakterisierung einer Neurotransmitter freisetzenden Synapse ist die Zahl der darin befindlichen freisetzungskompetenten Vesikel.

Deren Inhalt setzt ein Neuron mit Applikation einer hypertonen extrazellulären Lösung mit zusätzlichen 500 mM Saccharose innerhalb von wenigen Sekunden frei. Der sogenannte „*Readily Releasable Pool*“ (RRP) ist als ein so bestimmter Vorrat an freisetzungskompetenten Vesikeln definiert (Rosenmund und Stevens 1996). Um die durchschnittliche Anzahl der freisetzungskompetenten Vesikeln für eine Synapse zu bestimmen, ist es wie bei den anderen synaptischen Parametern sehr zweckmäßig, erst die Größe des gesamten Vesikelvorrats für ein Neuron zu quantifizieren und dann das Ergebnis durch die Anzahl der Synapsen zu teilen.

Im Gegensatz zur evozierten synaptischen Antwort erfolgt diese Freisetzung mit Saccharose unabhängig von der akuten intra- und extrazellulären Ca^{++} -Konzentration in der Synapse. Um den Neurotransmitterinhalt des freisetzungskompetenten Vesikelvorrates elektrophysiologisch zu quantifizieren, wurde auf autaptischen Neuronen für fünf Sekunden eine externe Lösung appliziert und währenddessen der synaptische Strom gemessen. Die Ladung der transienten Komponente des Signals (etwa in der ersten Sekunde) sollte dabei zu der Größe jenes Vesikelvorrates proportional sein. Ist die Ladung, die nach Fusion eines Vesikels im Mittel fließt, aus der Analyse der spontanen Freisetzungseignisse bekannt, läßt sich die Zahl der freisetzungskompetenten Vesikel berechnen. Aus dem Strom, der fließt, sobald sich ein Gleichgewicht eingestellt hat, kann die Wiederauffüllrate des Vorrates bestimmt werden. Vereinfachend wird davon ausgegangen, daß die Wiederauffüllrate ab Beginn der Applikation der hypertonen Lösung konstant wäre, was – so die Vermutung – die Größe des Vorrates an freisetzungskompetenten Vesikeln bei sehr großen Wiederauffüllraten geringfügig größer sein läßt als aus der Ladung der transienten Komponente berechnet.

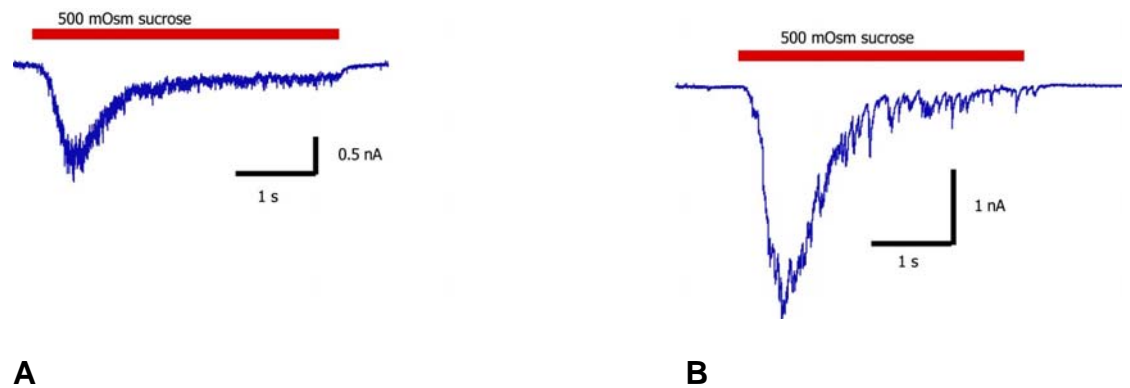


Abbildung 3.10

Bestimmung der Anzahl an freisetzungskompetenten Vesikeln in einem exzitatorischen (**A**) und inhibitorischen Neuron (**B**). Gemessen wurde jeweils der von den autaptischen Neuronen abgeleitete Strom, während die extrazelluläre Lösung mit einer stark hypertonischen Lösung ausgetauscht wurde. Die hypertonische Lösung enthielt zusätzlich 500 mM Saccharose. Durch Integration der Transienten des gemessenen Stroms wird die Gesamtladung der Freisetzung aller Vesikel bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in der nachfolgenden Abbildung 3.11 zusammengefaßt. Bei bekannter Ladung der Freisetzung pro Vesikel läßt sich daraus die Anzahl der Vesikel berechnen, die freigesetzt werden können. Dies definiert den sogenannten „*Readily Releasable Pool*“ (RRP), einen Vorrat an freisetzungskompetenten Vesikeln. Der Vergleich der erhaltenen Zahlenwerte befindet sich zusammengefaßt in Abbildung 3.12.

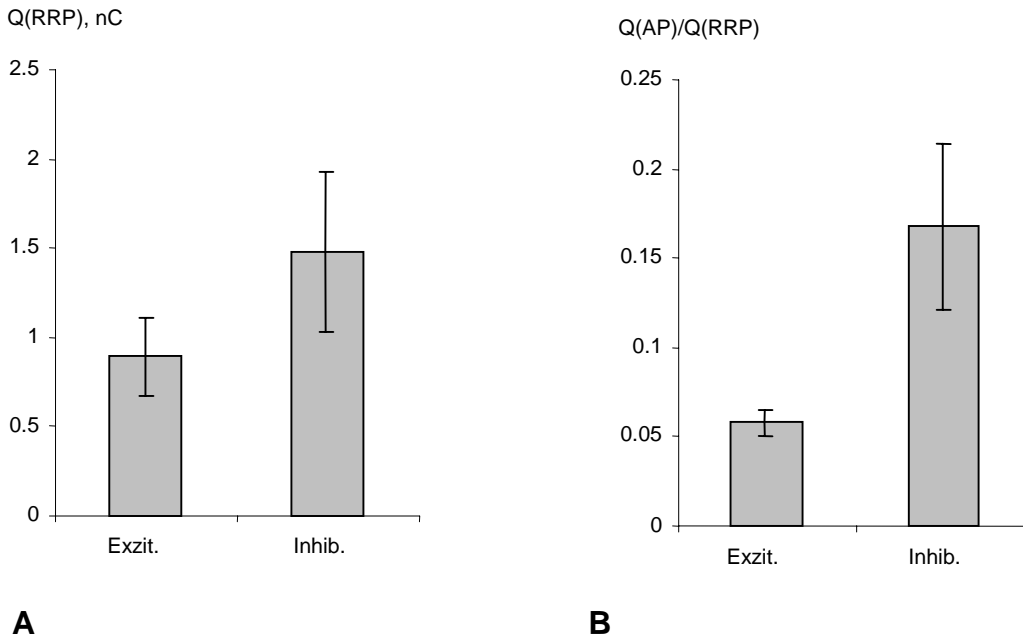


Abbildung 3.11

Quantifizierung des Inhalts aller freisetzungskompetenten Vesikel in exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen (**A**) sowie, als eine direkte Anwendung des Meßergebnisses, der Vergleich der vesikulären Freisetzungswahrscheinlichkeit (**B**).

A: Jeweils die transiente Komponente des während der Applikation von 500 mM Saccharose gemessenen Stroms als Ladung integriert. Für exzitatorische Neuronen wurden 0,89 nC \pm 0,2 nC (n = 16), für inhibitorische Neuronen 1,4 nC \pm 0,5 nC (n = 15) berechnet. Dieser Wert gilt als ein Maß für die Anzahl der freisetzungskompetenten Vesikeln in den Synapsen der untersuchten Zellen.

B: Die vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit wurde als Quotient bestimmt aus der Ladung, die im Mittel als Antwort auf ein Aktionspotential und der Gesamt-Ladung, die bei Applikation von 500 mM Saccharose floß. Die vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit war in inhibitorischen Neuronen mit 0,17 \pm 0,05 (n = 13) ungefähr dreimal so groß wie in exzitatorischen Neuronen mit 0,06 \pm 0,01 (n = 14).

Interpretation der Antwort auf 500 mM Saccharose

Obwohl mit 500 mM Saccharose der gesamte Vorrat an freisetzungskompetenten Vesikeln freigesetzt wird, konnten damit in Gegenwart von FM1-43 Synapsen nicht spezifisch gefärbt werden. Zuvor bereits mit FM1-43 gefärbte Synapsen konnten indes auf diese Weise im geringen Umfang entfärbt werden. Mit K^+ -Depolarisation in einer Stärke, die den Saccharose-definierten Vesikelvorrat ebenfalls vollständig entleert, wurde eine um mehr als eine Größenordnung stärkere Abnahme der Fluoreszenz in den FM1-43-gefärbten Synapsen gefunden (Daten nicht gezeigt). Pyle et al. fanden heraus, daß Synapsen nach FM2-10-Färbung mit hypertoner Lösung erheblich stärker entfärbt werden können als nach Färbung mit FM1-43 (Pyle, Kavalali *et al.* 2000). FM2-10 ist ein Analogon des FM1-43 mit einer geringeren Membranaffinität. Entsprechend schneller kann es ausgewaschen werden (Ryan, Smith *et al.* 1996). Diese Befunde legen nahe, daß die durch hypertone Lösung vermittelte Freisetzung nicht durch den gleichen Mechanismus beschrieben werden kann wie die evozierte synaptische Transmission. Weil FM2-10-gefärbte Synapsen mit 500 mM Saccharose erheblich mehr Färbung abgeben als Synapsen, die mit FM1-43 gefärbt worden waren, sollte die Freisetzung des Neurotransmitter-Vesikelinhaltes in der Saccharose auf einer schnelleren Zeitskala erfolgen als bei durch Aktionspotentiale evozierter Freisetzung. Vor diesem Hintergrund kann nicht ausgeschlossen werden, daß mit Saccharose die Entleerung des Vesikelinhaltes nicht vollständig erfolgt, obgleich die Neurotransmitter Glutamat und GABA nicht membranaffin sind. Daher könnte der RRP etwas größer sein, als es aus dem Strom bei Applikation mit hypertoner Lösung bestimmt wird.

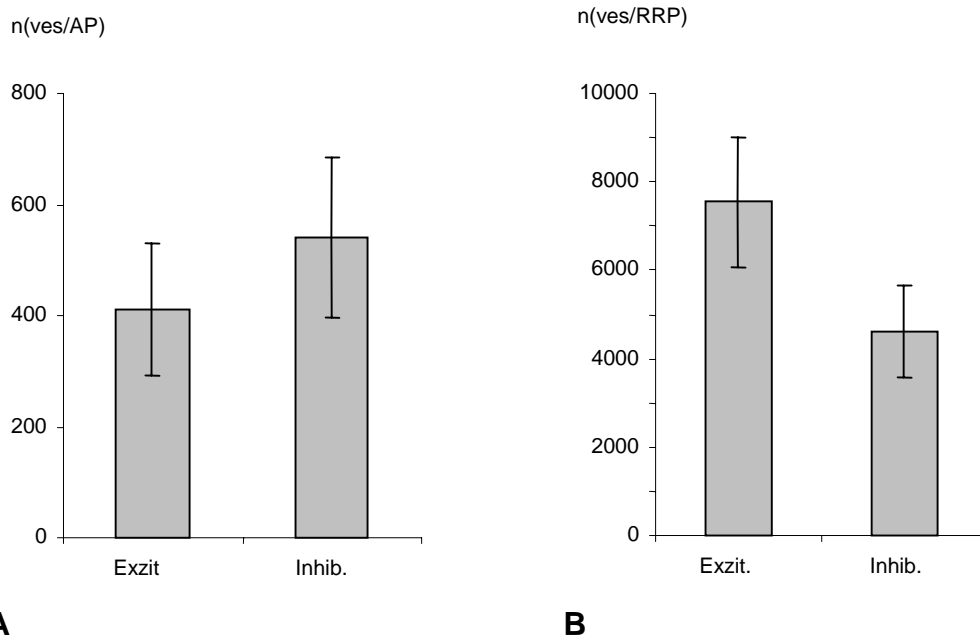


Abbildung 3.12

Vergleich der vesikulären Neurotransmitter-Freisetzung und der Größe des Vorrats an freisetzungskompetenten Vesikeln (*Readily Releasable Pool, RRP*) an exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen.

A. Die Anzahl der an der synaptischen Antwort beteiligten Vesikel wurde aus der Ladung, die als autaptische Antwort auf ein Aktionspotential floß und der Ladung, die im Mittel der spontanen Freisetzung des Inhalts eines einzelnen Vesikels zugeordnet werden konnte, berechnet. Exzitatorische Neuronen setzen mit durchschnittlich 412 ± 119 ($n = 14$) den Inhalt von ungefähr so vielen Vesikeln mit einem Aktionspotential frei wie inhibitorische Neuronen mit 541 ± 145 ($n = 13$).

B. Analog dazu wurde auch die Anzahl der freisetzungskompetenten Vesikel („RRP“) als Quotient bestimmt aus der Größe der Gesamtladung, die bei Applikation von 500 mM Saccharose abgeleitet worden war, und der durchschnittlichen Größe der Ladung nach Freisetzung eines einzelnen Vesikels. Mit 7538 ± 1454 ($n = 14$) wurde der Vesikelvorrat für exzitatorische Neuronen signifikant größer bestimmt als für inhibitorische mit 4617 ± 1036 ($n = 14$). Der Vergleich der beiden Teilabbildungen A und B zeigt, daß die untersuchten inhibitorischen Neuronen eine höhere vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit hatten als die exzitatorischen (vgl. auch Abbildung 3.11).

Bestimmung synaptischer Parameter

Die bis hier vorstellten morphologischen und funktionalen Befunde wurden entweder mit einem bildgebenden oder elektrophysiologischen Verfahren erhoben. Erhoben wurden im wesentlichen Parameter, die die Summe der Eigenschaften aller Synapsen für das ganze Neuron beschreiben. Um auch statistische Aussagen über die einzelne Synapse geben zu können, wurden die beiden Techniken miteinander kombiniert: die elektrophysiologisch erhobenen, funktionalen Befunde wurden jeweils durch die Zahl der beteiligten Synapsen geteilt. Diese wurden morphologisch, also mit Hilfe der bildgebenden Techniken gezählt.

Aktive Synapsen wurden mit FM1-43 oder FM5-95 gefärbt und in den von der Färbung aufgenommenen Bildern gezählt. Die Zahl aller Synapsen eines Neurons wurde anhand der immunozytochemischen Färbung ermittelt (Abbildung 3.05). Der Anteil aktiver Synapsen, also der Quotient aus der Zahl der exozytotisch aktiv erkannten FM1-43- oder FM5-95-Färbungen und der aller immunozytochemisch erkannten Synapsen, war in exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen mit etwa 62 Prozent annähernd gleich (Abbildung 3.13B). Ungeachtet der daraus resultierenden Redundanz in der Datenpräsentation wurden die Durchschnittswerte für synaptische Parameter stets sowohl für aktive Synapsen als auch für die gesamte Synapsenpopulation der untersuchten Zellen bestimmt und werden im Folgenden auch jeweils beide nebeneinander vorgestellt.

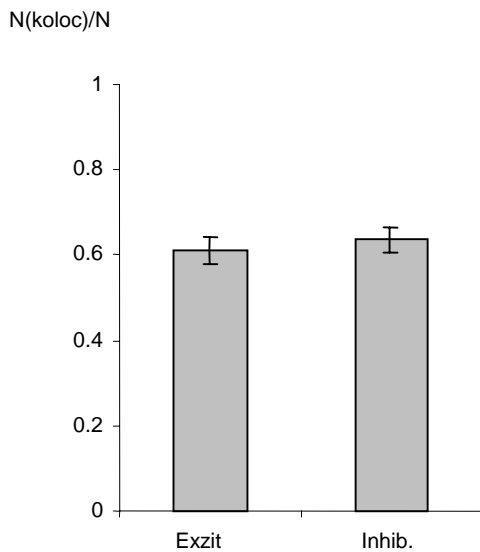


Abbildung 3.13

Vergleich des Anteils aktiver Synapsen in exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen. Gezählt wurden jeweils die durch immunozytochemische Färbung erkannten Synapsen. Berücksichtigt wurde dabei jeweils, ob diesen auch eine spezifische FM1-43-Entfärbung und damit endo- und exozytotische Aktivität zugeordnet werden konnte. Der Anteil der so zugeordneten Synapsen unterschied sich mit $0,63 \pm 0,04$ ($n = 10$; n (Synapsen) = 3005) für exzitatorische Neuronen nicht signifikant von dem der inhibitorischen Neuronen mit $0,61 \pm 0,05$ ($n = 7$; n (Synapsen) = 1819).

Bestimmung der „synaptischen Freisetzungswahrscheinlichkeit“

In den vorausgehenden Abschnitten wurde unter anderem die vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit behandelt. Gemeint wird damit die Wahrscheinlichkeit, mit der der Inhalt eines freisetzungskompetenten Vesikels kurz nach Auslösung eines Aktionspotentials freigesetzt wird. Bestimmt wurde dieser Parameter als Quotient aus der Zahl der pro Aktionspotential freigesetzten Vesikelinhalte und der Größe des Vorrats an freisetzbaren Vesikeln (Abbildung 3.12). Nicht verwechselt werden sollte der Wert mit der sogenannten „synaptischen Freisetzungswahrscheinlichkeit“, also der Wahrscheinlichkeit, mit der eine Synapse mit einem Aktionspotential den Inhalt eines Vesikels freisetzt. Letzterer wurde als Quotient aus pro Aktionspotential freigesetzten Vesikelinhalten und der Zahl der freisetzenden Synapsen bestimmt (Hessler, Shirke *et al.* 1993; Rosenmund, Clements *et al.* 1993). Offenbar kann der Wert auch durchaus größer als eins sein; genau genommen handelt es sich somit nicht um eine „Wahrscheinlichkeit“. Tatsächlich wurden für aktive inhibitorische aktive Synapsen wiederholt Werte größer als eins bestimmt. Im Durchschnitt lag er nur knapp darunter. Entweder kann dies mit einer multi-vesikulären Freisetzung in Zusammenhang gebracht werden (vgl. Diskussion, Seiten 102f.), es könnte sich aber auch um eine Folge einer Aktivität der Synapsen sein, deren FM1-43-Färbung und -Entfärbung zu schwach war, um als exozytotisch aktiv erkannt zu werden. Unter den untersuchten exzitatorischen Neuronen wurde hingegen keines gefunden, in dem die Anzahl der freigesetzten Vesikelinhalte pro aktive Synapse und Aktionspotential eindeutig größer als eins war. Wie auch immer man den Parameter nennt – im Durchschnitt war er für inhibitorische Synapsen ungefähr dreimal größer als für exzitatorische Synapsen.

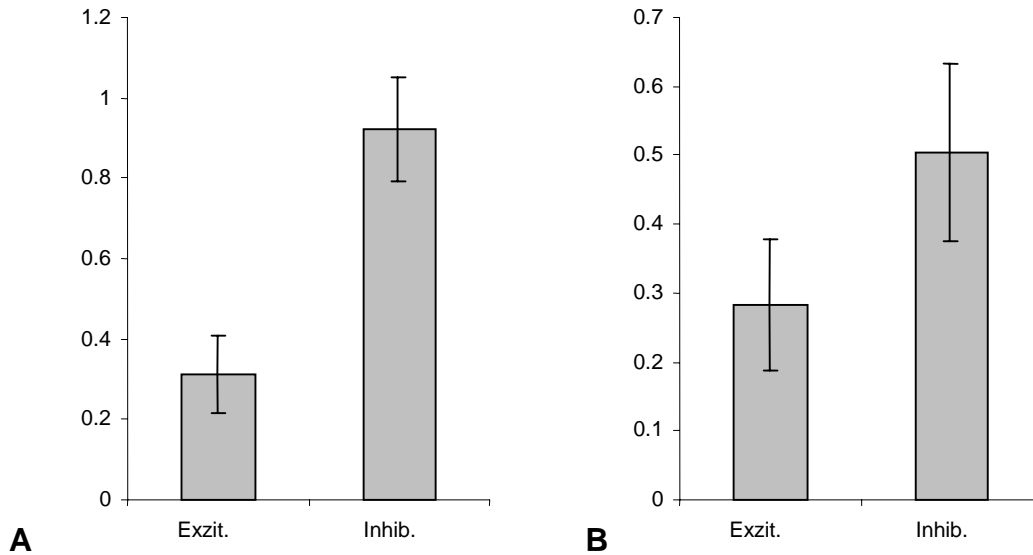


Abbildung 3.14

Vergleich der Anzahl der pro Aktionspotential und Synapse durchschnittlich freigesetzten Vesikelinhalte an exzitatorischen (jeweils links) und inhibitorischen Neuronen (jeweils rechts). Diese sogenannte „synaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit“ wurde für alle aktiven Synapsen (**A**) und für alle identifizierten Synapsen (**B**) berechnet. Die Anzahl der mit einem Aktionspotential durchschnittlich freigesetzten Neurotransmitter-Vesikelinhalte war in exzitatorischen aktiven Synapsen mit $0,31 \pm 0,1$ ($n = 11$; n (Synapsen) = 1316) etwa dreimal kleiner als bei inhibitorischen aktiven Synapsen mit $0,92 \pm 0,1$ ($n = 12$; n (Synapsen) = 877).

Vergleich des synaptischen Vesikelvorrats (RRP)

Die Anzahl der freisetzungskompetenten Vesikel je aktive Synapse, also die Größe des synaptischen Vesikelvorrates oder *RRP*, war in inhibitorischen Synapsen nicht signifikant anders als in exzitatorischen Synapsen. Berechnet auf die Zahl aller als aktiv gezählten Synapsen waren dies ungefähr elf Vesikel pro Synapse. Unter Berücksichtigung aller immunozytochemisch identifizierten Synapsen waren es zwischen vier und fünf Vesikel pro Synapse (Abbildung 3.15)

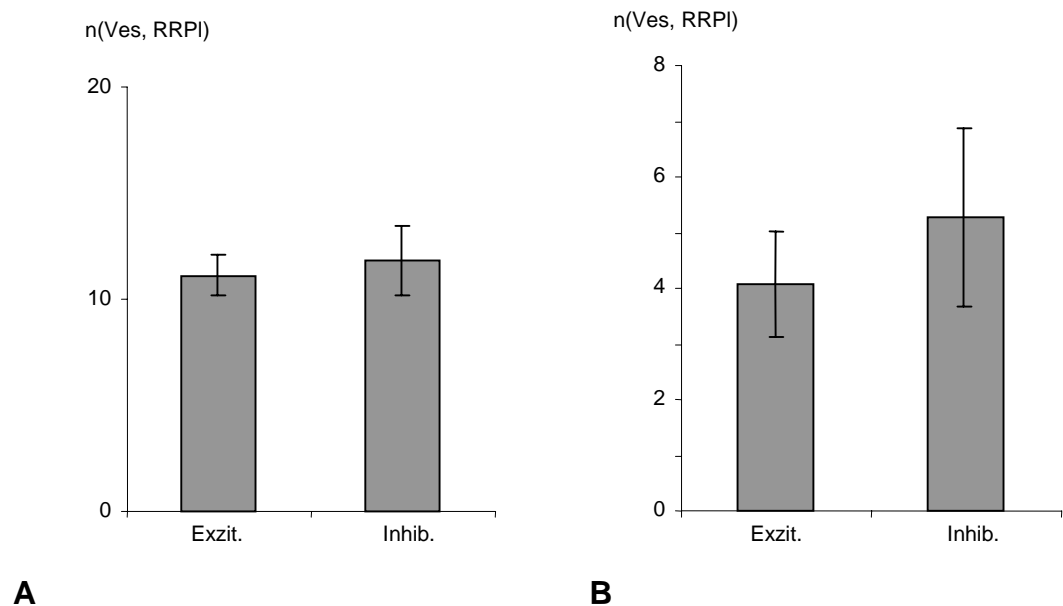


Abbildung 3.15

Vergleich der Größe des Vesikelvorrates pro exzitatorische (jeweils links) und inhibitorische Synapse (jeweils rechts). **A.** Die Anzahl der freisetzungskompetenten Vesikel war in exzitatorischen aktiven Synapsen mit $11,1 \pm 5,4$ ($n(\text{Zellen}) = 11$; $n(\text{Synapsen}) = 1342$) ungefähr gleich hoch wie in inhibitorischen aktiven Synapsen mit $11,8 \pm 5,6$ ($n(\text{Zellen}) = 6$; $n(\text{Synapsen}) = 966$). **B:** Berechnet für alle identifizierten Synapsen, waren es $4,0 \pm 0,9$ exzitatorische Vesikel ($n(\text{Zellen}) = 9$; $n(\text{Synapsen}) = 1797$) oder $5,3 \pm 1,6$ inhibitorische Vesikel ($n(\text{Zellen}) = 11$; $n(\text{Synapsen}) = 1954$).

Vergleich der Häufigkeit spontaner Freisetzungereignisse

Die Frequenz, mit der eine einzelne Synapse Neurotransmitter spontan freisetzt, war im Gegensatz zur Größe der Antwort auf Aktionspotentiale (vgl. Abbildung 3.12) bei exzitatorischen Synapsen etwa dreimal höher als bei inhibitorischen Synapsen.

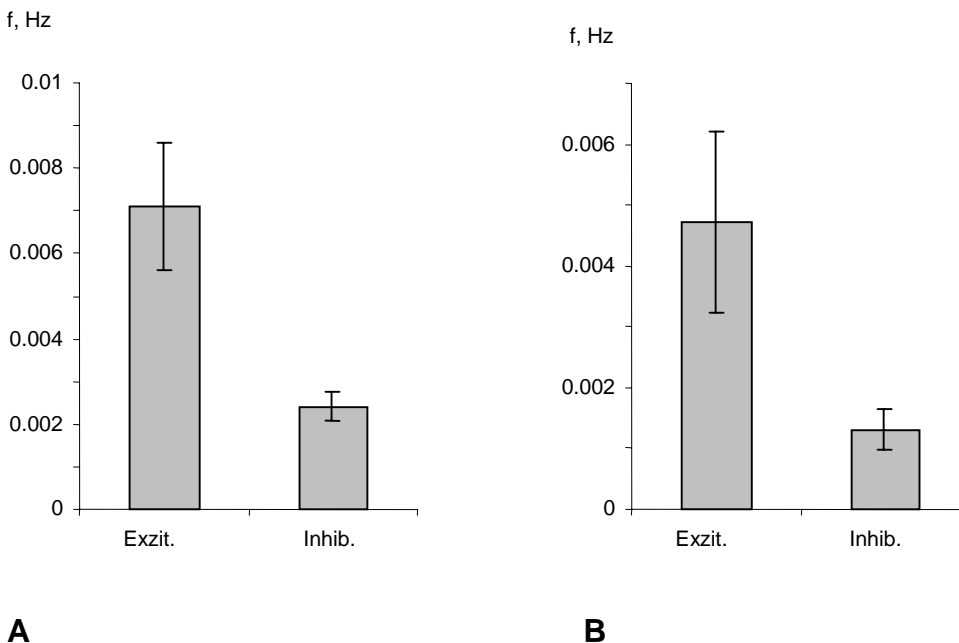


Abbildung 3.16

Die Frequenz spontaner Vesikel-Freisetzungereignisse an exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen. Zum Vergleich: die Freisetzung des Inhalts eines Vesikels in fünf Minuten entspricht einer Freisetzungsfrequenz von 0,0033 Hz.

A. Die Frequenz der Freisetzungereignisse war in exzitatorischen aktiven Synapsen mit 0,0071 Hz \pm 0,002 Hz ($n = 13$; n (Synapsen) = 1642) größer als in aktiven inhibitorischen Synapsen, die mit einer Frequenz von 0,0024 Hz \pm 0,001 Hz ($n = 7$; n (Synapsen) = 966) freisetzten. Teilabbildung **B** zeigt die analogen Werte, für alle Synapsen berechnet, also unter Berücksichtigung derer, die nicht als aktiv erkannt worden waren.

Übersicht: Vergleich exzitatorischer mit inhibitorischen Synapsen

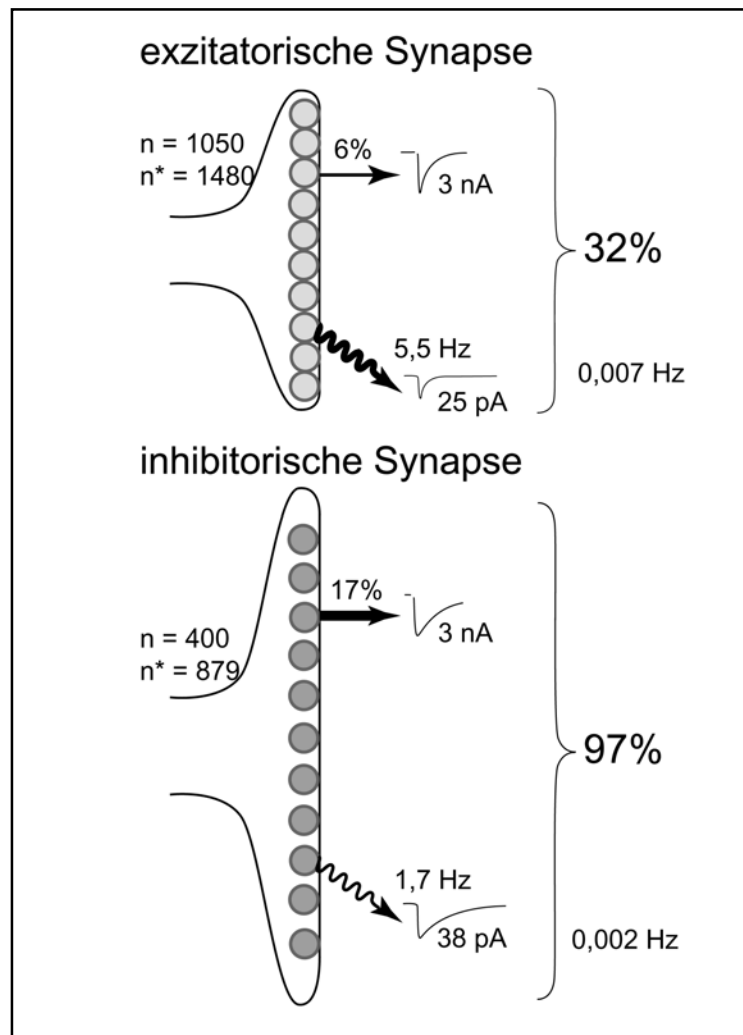


Abbildung 3.17

Zusammenfassung der wichtigsten Befunde zum Vergleich exzitatorischer mit inhibitorischen Synapsen. Inhibitorische Neuronen hatten weniger als halb so viele Synapsen wie exzitatorische (Zahlen oben rechts; Abbildung 3.05). Der Anteil aktiver Synapsen war ungefähr gleich (Quotient aus den Zahlen oben rechts; Abbildung 3.13). Die spontane Freisetzung von Vesikeln fand bei letzteren mit einer mehr als dreimal höheren Frequenz statt (geschwängelter Pfeil; Abbildung 3.16), allerdings waren die durchschnittlichen Amplituden der inhibitorischen Freisetzungereignisse um die Hälfte größer. Exzitatorische und inhibitorische Synapsen hatten ungefähr gleich viele Vesikel (Kreise; Abbildung 3.09). Unter der Berücksichtigung der geringeren Zahl an Synapsen in inhibitorischen Neuronen ergab sich schließlich, daß inhibitorische Synapsen mit 17 Prozent eine ungefähr dreimal größere vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit hatten als die sechs Prozent in den exzitatorischen (gerader Pfeil; Abbildung 3.11). Diese Anzahl der pro Aktionspotential und Synapse durchschnittlich freigesetzten Vesikelinhalte (die „synaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit“) war an inhibitorischen Synapsen ebenfalls ungefähr dreimal größer als an exzitatorischen Synapsen (rechts der geschweiften Klammer; Abbildung 3.14).

Die Rolle von Munc13-1 bei der synaptischen Transmission

Innerhalb eines Neurons sind die Synapsen – wie gezeigt – hinsichtlich ihrer statischen Eigenschaften funktional heterogen. Dies gilt auch im Bezug auf die Plastizität, mit der sie auf starke Stimulation antworten. Es ist naheliegend, daß auf molekularer Ebene die synaptische Plastizität durch die sogenannten *priming*-Faktoren bestimmt wird. Letztere sind Proteine oder Proteinstrukturen, die essentiell dafür sind, daß an der synaptischen Plasmamembran lokalisierte Neurotransmitter-Vesikel auch freisetzungskompetent werden. Den Inhalt freisetzungskompetenter Vesikel kann eine Synapse als Antwort auf ein von einem Aktionspotential herrührendes Ca^{++} -Signal freisetzen (vgl. das Schema in Abbildung 1.02). In hippocampalen Neuronen sind die Proteine Munc13-1 und Munc13-2 essentielle *priming*-Faktoren (Augustin, Rosenmund *et al.* 1999). Exzitatorische Synapsen des Hippocampus enthalten offensichtlich entweder funktionales Munc13-1 oder funktionales Munc13-2, was den Synapsen jeweils eine unterschiedliche Plastizität verleiht (Rosenmund, Sigler *et al.* 2002; Varoqueaux, Sigler *et al.* 2002). Dies ergaben Untersuchungen mit elektrophysiologischen und kombiniert bildgebenden Methoden. Im Folgenden sollen einige der Befunde der beiden genannten Publikationen, die in einem Kooperationsprojekt des Autors mit Christian Rosenmund, Iris Augustin, Kerstin Reim, Nils Brose, Jeong Seop Rhee, Carsten Enk und Frederique Varoqueaux entstanden, in ausgewählten Details wiedergegeben werden. Ergänzt werden sie durch zusätzliche elektrophysiologische Messungen, deren Ergebnisse die der beiden genannten Publikationen bestätigen.

Charakterisierung des Phänotyps der Munc13-1-Defizienz

Mäuse, denen Munc 13-1 in den Synapsen durch genetische Manipulation fehlt, sind nur wenige Stunden lebensfähig; in ihren Mägen findet man keine Milch (Abbildung 3.18). Morphologische Besonderheiten der Hippocampi neugeborener Mäuse ohne Munc 13-1 sind indes nicht bekannt und wurden auch nicht gefunden.



Abbildung 3.18

Eine neugeborene Munc13-1-defiziente Maus (rechts) neben einer Wildtyp-Maus (links) aus dem gleichen Wurf. An letzterer ist ein gefüllter Magen weiß schimmernd zu erkennen (Pfeil); sie hat bereits von der Mutter Milch bekommen. Munc13-1 defiziente Mäuse sind dazu nicht in der Lage. Sie überleben den Tag ihrer Geburt nicht (Augustin, Rosenmund *et al.* 1999). Abgesehen davon sind keine offensichtlichen morphologischen Unterschiede zwischen Munc13-1-defizienten und anderen Mäusen bekannt. Der Körper der linken Maus auf dem Bild ist ohne Schwanz ungefähr 2,5 cm lang, der Körper der rechten mißt ungefähr 2 cm. Das Photo wird freundlicherweise von Frederique Varoquaux (MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Charakterisierung des Phänotyps der Munc13-1-Defizienz in Synapsen

Hippocampale Neuronen ließen sich wie oben für wildtypische Neuronen beschrieben autaptisch kultivieren. Autaptische Munc13-1-defiziente Neuronen antworten, verglichen mit dem Wildtyp, auf einzelne Aktionspotentiale mit einer auf durchschnittlich ungefähr zehn Prozent verkleinerten synaptischen Amplitude (Augustin, Rosenmund *et al.* 1999). Des weiteren zeigen sie Besonderheiten in der synaptischen Plastizität (Rosenmund, Sigler *et al.* 2002). Beides wird in der vorliegenden Arbeit weiter unten auch behandelt und bestätigt (Abbildungen 3.23 f.).

Um zu untersuchen, ob die exzitatorischen Munc 13-1-defizienten Neuronen weniger aktive Synapsen haben oder ob deren Synapsen weniger aktiv sind, wurde die Kombination aus elektrophysiologischen und bildgebenden Verfahren eingesetzt. Mit der *Patch-Clamp-Technik* wurden die synaptischen Ströme autaptischer Neuronen quantifiziert und mit FM1-43-Färbung die Zahl der jeweils daran beteiligten Synapsen bestimmt.

Der Anteil aktiver Synapsen war in wildtypischen Neuronen ungefähr sieben mal größer als in Munc13-1-defizienten Neuronen (Abbildung 3.19), was ungefähr dem durchschnittlichen Unterschied der elektrophysiologisch bestimmten Stromamplitude der synaptischen Antwort entspricht. Folglich müssen die deletionsmutierten Neuronen einen hohen Anteil an „inaktiven“ Synapsen besitzen, die keine nachweisbare exozytotische Aktivität haben (Rosenmund, Sigler *et al.* 2002). Abweichend von den anderen in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Befunden wurden die Synapsen nicht nach visueller Erkennung gezählt, sondern lediglich mittels des im Abschnitt „Methoden“ vorgestellten rechnergestützten Verfahrens in einer vereinfachten Form identifiziert. Die absoluten Zahlenwerte sind vor diesem Hintergrund nicht direkt mit denen vergleichbar, die zur Erhebung der anderen Befunde, insbesondere zur Charakterisierung der anderen Deletionsmutanten, erhalten wurden.

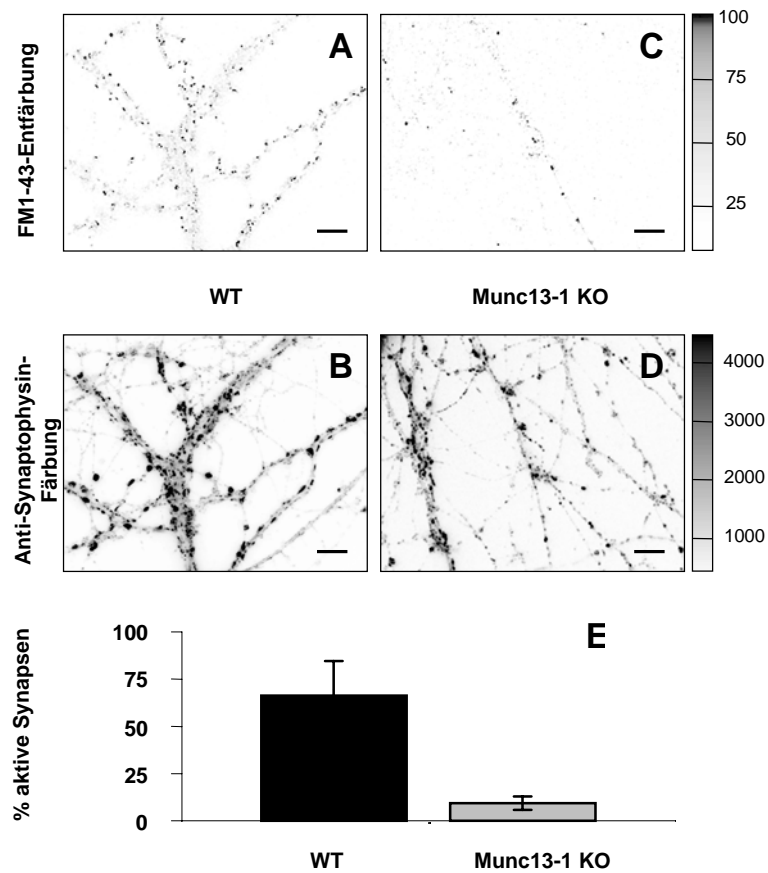


Abbildung 3.19

Bestimmung des Anteils aktiver Synapsen in Munc13-1-defizienten Neuronen. Wildtyp- (A) und Munc13-1 defiziente (C) exzitatorische Neuronen wurden mit FM1-43 gefärbt und durch Stimulation mit Aktionspotentialen entfärbt. In den Bildern der oberen Reihe ist in je einem typischen Beispiel die spezifische Entfärbung zu sehen (A, C). Die selben Zellen wurden anschließend fixiert und immunocytochemisch gegen Synaptophysin gefärbt (B, D). Der Anteil aktiver Synapsen, hier berechnet als Quotient der Zahl FM1-43 entfärbter Synapsen und der Zahl der immunocytochemisch definierten Synapsen, war in wildtypischen Neuronen mit 66,3 % \pm 4,3 % (n = 18) ungefähr siebenmal größer als in Munc13-1 defizienten Neuronen mit 9,4 % \pm 1,0 % (n = 12) (E). Die Größenbalken indizieren jeweils 5 μ m.

Inhibitorische Munc13-1 defiziente Neuronen unterschieden sich in Bezug auf die synaptischen Amplituden nicht vom Wildtyp (vgl. Abb 3.24) und hatten auch eine vom Wildtyp nicht unterscheidbare Verteilung aktiver Synapsen (Daten nicht gezeigt). Durch Infektion mit einem *Semliki-Forest-Virus*, das entweder ein Munc13-1- oder ein Munc13-2-EGFP-Fusionsprotein exprimieren läßt (Ashery, Varoqueaux *et al.* 2000), konnte sowohl die Amplitude der synaptischen Ströme auf Wildtyp-Niveau (Rosenmund, Sigler *et al.* 2002) als auch der Anteil aktiver Synapsen auf 56 % +/- 3 % (n = 3) erhöht werden (Daten nicht gezeigt), letztere allerdings nur in einer kleineren Stichprobe. Für die Aktivität der meisten Synapsen eines exzitatorischen Neurons aus dem Hippocampus war somit Munc13-1 essentiell, wobei in den selben Neuronen stets auch Synapsen gefunden wurden, deren Aktivität von Munc13-1 unabhängig war. Im Folgenden soll gezeigt werden, daß diese Synapsen sich offensichtlich stattdessen des Munc13-2 bedienen.

Munc13-2

Im Gegensatz zu Munc13-1-defizienten Mäusen sind Munc13-2-defiziente Mäuse lebensfähig. Sie erscheinen gesund und sind fortpflanzungsfähig. Ein offensichtlicher Phänotyp wurde bislang nicht gefunden. Autaptische Neuronen aus dem Hippocampus solcher Tiere waren von der Wildtyp-Kontrollgruppe weder morphologisch noch elektrophysiologisch zu unterscheiden (Daten nicht gezeigt).

Der Phänotyp der Munc13-1- und Munc13-2-Doppeldefizienz zeigte sich hingegen um so stärker: Mäuse, denen beide Proteine fehlen, kamen ausschließlich als Totgeburt zur Welt. Offensichtlich starben sie perinatal, weil die Atmung nicht wie notwendig einsetzte.



Abbildung 3.20

Durch am 18. Schwangerschaftstag per Kaiserschnitt geborene Munc13-1/2-doppeldefiziente Mäuse (links, mitte) neben einer Munc13-2-(einfach-)defizienten Maus (rechts) aus dem gleichen Wurf. Die mittlere und die linke Maus war ungefähr 1,5 cm lang. Nur die rechte Maus atmete. Während Munc13-2-defiziente Mäuse ohne offensichtlichen Phänotyp lebens- und fortpflanzungsfähig sind, sterben die doppeldefizienten Mäuse noch während der Geburt (Varoqueaux, Sigler *et al.* 2002). Das Photo wird von Frederique Varoqueaux (MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Obwohl die Mäuse mit Munc13-1/2-Doppeldefizienz nach Geburt nicht lebensfähig waren, konnte deren hippocampale Neuronen wie wildtypische Zellen autaptisch kultiviert werden. Die Neuronen entwickelten sich mit einer nicht vom Wildtyp zu unterscheidenden Morphologie; sie bildeten die gleiche Anzahl und Dichte von immunozytochemisch nachweisbaren Synapsen (Abb. 3.21). Elektrophysiologisch waren die Unterschiede hingegen maximal: in keinem einzigen exzitatorischen oder inhibitorischen Neuron aus Hippocampi ohne Munc13-1 und Munc13-2 konnte bei normalen passiven Zelleigenschaften eine synaptische Antwort auf Stimulation durch Aktionspotentiale oder 500 mM Saccharose elektrophysiologisch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch mit sehr starker Stimulation wurde keinerlei spezifische Färbung und Entfärbung mit FM1-43 an solchen Neuronen gefunden (Abbildung 2.06). In den Munc13-1/2-doppeldefizienten Neuronen fand demnach keine exozytotische Neurotransmitter-Freisetzung statt. Die synaptische Transmission, die in Munc13-1- und in Munc13-2-defizienten gefunden wurde, ist der Aktivität einer jeweiligen Subpopulation der Synapsen mit der jeweils nicht fehlenden Munc13-Form zuzuordnen (Varoqueaux, Sigler *et al.* 2002).

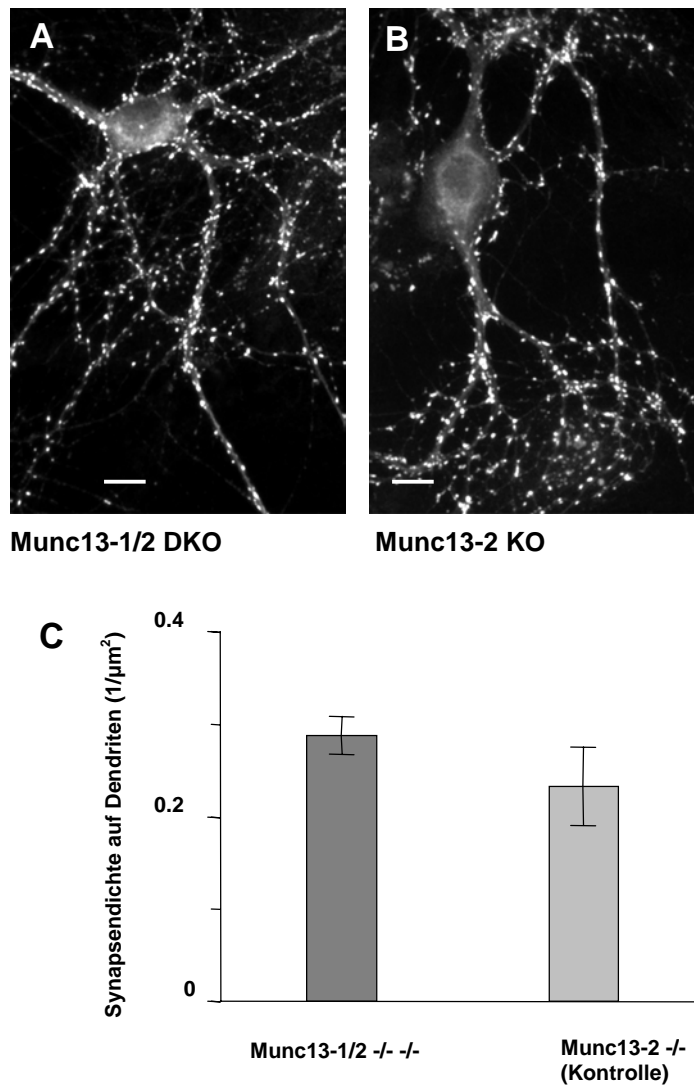
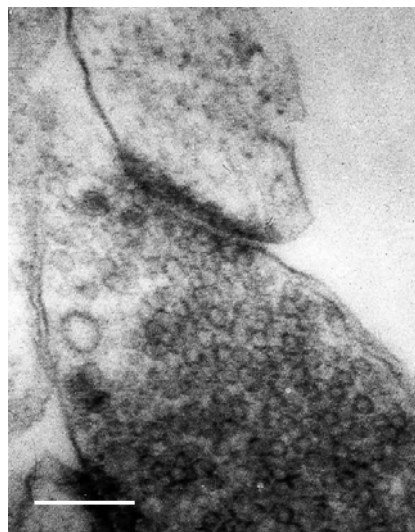
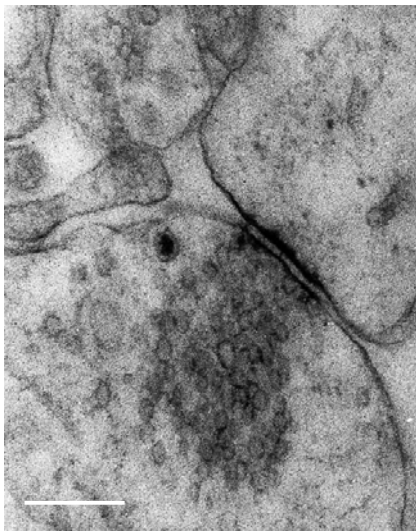


Abbildung 3.21

Munc13-1/Munc-13-2-doppeldefiziente Neuronen bildeten in autaptischer Kultur Synapsen in normaler Dichte aus. **A**, **B**. Immunocytochemische Färbung von Munc13-1/Munc-13-2-doppeldefizienten Neuronen (**A**) und Munc13-2-defizienten Neuronen gegen den Synaptophysin als Nachweis für Synapsen. Der sekundäre Antikörper war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa-488 markiert. Der weiße Größenbalken entspricht einer Länge von 10 μm. **C**. In bezug auf die Synapsendichte wurde zwischen beiden Gruppen kein Unterschied festgestellt: an Munc13-1/Munc-13-2-doppeldefizienten Neuronen wurden 0,28 +/- 0,02 Synapsen (n = 9) pro μm Dendritenfläche gezählt. In der Kontrollgruppe waren es 0,23 +/- 0,04 Synapsen (n = 9).

Elektronenmikroskopisch ließen sich an Munc13-1/2-doppeldefizienten Synapsen, die keine freisetzungskompetente Vesikel enthalten, dennoch auch Vesikel in normaler Zahl finden, die an der Plasmamembran angelagert waren. In der folgenden Abbildung 3.22 werden je zwei Beispiele gezeigt für elektronenmikroskopische Aufnahmen von Munc13-1/2-doppeldefizienten Synapsen und Synapsen einer dem Wildtyp entsprechenden Kontrollgruppe. Man kann die untenstehenden vier Bilder zu den Genotypen der gezeigten Synapsen auch rein visuell zuordnen und zwar anhand des zu erkennenden Abstandes derjenigen Vesikel zur Zellmembran, die dieser am nächsten stehen. Dieser durchaus offensichtliche Phänotyp bestätigt zusätzlich den oben vorgestellten Befund, daß die Munc13-Isoformen in den zur Kontrollgruppe gehörigen Synapsen für das *priming* essentiell gewesen waren.

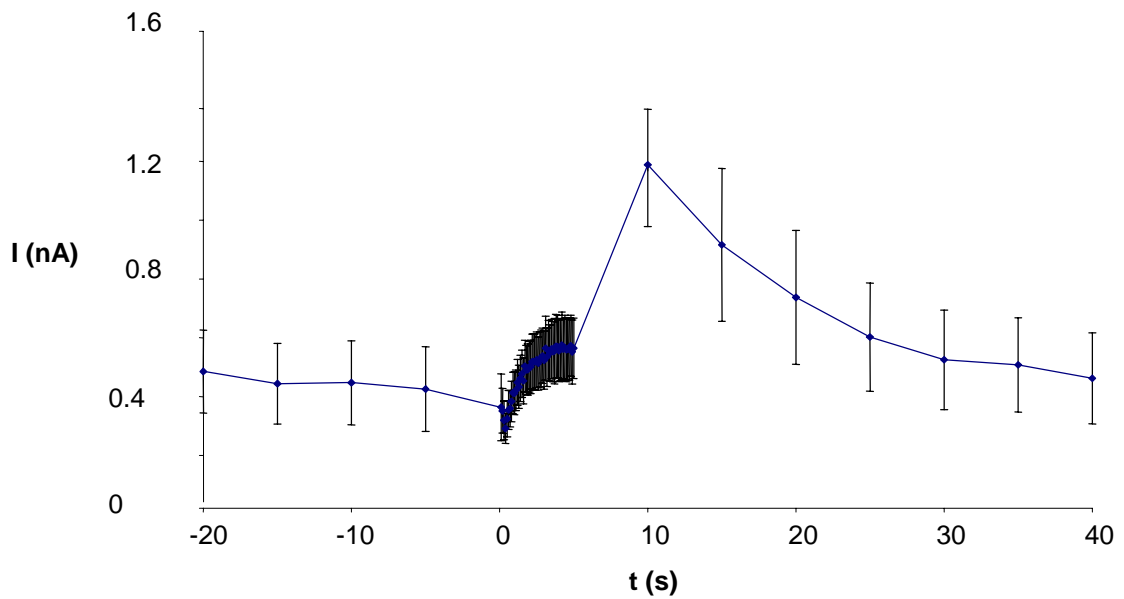


← Abbildung 3.22

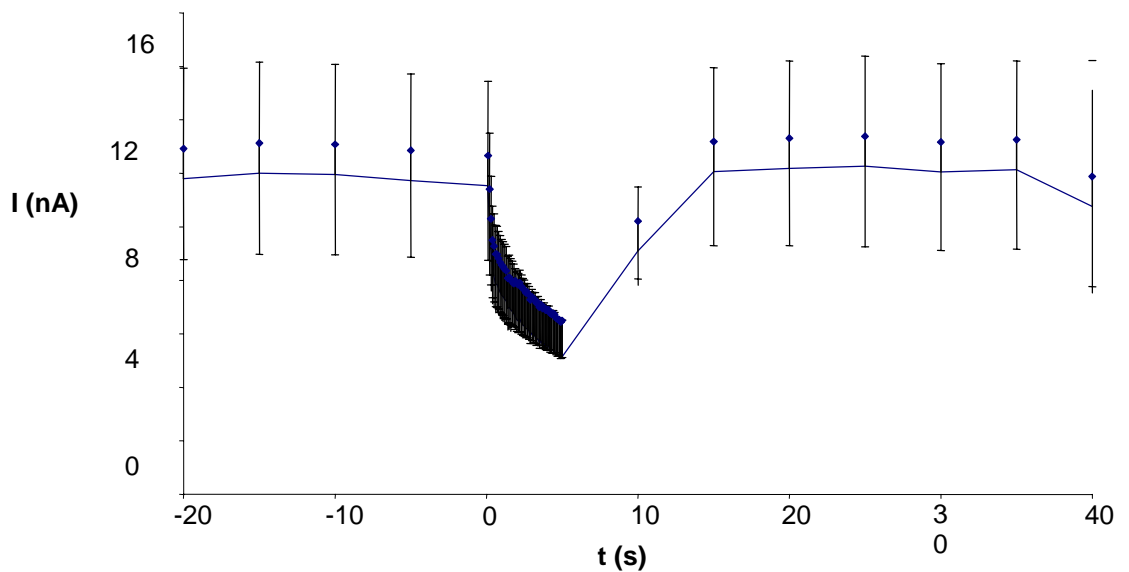
Morphologie Munc13-1/Munc-13-2-doppeldefizienter Synapsen. Gezeigt ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Munc13-1/Munc-13-2-doppeldefizienten Neuronen (jeweils links) und, als Kontrollgruppe, Munc-13-2-defizienten Neuronen (jeweils rechts). Die Länge der Größenbalken entsprechen 500 nm im Objekt. Man beachte, daß in den doppeldefizienten Synapsen an der Plasmamembran angelagerte Vesikel weniger dicht an der Zellmembran stehen als in der Kontrollgruppe. Diesen Befund bestätigt den in Abbildung 1.02 schematisch wiedergegebenen Mechanismus, wonach die Bildung freisetzungskompetenter Vesikel in zwei Schritten erfolgt: erst werden die Vesikel an die Plasmamembran abgelagert, dann erfolgt Reifung, wobei die Vesikel durch SNARE-Proteine eng an die Plasmamembran gezogen werden (vgl. Einleitung). Die Aufnahmen wurden von Frederique Varoqueaux (MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen) angefertigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Der Einfluß von Munc13-1 und Munc13-2 auf die Plastizität exzitatorischer Synapsen

Ungewöhnlich und bislang wohl einzigartig am elektrophysiologischen Phänotyp der Munc13-1-defizienten Neuronen aus dem Hippocampus ist die Plastizität, mit der sie auf höherfrequente Stimulation antworten (Rosenmund, Sigler *et al.* 2002), was durch im Folgenden wiedergegebene Befunde bestätigt wird. Während wildtypische Neuronen bei 10 Hz mit auf weniger als die Hälfte reduzierter exzitatorischer Amplitude antworteten, augmentierten die Munc13-1-defizienten Neuronen, in denen nur aktive Synapsen mit Munc13-2 gewesen sein konnten, ihre Antwort während und vor allem einige Sekunden nach der Stimulation auf das Dreifache (Abbildung 3.23 und 3.24).



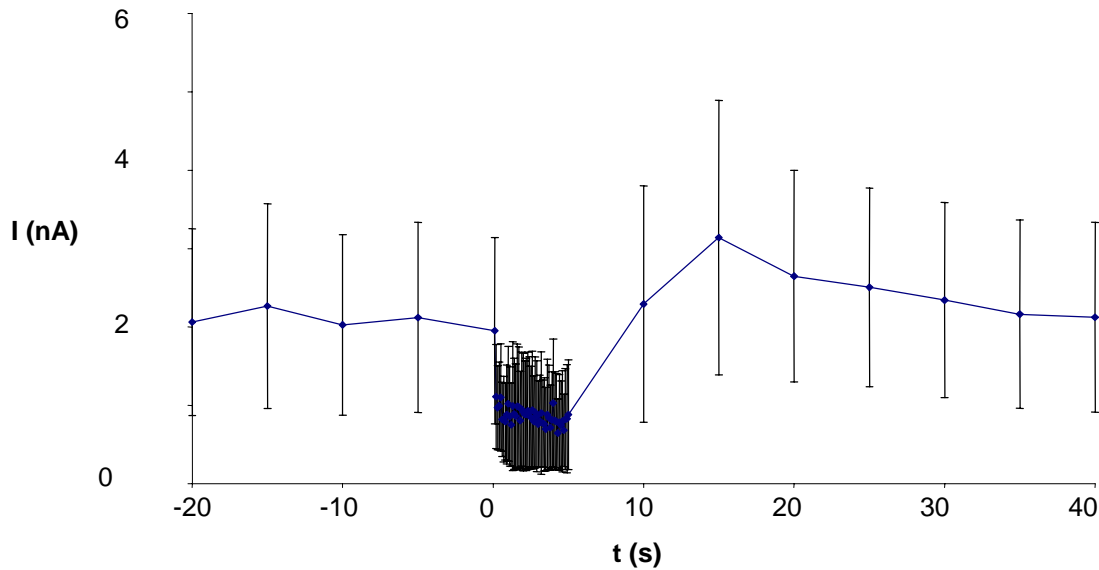
A exzitatorische Munc-13-defiziente Neuronen



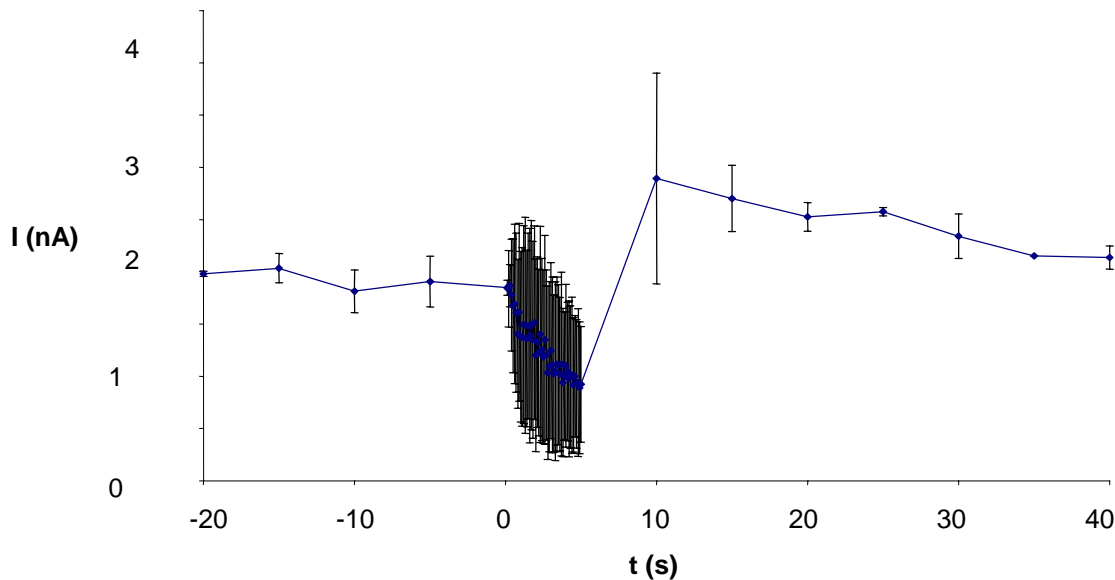
B exzitatorische Neuronen (Wildtyp)

Abbildung 3.23

Kurzzeitplastizität von Munc13-1 defizienten exzitatorischen Neuronen. Gezeigt werden die gemittelten Amplituden von Munc13-1 defizienten (**A**) im Vergleich mit wildtypischen (**B**) Neuronen bei einer Stimulation mit 50 Aktionspotentialen bei 10 Hz. Davor und danach wurde mit 0,5 Hz stimuliert. Während der 10-Hz-Stimulation verdoppelte sich ungefähr die durchschnittliche Amplitude der synaptischen Antwort vorübergehend (208 % +/- 44 %, n = 19), danach augmentierte sie sogar auf fast das fünffache 427 % +/- 79 %, während die synaptische Transmission in der Kontrollgruppe (**B**) unter den gleichen Bedingungen im Durchschnitt auf 63 % +/- 8 %, n = 9 beziehungsweise 94 % +/- 8 % deprimiert war.



A inhibitorische Munc-13-defiziente Neuronen

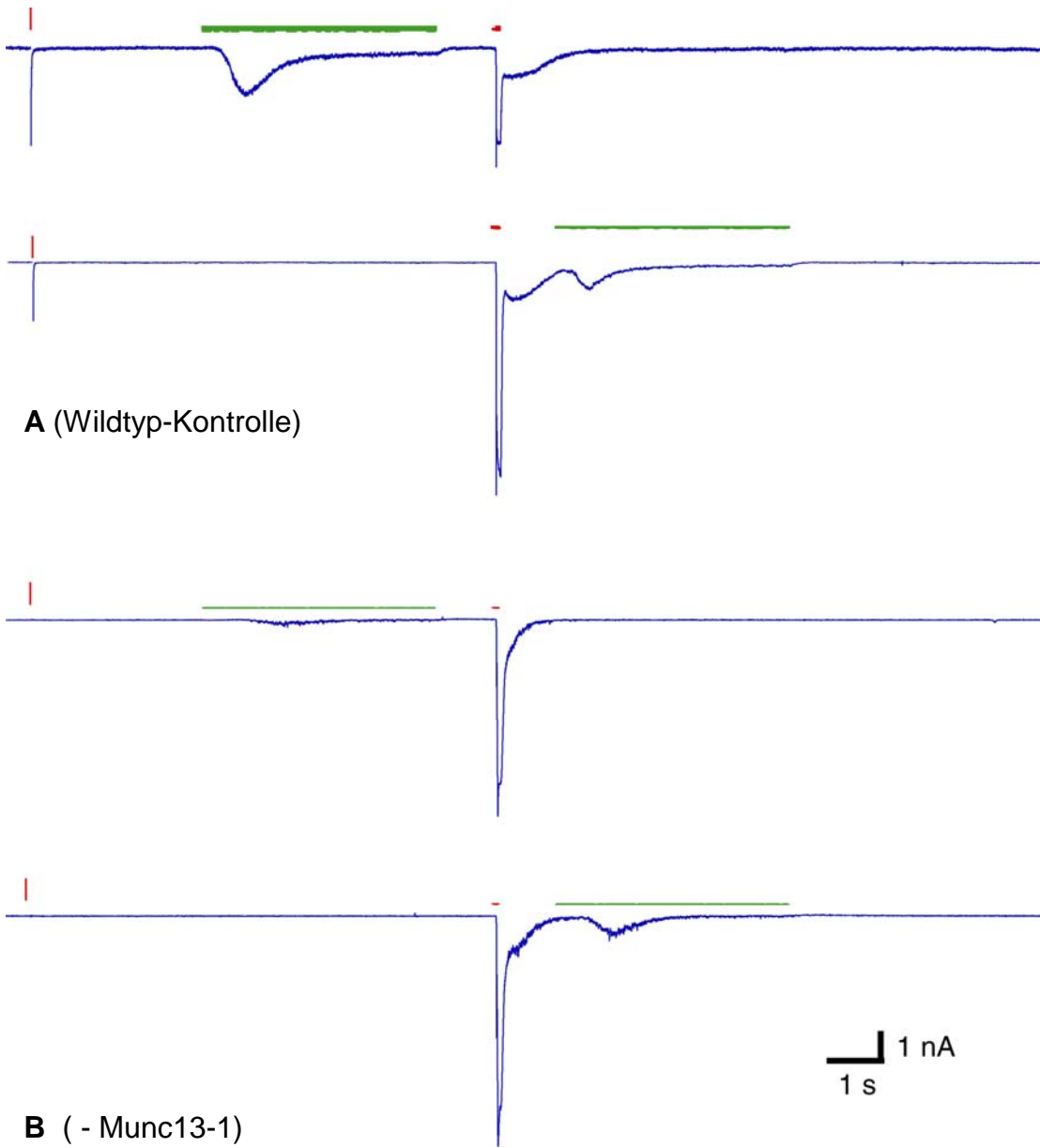


B inhibitorische Neuronen (Wildtyp)

Abbildung 3.24

Kurzzeitplastizität von Munc13-1 defizienten inhibitorischen Neuronen aus dem Hippocampus. Analog zu den Experimenten an exzitatorischen Neuronen auf vorausgehender Abbildung werden die gemittelten Amplituden von Munc13-1 defizienten (**A**) im Vergleich mit wildtypischen (**B**) Neuronen bei einer Stimulation mit 50 Aktionspotentialen bei 10 Hz gezeigt. Davor und danach wurde mit 0,5 Hz stimuliert. Mit der 10-Hz-Stimulation wurde die durchschnittliche Amplitude der synaptischen Antwort vorübergehend auf 45 % +/- 18 %, n = 5 deprimiert, danach augmentierte sie geringfügig auf 132 % +/- 8 %. Bei der Kontrollgruppe (**B**) war bei den beiden untersuchten Zellen die synaptische Transmission unter den gleichen Bedingungen – während der 10-Hz-Stimulation – im Durchschnitt auf 45 % deprimiert. Anschließend wurde für diese ebenfalls eine schwache Augmentation auf ungefähr 134 % gemessen.

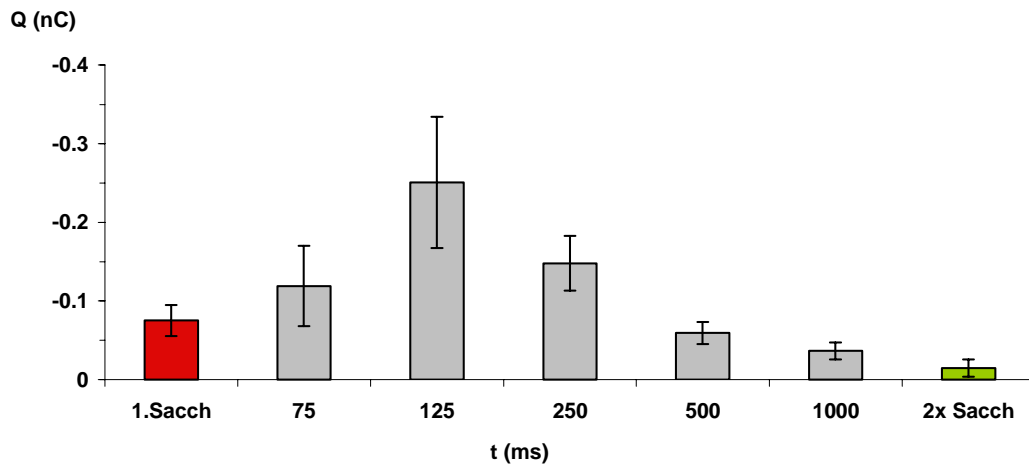
In exzitatorischen Munc13-1 defizienten Neuronen augmentierte mit einer starken Stimulation nicht nur die synaptische Amplitude auf fast das fünffache (Abbildung 3.23), auch die Anzahl der freisetzungskompetenten Vesikel – also die Größe des auch *readily releasable pool* (RRP) genannten Vesikelvorrates (vgl. Abbildung 3.10) – wurde durch einen starken Stimulus etwa auf das Zweieinhalbfache erhöht, was durch subsequente Depolarisation und Applikation von 500 mM Saccharose experimentell ermittelt wurde (Abbildung 3.25 und 3.26). Mit einer ähnlichen Methode wurde die Augmentation des Vesikelvorrates ebenfalls auf ungefähr 250 % bestimmt (Rosenmund, Sigler *et al.* 2002). Daraus läßt sich schließen, daß die beobachtete Augmentation der synaptischen Transmission sowohl durch eine transiente Vergrößerung des Vorrats an freisetzungskompetenten Vesikeln als auch mit einer Zunahme der Freisetzungswahrscheinlichkeit verursacht wurde.



← Abbildung 3.25

Augmentation des Vorrates an freisetzungskompetenten Vesikeln in Munc13-1 defizienten Neuronen nach einem starken Stimulus. Gezeigt werden Stromspuren von einem typischen exzitatorischen wildtypischen Neuron (**A**) und einem exzitatorischen Munc13-1 defizienten Neuron (**B**). Die grünen Balken symbolisieren die vier Sekunden lange Applikation von 500 mM Saccharose, die roten waagerechten Balken die von 140 mM K^+ für 125 ms. Die roten senkrechten Balken indizieren den Zeitpunkt einer zwei Millisekunden langen Depolarisation, um ein Aktionspotential auszulösen (als interne Positivkontrolle für die Vitalität der untersuchten Zelle). Zunächst wurde vor der K^+ -Applikation Saccharose appliziert (Beispiel: obere Stromspur), 60 Sekunden danach in umgekehrter Applikationsreihenfolge. Weitere 60 Sekunden später wieder in erster Abfolge. Die jeweils obere Stromspur ist ein Mittelwert der Ergebnisse beider Experimente. Nach dem starken Stimulus der K^+ -Applikation war in Munc13-1 defizienten Neuronen die Stärke der Saccharose-Antwort – und damit Anzahl der freisetzungskompetenten Vesikel – nicht wie im Wildtyp kleiner, sondern größer als ohne. Eine Qualifizierung der Ergebnisse unter Variation der Länge der K^+ -Applikation zeigt die folgende Abbildung, 2.21. Artefakte, die während der 2 ms langen Depolarisation zur Auslösung eines einzelnen Aktionspotentials aufgenommen wurden, sind in der Abbildung nicht wiedergegeben.

A (- Munc13-1, exzitatorisch)



B (Wildtyp-Kontrolle, exzitatorisch)

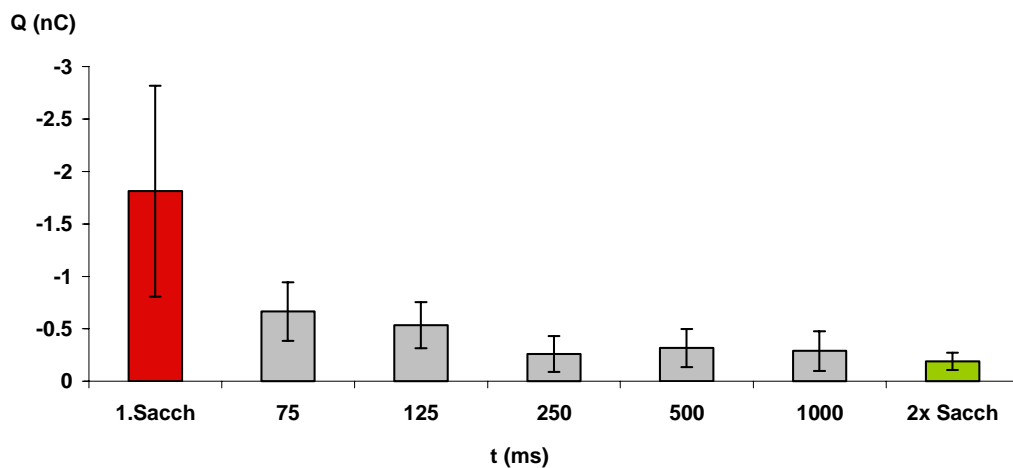
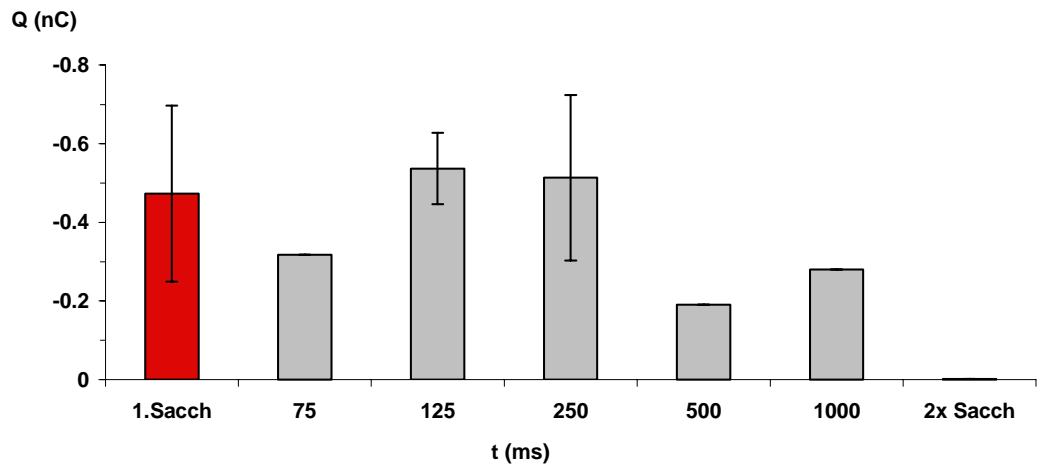


Abbildung 3.26

Quantitativer Vergleich der Augmentation der Plastizität des Vorrates an freisetzungskompetenten Vesikeln (*readily releasable pool*) in exzitatorischen Munc13-1-defizienten Neuronen (**A**) mit dessen Depression in der Wildtyp-Kontrolle (**B**). Verglichen werden Ladungen von Saccharose-Antworten von jeweils $n = 4$ Neuronen. Die jeweils linke Säule ist ein Maß für die Antworten auf 500 mM Saccharose ohne direkt vorausgehende Applikation, links daneben die Ladung, die jeweils gemessen wurde, wenn eine Sekunde zuvor 150 mM K^+ für die angegebene Zeit appliziert worden war (vgl. vorausgehende Abbildung). Die rechte Säule (grün) gibt die Ladung wieder, wenn eine Sekunde zuvor 500 mM Saccharose appliziert worden war.

In Munc13-1-defizienten Neuronen wurde eine Sekunde nach einer 125 ms langen K^+ -Applikation mit $-0,25 \text{ nC} \pm 0,08 \text{ nC}$ eine zweieinhalb mal größere Antwort gefunden als ohne vorausgehende K^+ -Applikation; letztere wurde auf $-0,10 \text{ nC} \pm 0,03 \text{ nC}$ bestimmt. In den wildtypischen Zellen war die Saccharose-Antwort dagegen nach 125 ms K^+ -Applikation mit $-0,53 \text{ nC} \pm 0,21 \text{ nC}$ dreieinhalb mal kleiner als ohne direkt vorausgehende Applikation mit $-1,81 \text{ nC} \pm 1,0 \text{ nC}$.

A (- Munc13-1, inhibitorisch)



B (Wildtyp-Kontrolle, inhibitorisch)

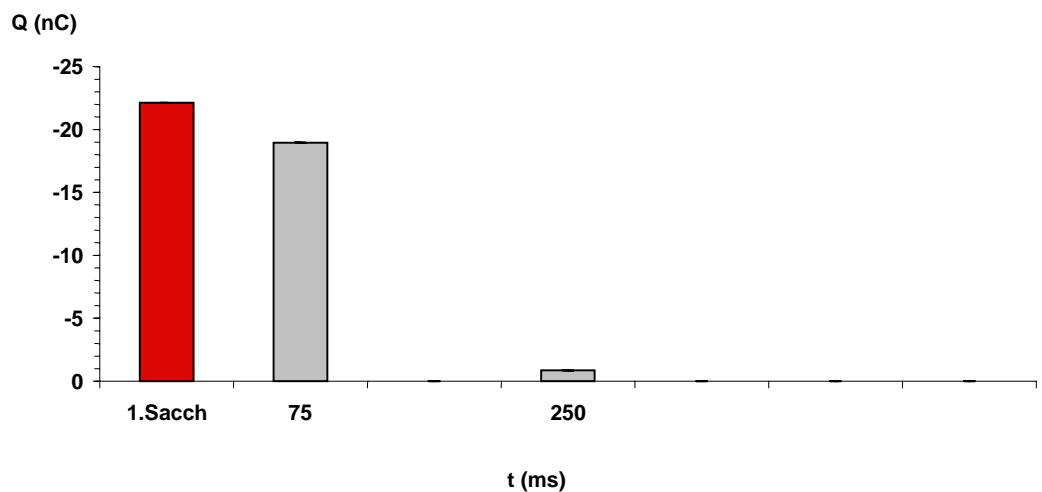


Abbildung 3.27

Augmentation und Depression des Vorrates an freisetzungskompetenten Vesikeln (*readily releasable pool*) in hippocampalen inhibitorischen Munc13-1 defizienten Neuronen (A) und an einem entsprechenden Neuron als Wildtyp-Kontrolle (B). Verglichen werden wie in vorausgehender Abbildung die Ladungen von Saccharose-Antworten. Wegen der geringen Zahl von verwendeten Datensätzen sind die hier gezeigten Ergebnisse nur sehr eingeschränkt interpretierbar ($n = 2; 1$). Gleichwohl sollten sie als Indiz gewertet werden, daß in inhibitorischen Zellen auch in Abwesenheit von Munc13-1 die Entleerung des Vesikel-Vorrates unter Bedingungen starker Stimulation durch Augmentation rasch kompensiert wird.

Übersicht: Phänotyp der Munc13-1-Defizienz und der Munc13-1/2-Doppeldefizienz in exzitatorischen Synapsen

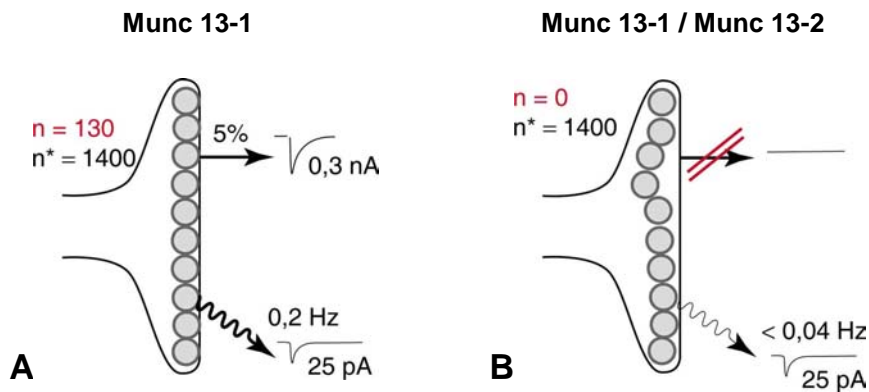


Abbildung 3.28

Schematische Darstellung der erhobenen synaptischen Parameter für Munc13-1-defiziente (**A**) und Munc13-1/2-doppeldefiziente Synapsen (**B**). Deletionsmutierte Neuronen, denen Munc13-1 fehlte, hatten weniger als zehn Prozent aktive Synapsen. Fehlte in der Doppel-Deletionsmutante zudem auch die Isoform Munc13-2, waren keine präsynaptisch aktiven Synapsen mehr zu finden, wenn man von sehr sporadisch auftretenden spontanen Freisetzungseignissen absieht. Ein Teil der hier gezeigten Parameter basiert auf Extrapolationen aus zusammen mit den Daten in der Abbildung publizierten Befunden (Augustin, Rosenmund *et al.* 1999; Rosenmund, Sigler *et al.* 2002).

Untersuchung des Einflusses des Proteins Bassoon auf die synaptische Transmission

Das zweite Beispiel für deletionsmutierte Zellen zur Untersuchung mit kombiniert elektrophysiologisch und bildgebenden Verfahren sind exzitatorische Neuronen, denen das Protein *Bassoon* fehlt. Das mit 460 kD ungewöhnlich schwere Protein wird in Synapsen stark angereichert gefunden. Es ist an der Bildung der Zytomatrix beteiligt, in der auch die anderen synaptischen Proteine lokalisiert sind, die an den Mechanismen der Neurotransmitter-Freisetzung beteiligt sind (Brandstätter, Fletcher *et al.* 1999). In einer Kooperation mit Alexander Meyer wurde vor diesem Hintergrund die Funktion von Synapsen in exzitatorischen Neuronen, denen das Bassoon durch Deletions-Mutation fehlte, funktional und morphologisch untersucht (Altrock, tom Dieck *et al.* 2003). Bassoon-defiziente Neuronen antworten mit einer ungefähr halbierten synaptischen Transmission und hatten auch einen um die Hälfte reduzierten Vorrat an freisetzungskompetenten Vesikeln. Diese Befunde sind in Abbildung 3.29 wiedergegeben.

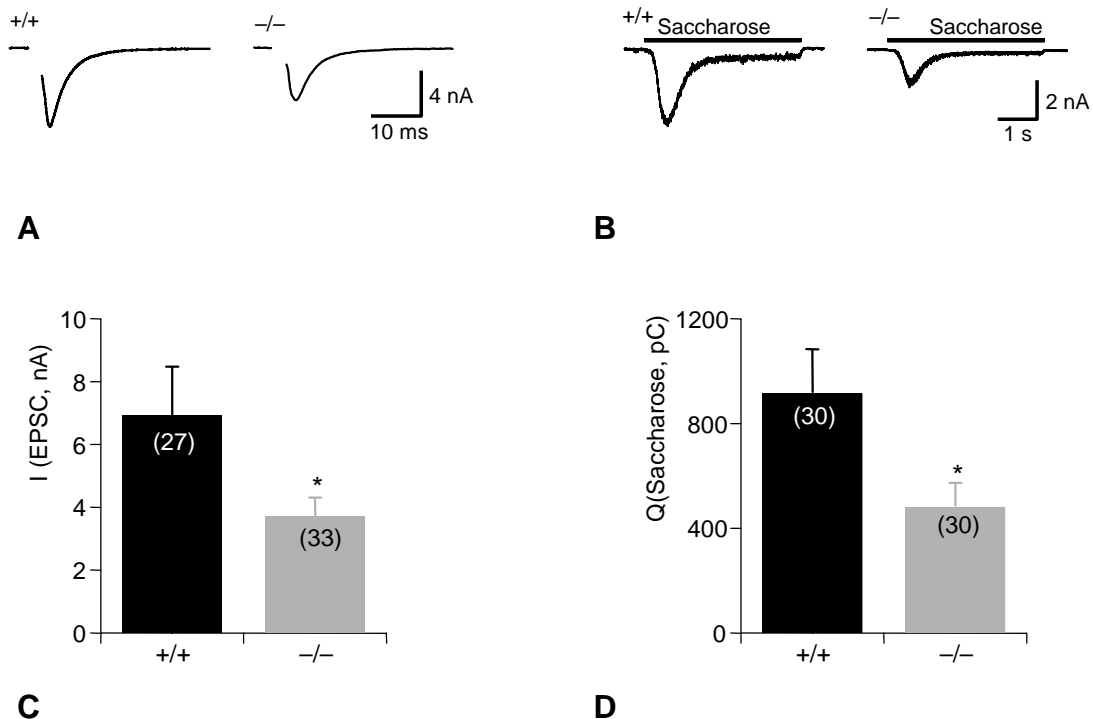


Abbildung 3.29

Vergleich der synaptischen Transmission an Bassoon-defizienten (-/-) und wildtypischen exzitatorischen Neuronen. Verglichen wurde jeweils die maximale Amplitude der Antwort auf ein Aktionspotential abgeleiteten Stroms (**A**, **C**) und die Ladung der Transienten während Applikation von 500 mOsm Saccharose (**B**, **D**). Von den Bassoon-defizienten Neuronen wurde mit 3,71 nA \pm 0,60 nA (n = 33) die Stromamplitude der evozierten Antwort gegenüber der von wildtypischen Zellen mit 6,91 nA \pm 1,56 nA (n = 27) ungefähr halbiert. Auch die Ladung des RRP war mit 28,4 pC \pm 6,3 pC (n = 31), verglichen mit dem Wildtyp mit 59,4 pC \pm 14,8 pC (n = 30), um die Hälfte reduziert. Die Befunde wurden von Alexander Meyer erhoben und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Um zu überprüfen, ob und wie weit die vorgefundene Reduktion der synaptischen Aktivität mit einer reduzierten Anzahl an gebildeten Synapsen oder mit einem reduzierten Anteil aktiver Synapsen im Zusammenhang steht, wurden an Bassoon-defizienten Neuronen exozytotisch aktive Synapsen mit FM1-43 ge- und entfärbt. Anschließend wurden – wie in den oben vorgestellten Studien – die Zellen gegen synaptisch exprimierte Proteine immunocytochemisch gefärbt. Sowohl die Durchführung der Experimente als auch die Analyse der erhaltenen Daten erfolgte als Blindstudie; die daran beteiligten Experimentatoren waren währenddessen in Unkenntnis des Genotyps der jeweiligen Proben.

Bassoon-defiziente Neuronen waren gemessen an der Größe der Dendritenfläche nicht kleiner als wildtypische (Abbildung 3.30 Aa, Ad, B). Auch die Dichte der Synapsen, die nach immunocytochemischer Färbung gegen Synaptophysin visuell identifiziert wurden, unterschied sich für beide Gruppen nicht signifikant (Abbildung 3.30 Ab, Ae, C). Das gleiche gilt auch für Färbungen gegen die synaptischen Indikatoren Piccolo und/oder ProSaP (Daten nicht gezeigt). Die Dichte der durch FM1-43-Entfärbung identifizierten exozytotisch aktiven Synapsen war indes an den mutierten Neuronen geringer (Abbildung 3.30 Ac, Af, D).

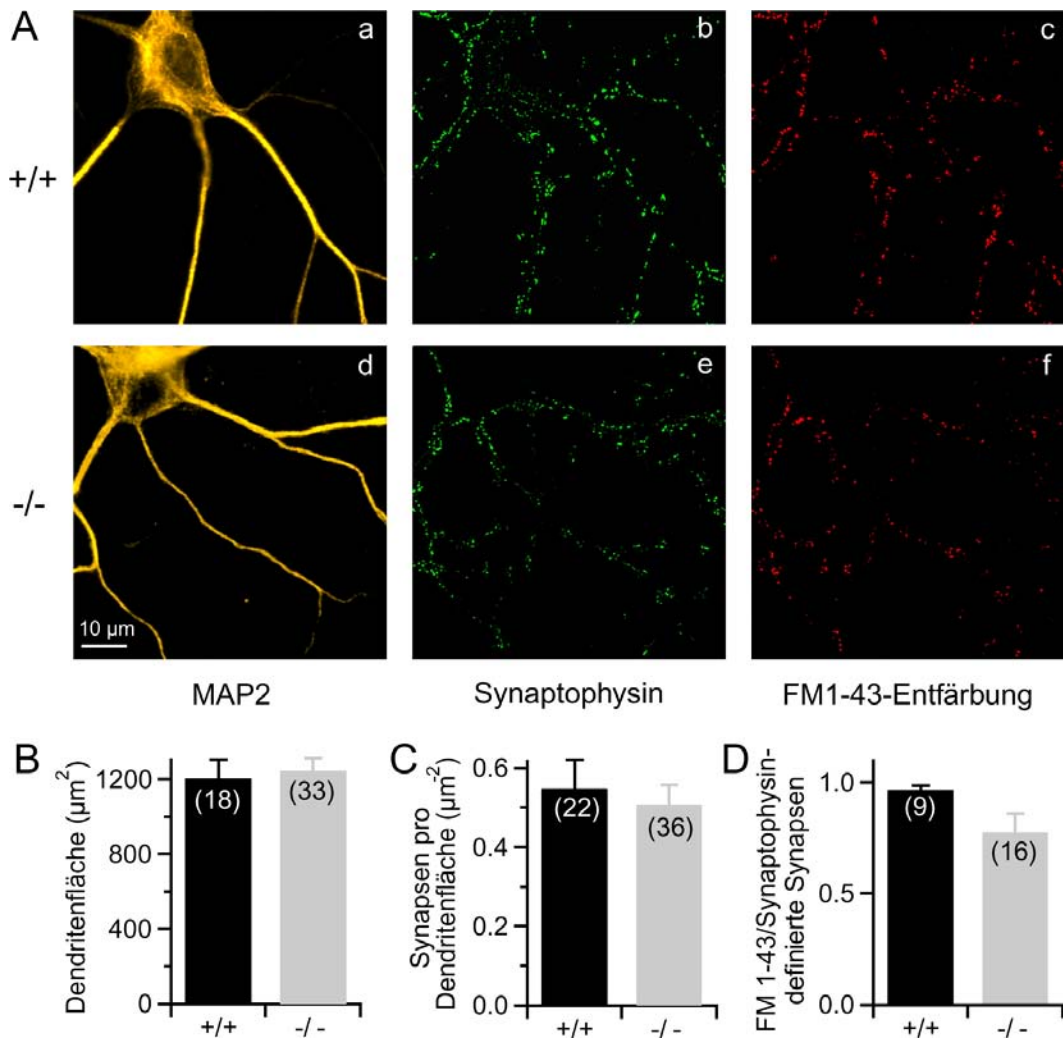


Abbildung 3.30

Morphologischer Vergleich von exzitatorischen Bassoon-defizienten Neuronen (-/-) mit dem Wildtyp (+/+). Die Neuronen wurden erst mit FM1-43 gefärbt/entfärbt. Gezeigt ist der spezifische Anteil der Entfärbung nach Depolarisierung der Zellen mit 125 mM K^+ für eine Sekunde (c, f). Anschließend wurden die Zellen immunozytochemisch gegen MAP2 (a, d) und Synaptophysin (b, e) gefärbt (A). Die immunozytochemisch gefärbte Fläche war für beiden Gruppen ungefähr gleich (B, C). Der Anteil aktiver Synapsen – berechnet als der Quotient der Zahl FM1-43 entfärbter und Synaptophysin gefärbter Synapsen war in Bassoon-defizienten Neuronen mit 77 % \pm 9 % (n = 16) ein Drittel niedriger als in der zugehörigen Kontrollgruppe mit 95 % \pm 2 % (n = 9) (D). Die Experimente hat zum größeren Anteil Alexander Meyer durchgeführt. Die quantitative Auswertung der Daten erfolgte durch den Autor.

Um die Zahl der aktiven Synapsen in den Bassoon-defizienten Neuronen zu bestimmen, wurden deren Synapsen – wie im Abschnitt „Methoden“ beschrieben – mit Hilfe der aufgenommenen Bilder von FM1-43-Entfärbungen nach Filterung, Konvertierung auf 8-Bit-Graustufen und visueller Erkennung auf dem Computer-Ausdruck gezählt. Für alle zu analysierenden Bilder wurden die Grenzwerte, anhand derer bei der Konvertierung die Grauwerte der Bilder skaliert wurden, nach jeweils gleichen Kriterien gesetzt (vgl. dazu die Ausführungen im Abschnitt „Methoden“). Dennoch sind die Zahlenwerte relativ aufzufassen. Da Randbedingungen, unter denen die Datenauswertung erfolgte, von Studie zu Studie – freilich nicht innerhalb einer Studie – durchaus variierten, können auch die für die jeweilige Wildtyp-Kontrolle erhaltenen Zahlenwerte unterschiedlich sein, ohne daß dies in Unterschieden der untersuchten synaptischen Charakteristika begründet sein muß. Beispielsweise wurde bei der Charakterisierung des Phänotypes der Munc13-1-Defizienz der Anteil aktiver Synapsen für den Wildtyp auf 66 Prozent bestimmt (Abbildung 3.19), während der eigentlich gleiche Parameter am äquivalenten Objekt beim Vergleich mit Bassoon-defizienter Neuronen auf 95 Prozent bestimmt werden konnte (Abbildung 3.30D).

Wurden die Graustufen der Bilder von den FM1-43-Färbungen Bassoon-defizienter Neuronen in niedrigeren Grenzwerten skaliert wurden als hier vorgenommen, war kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß die exozytotische Aktivität aller Synapsen an Bassoon-defizienten Neuronen insgesamt niedriger war als an den wildtypischen. Das Aktivitätsprofil wäre dann im Histogramm über alle Synapsen in den Bereich der schwachen Signale verschoben, die vom Rauschen nicht mehr zu unterscheiden sind, was dann bei der verwendeten Versuchsanordnung eine Verringerung des Anteils der Synapsen zur Folge haben sollte. Allerdings wurde für die als aktiv identifizierten Synapsen in keiner Gruppe eine signifikant abweichende durchschnittliche Aktivität gemessen (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise korreliert der Umfang der Neurotransmitterfreisetzung der Synapsen mit der jeweilig für sie gemessenen Änderung der Fluoreszenzintensität nicht linear. Weiterführende Studien könnten – bei entsprechend hohem Aufwand für die Bildanalyse – die Frage beantworten, ob der bereits gefundene Phänotyp der Bassoon-Defizienz als eine darin begründet ist, daß die deletionsmutierten Synapsen ein anderes Aktivitätsprofil im Histogramm ergeben als die wildtypischen. Dann wird die notwendigerweise willkürlich gewählte Entscheidung zwischen „aktiven“ und „inaktiven“ Synapsen genauer zu differenzieren sein in eine Größenverteilung zwischen mehr oder weniger aktiven Synapsen. Diese Erweiterung der Bildanalyse wird Gegenstand weiterführender Arbeiten sein.

Übersicht: Phänotyp der Bassoon-Defizienz in exzitatorischen Synapsen

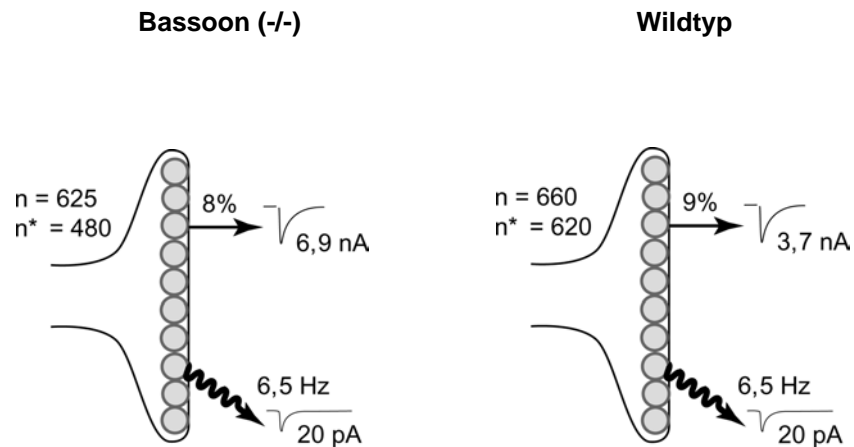


Abbildung 3.31

An Bassoon-defizienten Neuronen wurde eine dem Wildtyp ähnliche Zahl von Synapsen an Neuronen gefunden. Auch die vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit sowie die Frequenz und Amplitude der spontanen Freisetzungseignisse unterschieden sich nicht signifikant von denen für den Wildtyp. In Bassoon-defizienten Neuronen war indes die synaptische Amplitude um 36 % reduziert, und auch der Quotient aus identifizierten aktiven Synapsen und immunozytochemisch definierten Synapsen war in den deletionsmutierten Zellen um 28 % niedriger. Die elektrophysiologischen Daten wurden in diesem Kooperationsprojekt freundlicherweise von Alexander Meyer zur Verfügung gestellt.

Neurotransmitter-Vesikel ohne Neurotransmitter: die Rolle von VGLUT1

Als drittes Beispiel für eine Untersuchung deletionsmutierter Neuronen mit der Kombination von elektrophysiologischen und bildgebenden Verfahren sollen in der vorliegenden Arbeit Experimente an Neuronen vorgestellt werden, denen das Protein VGLUT1 fehlt. An glutamatergen Synapsen wird der Neurotransmitter Glutamat durch vesikuläre Glutamat-Transporter (VGLUTs) in die synaptischen Vesikel transportiert (Takamori, Rhee *et al.* 2000; Fremeau, Kam *et al.* 2004). Bislang sind davon drei bekannt. Im erwachsenen Gehirn werden hauptsächlich die Isoformen VGLUT1 und VGLUT2 exprimiert, wobei in den ersten Wochen der postneonatalen Entwicklung VGLUT2 vorherrscht. Neugeborene Mäuse, denen VGLUT1 durch Deletionsmutation fehlt, sind nur ungefähr drei Wochen lebensfähig. In exzitatorischen Neuronen solcher Mäuse ist die synaptische Transmission drastisch reduziert.

Um dem Protein VGLUT1 seine Funktion zuzuordnen, wurden exzitatorische Neuronen von VGLUT1-defizienten Mäusen mit kombinierter elektrophysiologischer und bildgebender Methodik untersucht (Wojcik, Rhee *et al.* 2004). Diese Untersuchung erfolgte in Zusammenarbeit mit Sonja Wojcik und Jeong Seop Rhee. Letzterer führte die meisten rein elektrophysiologischen Messungen durch. Beide nahmen parallel zu den *Patch-Clamp*-Messungen Bilder von FM1-43-Färbungen auf, die der Autor der vorliegenden Arbeit zusammen mit den eigenen analysierte. Bei ungefähr zwölf Prozent der untersuchten VGLUT1-defizienten Neuronen war keine synaptische Transmission nachweisbar. Die durchschnittliche synaptische Amplitude betrug $0,9 \text{ nA} \pm 0,1 \text{ nA}$ ($n = 93$), während die Amplitude für die wildtypische Kontrolle in keinem Fall kleiner als $0,9 \text{ nA}$, im Durchschnitt $5,6 \text{ nA} \pm 0,3 \text{ nA}$ war (Abbildung 3.23 D). Bei einem Teil der Zellen wurden gleichzeitig exozytotisch aktive Synapsen mit FM1-43 gefärbt/entfärbt und diese anschließend immunozytochemisch gegen Synaptophysin gefärbt (Abbildung 3.23 A-C).

Zur Analyse wurden VGLUT1-defiziente Neuronen in drei Gruppen aufgeteilt: In die erste Gruppe fielen Zellen, an denen kein synaptischer Strom nachweisbar war (Abbildung 3.23 C). In die zweite Gruppe fielen Zellen, für die eine synaptische Amplitude kleiner als 1 nA gemessen wurde (Abbildung 3.23 B), und in die dritte Gruppe fielen solche, deren synaptische Amplitude größer als 1 nA nachgewiesen war (Abbildung 3.23 A). Die immunozytochemisch identifizierten Synapsen aller drei Gruppen und der Wildtyp-Kontrolle zeigten gleichermaßen spezifische FM1-43-Färbung und -Entfärbung bei Stimulation durch Aktionspotentiale (Abbildung 3. 23 E). Zwischen den Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der gefundenen Synapsen, der Synapsendichte, dem Anteil aktiver Synapsen oder der durchschnittlichen exozytotischen Aktivität der Synapsen gefunden (Daten nicht gezeigt).

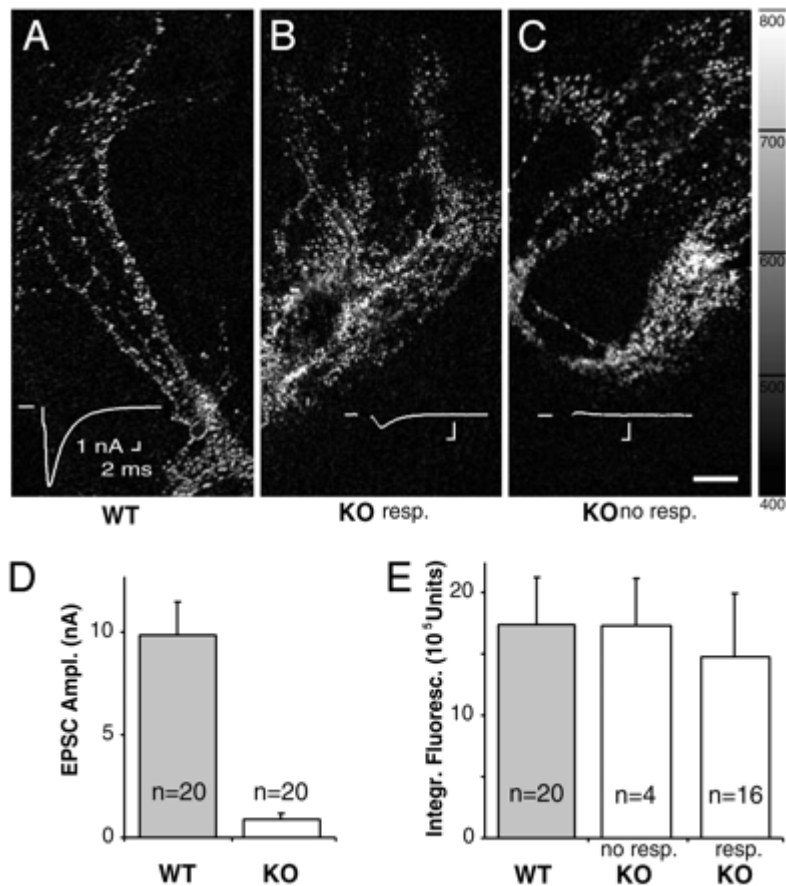


Abbildung 3.32

Ohne VGLUT1 setzen glutamaterge Synapsen den Inhalt ihrer Vesikel bei drastisch reduzierter Neurotransmitter-Ausschüttung frei. Verglichen wurden die Ergebnisse aus elektrophysiologischer und aus bildgebender Untersuchung an wildtypischen Neuronen (WT) und an VGLUT1-defizienten Neuronen (KO) (A-C). Erstere antworteten mit einer synaptischen Amplitude von 9,8 nA \pm 1,6 nA, n = 20, während letztere im Durchschnitt nur eine Amplitude von 0,89 nA \pm 0,3 nA, n = 20 hatten (D). Vier Zellen davon antworteten nicht oder mit einer Amplitude unter der Nachweisgrenze. Dennoch unterschieden sich die Zellen aus den drei Gruppen hinsichtlich ihrer Aufnahme und Abgabe von FM1-43 nicht signifikant (E), was als eine funktionierende Freisetzung des Inhalts der Vesikel interpretiert wird. Teilabbildung A zeigt jeweils typische Meßergebnisse. Der Länge des weißen Größenbalkens entspricht 20 μ m im Präparat. Die Primärdaten wurden in Kooperation des Autors mit Jeong-Seop Rhee und Sonja Wojcik erhoben. Die Datenauswertung lag beim Autor.

Desweiteren fanden Sonja Wojcik und Jeong Seop Rhee und in einer separaten Versuchsreihe durch immunozytochemische Färbungen heraus, daß Zellen, die der dritten Gruppe zuzuordnen sind – also VGLUT1-defiziente Neuronen mit synaptischer Transmission – ausnahmslos in ihren Synapsen VGLUT2 exprimierten. Offensichtlich wird in VGLUT1-defizienten Synapsen der Inhalt der Vesikel normal freigesetzt. In Ermangelung des spezifischen Transporters bringen die Synapsen in viele Vesikel keinen oder nur sehr wenig Neurotransmitter, was erklärt, warum an einer Gruppe von VGLUT1-defizienten Neuronen auch FM1-43-Färbung und -Entfärbung nachgewiesen werden konnte. Neuronen der dritten Gruppe, in die auch in Abwesenheit von VGLUT1 synaptische Ströme abgeleitet worden waren, verfügten offensichtlich über VGLUT2, um den Neurotransmitter Glutamat in die Vesikel zu bringen (Wojcik, Rhee *et al.* 2004).

Übersicht: Phänotyp der VGLUT1-Defizienz

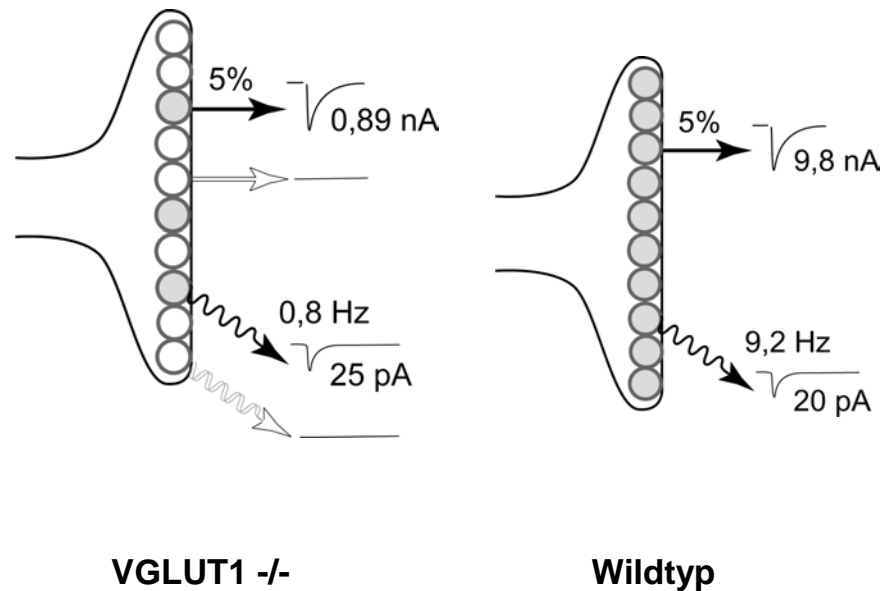


Abbildung 3.33

Schematische Darstellung der erhobenen synaptischen Parameter für VGLUT1-defiziente Synapsen. Bei Abwesenheit von VGLUT1 wurde an exzitatorischen Neuronen eine um ungefähr 90 %, also eine drastisch reduzierte Amplitude der synaptischen Transmission gemessen. Auch die Frequenz der spontanen Freisetzungseignisse war in diesen Neuronen deutlich, um den Faktor 11,5 reduziert. Die vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit wich mit fünf Prozent indes nicht signifikant vom Wildtyp ab (Wojcik, Rhee *et al.* 2004). Durch die Kombination dieser Befunde mit den hier vorgestellten morphologischen Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß VGLUT1-defiziente Synapsen den Inhalt von Vesikeln freisetzen, die – in Ermangelung des für das Beladen zuständigen Transporters – keinen nachweisbaren oder nur sehr wenig Neurotransmitter enthielten.

Diskussion

I. Anmerkungen zur Kombination von elektrophysiologischen mit bildgebenden Verfahren

Für die vorliegende Arbeit wurde untersucht, wie „zentrale“ Neuronen – das sind die Neuronen aus dem von der Blut-Hirnschranke eingegrenzten Zentralnervensystem – in ihren Synapsen Neurotransmitter freisetzen. Dazu wurden anhand von ausgewählten Beispielen jeweils die Eigenschaften der Synapsen in Parametern charakterisiert und diese miteinander verglichen. Die Kombination von elektrophysiologischen und bildgebenden Verfahren ermöglichte es, die durchschnittliche Funktionalität der einzelnen Synapse experimentell zu erfassen und auch Aussagen über deren funktionale Heterogenität zu treffen. Beispiele für diese Parameter sind die durchschnittliche Größe des Vorrats an freisetzungskompetenten Vesikeln (*Readily Releasable Pool, RRP*) und die Zahl der Vesikelinhalte, die eine Synapse bei einem Aktionspotential freisetzt („synaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit“). Ein Wert, der – wenn auch nur in einem sehr einfachen Verfahren – Informationen über die Heterogenität liefert, ist der „Anteil aktiver Synapsen“. Dieser ist definiert als der zahlenmäßige Anteil in der Gesamtpopulation der Synapsen einer Zelle, die nach vorher festgelegten Kriterien als Vesikel freisetzend registriert wurden. Die erhobenen Befunde sollen unter besonderer Berücksichtigung methodischer Aspekte diskutiert werden.

Modellsystem zur Untersuchung der Eigenschaften zentraler Synapsen

Die Synapsen wurden ausschließlich an zentralen Neuronen aus autaptischer, primärer Kultur untersucht. Autaptische Neuronen bieten ein sehr einfaches Modellsystem für ein funktionales Neuron aus dem Gehirn, an dem sich somit sehr viele Parameter morphologisch oder elektrophysiologisch relativ leicht bestimmen lassen sollten. Sobald man dann auch noch die Synapsen des untersuchten Neurons gezählt hat – vorzugsweise mit bildgebenden Verfahren – sollten die für die Zelle erhobenen Meßergebnisse auch auf die Synapsenzahl der Zelle normiert werden können. Man erhält dann durchschnittliche Parameter für die einzelne Synapse. Zuvor muß jedoch geklärt sein, wie weit die dabei implizierten Annahmen auch praktisch gültig sind, denn davon hängt ab, inwieweit die so erhaltenen Befunde geeignet sind, die untersuchten Synapsen positiv zu charakterisieren. Das soll im Folgenden erörtert werden.

Prinzipielle Überlegungen zur Interpretation der erhaltenen Ergebnisse

Wer im Experiment zur Untersuchung eines Objekts zwei grundlegend verschiedene Meßgrößen kombiniert, gewinnt potentiell viele Möglichkeiten, aus den Ergebnissen Parameter experimentell zu bestimmen, die mit der einzelnen Messung nicht zugänglich sind. Der Vorteil, zwei unterschiedliche Techniken miteinander kombinieren zu können, wird indes teuer erkauft: soll ein Parameter aus so erhaltenen Meßergebnissen positiv bestimmt werden, hängt die Genauigkeit des Befundes ganz wesentlich davon ab, ob und wie weit für die Experimente mit beiden Techniken methodisch die gleichen Randbedingungen⁷ gelten. Je weiter sich die eine Technik von der anderen unterscheidet, desto schwieriger wird es realisierbar sein, die Randbedingungen zur Deckung zu bringen. Das Problem soll im Folgenden anhand des konkreten Beispiels der Kombination elektrophysiologischer und bildgebender Verfahren konkretisiert werden.

⁷ Ein Experiment, das Erkenntnis liefern soll, setzt methodisch die Annahme eines Modells aus Grundannahmen voraus. Der Umfang dieser auf Axiome zurückzuführenden *Bedingungen* wird beim Formulieren jeder Fragestellung für das Experiment bewußt oder unbewußt optimiert. Das hat zwingend zur Folge, daß der Bereich, für den die gegebenenfalls erhaltenen experimentellen Ergebnisse gültig sein werden, von vorneherein – bildlich gesprochen – durch *Ränder* begrenzt ist.

Besondere Annahmen und Einschränkungen für die morphologischen Befunde

In einem elektrophysiologischen Versuchsaufbau beträgt üblicherweise bei Messungen synaptischer Ströme aus der Spannungsklemme der Signal-zu-Rauschabstand sieben bis acht bit, was in der Praxis eine komfortable quantitative Auswertung der Meßergebnisse ermöglichen sollte. Wird jedoch mit derzeit handelsüblicher Technik durch Färbung mit FM1-43-Derivaten die endo- oder, insbesondere, die exozytotische Aktivität an Synapsen bestimmt, ist das aufgenommene Meßsignal in der Praxis nur selten mehr als eine Größenordnung größer als das des Hintergrunds. Hinzu kommt, daß die morphologischen Meßergebnisse von zwei Raumdimensionen aufgespannt sind; bei der Auswertung müssen generell erheblich mehr Informationen gefiltert werden als aus elektrophysiologischen Rohdaten.

Besondere Einschränkungen für die elektrophysiologischen Befunde

In den konkreten Versuchsansätzen der vorliegenden Arbeit wird davon ausgegangen, daß sowohl durch Färbung als auch elektrophysiologische Ableitung alle Synapsen des jeweils untersuchten Neurons erfaßt werden. Für Färbungen mit Fluoreszenz-Farbstoffen läßt sich dies leicht kontrollieren und gegebenenfalls durch Extrapolation korrigieren; die Zahl der Synapsen an Teilen des Neurons, die sich schlecht zählen lassen, etwa weil sie sich außerhalb der Fokus-Ebene befinden, außerhalb des Rahmens des aufgenommenen Bildes oder von der Pipette verdeckt sind, wurden dann anhand der immunozytochemischen Färbung gegen ein dendritisch lokalisiertes Protein extrapoliert. Für die Verwendung der Patch-Clamp-Technik zur Ableitung von synaptischen Strömen ist es weitaus weniger offensichtlich, ob dadurch alle Synapsen des Neurons erfaßt werden. Dafür müssen alle Kabeleigenschaften – also Serienwiderstand, Kapazität und Membranpermeabilität – für die Dendriten vernachlässigbar sein, so daß mit der in der aufgesetzten Pipette befindlichen Elektrode die Spannung des gesamten Dendritenbaumes auf dem Wert des Ruhepotentials gehalten – „geklemmt“ – werden kann. Von Synapsen, die auf Seite der Dendriten nicht geklemmt sind, kann auch kein synaptischer Strom abgeleitet werden. Sie bleiben für die Meßvorrichtung „unsichtbar“.

Die passiven Kabeleigenschaften des Dendriten sind keineswegs per se marginal; bei der Signalverarbeitung der Neuronen im Gehirn spielen sie eine nicht unwesentliche Rolle (Rall 1977; Jaffe und Carnevale 1999). Es konnte dennoch experimentell gezeigt werden, daß die elektrischen Kabel, als die man Dendriten auffassen kann, in exzitatorischen Neuronen aus dem Hippocampus noch kurz genug sind (Johnston 1981), um deren Spannung mit somatischer Ableitung quantitativ zu klemmen. Theoretische Berech-

nungen zeigten indes, daß ein limitierender Faktor für Leitfähigkeitsmessungen an hippocampalen Neuronen die Länge des Dendriten ist (Johnston und Brown 1983). Da die Neuronen in autaptischer Kultur mindestens so stark räumlich begrenzt sind wie in der natürlichen Umgebung des perinatalen Hippocampus, sollte sich das Ergebnis der für letztere vorgenommenen Berechnungen auf erstere ohne Einschränkung übertragen lassen. Die durch die passiven Kabeleigenschaften des Dendriten gegebene Unsicherheit aller in der vorliegenden Arbeit bestimmten synaptischen Parametern sollte darum bei jeder darauf aufbauenden Arbeit und weiteren Schlußfolgerungen stets berücksichtigt bleiben. Inhibitorische Dendriten hatten allerdings augenscheinlich kleinere Durchmesser bei größerer Länge (Abbildung 3.01). Somit sollte Unsicherheit, daß an inhibitorischen Neuronen Spannungsklemme nicht den gesamten Dendritenbaum erfaßte, größer sein als dies für exzitatorische Neuronen zu vermuten ist. Das hätte dann zur Folge, daß sowohl die synaptische als auch die vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit in inhibitorischen Neuronen im Verhältnis zu den exzitatorischen größer ist als sie hier bestimmt wurde. In diesem Falle wären die gefundenen Unterschiede beider Werte zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen (Abbildung 3.11 und Abbildung 3.12) noch größer. Qualitativ würde dies indes die Befunde nicht ändern, zumal die erhaltenen Ergebnisse, auf denen sie fußen, ohnehin als Relationen zu interpretieren sind (siehe unten). Vor diesem Hintergrund wurde von einer vertiefenden Behandlung des Problems abgesehen, weil dies durchaus umfangreiche Kontrollexperimente durchzuführen erforderlich gemacht hätte. Vereinfachend wurde für die weitere Datenanalyse davon ausgegangen, daß die vorgenommenen Ableitungen synaptischer Ströme jeweils das gesamte Neuron erfaßten.

Wie „leise“ sind die stillen, also inaktiv klassifizierten Synapsen tatsächlich?

Untersuchungen mit dem irreversibel und für aktivierte NMDA-Rezeptoren spezifischen Inhibitor MK801 ergaben an exzitatorischen Neuronen, daß ein großer Anteil der aktiven Synapsen eine niedrige, aber von Null verschiedene Freisetzungswahrscheinlichkeit hat (Rosenmund, Clements *et al.* 1993). Dennoch wurde in der vorliegenden Arbeit vereinfachend davon ausgegangen, daß als „inaktiv“ erkannte Synapsen auch tatsächlich absolut inaktiv waren. Synapsen, deren Aktivität unterhalb der höheren FM1-43-Nachweisgrenze lag, dürften dann zur elektrophysiologisch quantifizierten synaptischen Transmission der gesamten Zelle nur in einem vernachlässigbaren Umfang beigetragen haben. Abhängig von dieser Annahme sind Parameter, mit denen die Freisetzungseigenschaften der als aktiv klassifizierten Synapsen charakterisiert worden waren, wie zum Beispiel die „synaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit“. Sollte die Annahme nicht

zutreffen, wären alle sich auf das ganze Neuron beziehenden Werte auf eine zu kleine Zahl von aktiven Synapsen normiert worden, was zur Folge hätte, daß die so erhaltenen synaptischen Parameter – nach grober Schätzung maximal im einstelligen Prozentbereich – zu groß bestimmt worden sind. Parallel dazu wurden die synaptischen Parameter auch obligatorisch für jeweils alle immunozytochemisch definierten Synapsen berechnet – mit Ergebnissen, die von diesem Fehler nicht betroffen sein können.

Das zugrundeliegende Modell, nach dem Synapsen eines Neurons diskret und eindeutig in „aktive“ und „inaktive“ Synapsen klassifiziert werden können, beinhaltet somit eine offensichtliche Vereinfachung mit unterschiedlich starken Auswirkungen auf die Ergebnisse – je nach Untersuchungsobjekt. Während für die Charakterisierung des Phänotyps der Munc13-1-Deletionsmutante vermutlich nur eine geringfügige Beeinträchtigung zu erwarten ist, muß eine solche für die Interpretation der für die Bassoon-deletionsmutierten Neuronen erhaltenen Ergebnisse diskutiert werden (siehe unten).

Resümee

Die Parameter, die für die vorliegende Arbeit mit kombiniert bildgebenden und elektrophysiologischen Methoden bestimmt wurden, sind verfahrensbedingt als absolute Werte mit einiger Ungenauigkeit behaftet und geben deshalb nur Näherungswerte. Als relative Werte – erhalten im direkten Vergleich zweier Zellgruppen – können sie dagegen wesentlich aussagekräftigere Ergebnisse erbringen; die gefundenen Unterschiede werden quantitativ wiedergeben. Als solche Vergleichsgrößen werden die Befunde weiter unten im Wesentlichen diskutiert. Zu berücksichtigen sind im Einzelfall mögliche Verschiebungen des Aktivitätsprofils der untersuchten Synapsen.

Demgegenüber bietet die Kombination von bildgebenden und elektrophysiologischen Verfahren unter Berücksichtigung der vorgenannten Einschränkungen einen experimentellen Zugang zu synaptischen Eigenschaften, die bislang wohl nicht anderweitig quantitativ zu erfassen waren. In der vorliegenden Arbeit wird das methodische Potential des Verfahrens zum einen mit der jeweiligen Ermittlung der Phänotypen von Deletionsmutanten für drei synaptischer Proteine belegt: Munc13-1/ Munc13-2, Bassoon und VGLUT1. Diesen Molekülen kann die Funktion zugeordnet werden, die sie in der synaptischen Transmission spielen. Zum anderen werden exzitatorische mit inhibitorischen Synapsen funktional verglichen, womit deren Eigenschaften aus einem neuen Blickwinkel – auf subzellulärer Ebene – funktional betrachtet werden können.

II. Anwendung der Kombinationstechnik zur Charakterisierung mutierter Neuronen

1. Munc13-1 und Munc13-2

In exzitatorischen Neuronen, denen der *priming*-Faktor Munc13-1 durch genetische Manipulation fehlte, wurde ein synaptische Strom abgeleitet, der etwa um eine Größenordnung kleiner war als bei wildtypischen Vergleichszellen. Jene zeigten indes eine fast fünffache Augmentation der Neurotransmitter-Freisetzung bei Hochfrequenz-Stimulation (Abbildung 3.23) und eine ungefähr zweieinhalbfache Vergrößerung des *Pools* freisetzungskompetenter Vesikel (Abbildung 3.26), was als eine einzigartige Form der Plastizität beschrieben wird (Rosenmund, Sigler *et al.* 2002). Durch die Hinzunahme eines bildgebenden Verfahrens, bei dem aktive Synapsen anhand der Färbung mit dem Farbstoff FM1-43 zu identifizieren waren, konnte gezeigt werden, daß diese Eigenschaft einer Subpopulation von Synapsen zuzuordnen ist, deren Aktivität von Munc13-1 unabhängig ist (Abbildung 3.19). Fehlt in den Synapsen neben Munc13-1 auch dessen Isoform Munc13-2, ist an den Neuronen keine synaptische Antwort auf Stimulation mehr nachweisbar, obwohl die Neuronen über eine normale Anzahl von Synapsen verfügen (Abbildung 3.21). Daraus kann geschlossen werden, daß in Munc13-1-defizienten exzitatorischen Neuronen aus dem Hippocampus die verbliebene synaptische Freisetzung von Neurotransmittern durch Munc13-2 erfolgt. Mit der Kombination der beiden Techniken wurde gezeigt, daß diese Neuronen zwar generell eine normale Zahl von Synapsen haben, aber die Zahl derjenigen Synapsen, die zur synaptischen Transmission wesentlich beitragen, stark vermindert ist. Durch den Vergleich des „Anteils aktiver Synapsen“ konnte der Phänotyp einem zugrunde liegenden Mechanismus zugewiesen werden.

2. Bassoon

Auch an Bassoon-defizienten Neuronen konnte im direkten Vergleich mit wildtypischen Zellen ein reduzierter Anteil aktiver Synapsen gefunden werden (Abbildung 3.30). Der Unterschied war signifikant und wurde nach Messung und Analyse in Unwissenheit über den Genotyp der untersuchten Proben gefunden. Dennoch ist die Interpretation des Befundes weitaus schwieriger als bei der Charakterisierung des ähnlichen Phänotypes der Munc13-1-Deletionsmutante. Mit Erhöhung oder Verminderung des Grenzwertes, mit denen die Graustufen der Bilder skaliert wurden, um die Synapsen zu zählen, verschwand auch der gezeigte Unterschied im Anteil aktiver Synapsen. Wie im Abschnitt „Ergebnisse“ diskutiert, kann nicht ausgeschlossen werden, daß dieser an den Bassoon-defizienten Neuronen erhobene Befund mit einer möglichen generellen Reduzierung oder mit einer veränderten Verteilung des Umfanges der synaptischen Transmission in Zusammenhang gebracht werden muß. Vereinfachend wurde ein potentiell komplexes Phänomen mit einem einzigen Zahlenwert parametrisiert – nämlich dem Anteil aktiver Synapsen, dem stillschweigend das Modell zugrunde liegt, daß Synapsen entweder „aktiv“ oder „still“ sind. Im Falle der Munc13-1-Defizienz bietet diese Vereinfachung mit hinreichender Sicherheit ein Modell, das die vorgefundenen Synapsen-Eigenschaften gut beschreibt. Im Fall von Bassoon kann ein aufgrund von Messungen an deletionsmutierten Zellen gewonnenes Modell nur beschränkt geeignet sein, den Phänotyp wirklich umfassend zu beschreiben.

Dieses Beispiel macht deutlich, daß insbesondere neuentdeckte Phänotypen deletionsmutierter Zellen mit bekanntem Genotypen selbst bei sorgfältiger Absicherung durch Kontrollexperimente Interpretationen nahelegen können, die zunächst klarer erscheinen, als sie sich später erweisen.

Generell ist die Beobachtung eines im Vorfeld vermuteten Phänotypes von Deletionsmutanten ein eher evidenzbasierter Ansatz. Andere Ansätze, mit denen mehr wissenschaftlich formulierte Modelle überprüft werden, sollten langfristig stabilere Hypothesen liefern. Da es aber bei der Erforschung der Mechanismen der synaptischen Transmission derzeit noch immer viel wissenschaftliches Neuland zu betreten gibt, wird man zunächst noch eine Zeitlang auf die Interpretation der Beobachtungen von im Vorfeld nur vermuteter Phänotypen angewiesen sein. Bei der Interpretation der erhobenen Befunde sollte man dementsprechend aber um so vorsichtiger sein. Die Untersuchung der Bassoon-deletionsmutierten Neuronen hat ergeben, daß an diesen der Anteil der als aktiv identifizierten Synapsen, verglichen mit dem Wildtyp, unter den experimentell gegebenen Bedingungen signifikant niedriger war. Dieses Ergebnis sollte ein geeigneter Ausgangspunkt für vertiefende Untersuchungen sein, deren Umfang allerdings den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen würde.

3. VGLUT1

Auch exzitatorische Neuronen, denen der vesikuläre Glutamat-Transporter VGLUT1 fehlte, antworteten mit einer im Vergleich zum Wildtyp einer ungefähr auf ein Sechstel verminderten synaptischen Amplitude. Anders als Munc13-1-defiziente ließen sich diese indes wie wildtypische Neuronen mit FM1-43 an- und entfärben; hinsichtlich ihres Anteils exozytotisch aktiver Synapsen unterschieden sie sich nicht signifikant von diesen. In Abwesenheit von VGLUT1 hatten demnach viele Synapsen Vesikel freigesetzt, die nur wenig Neurotransmitter enthielten. Mit der Kombination der beiden Techniken wurde somit gezeigt, das die Neuronen sehr wohl eine normale Zahl von Synapsen und in diesem Fall auch eine normale Zahl von aktiven Synapsen haben. Die Untersuchung VGLUT1-defizienten Neuronen ist ein Beispiel dafür, daß nach Kombination elektrophysiologischer und bildgebender Verfahren ein synaptisches Protein seiner Funktion offenbar im Wesentlichen zugeordnet werden kann.

III. Vergleichende Untersuchungen an exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen

Auch Synapsen, die zwar aus dem gleichen Organismus, aber von Neuronen unterschiedlichen Typs stammen – und zwar den inhibitorischen und den exzitatorischen – wurden miteinander verglichen. An den inhibitorischen Neuronen wurden sowohl mit immunozytochemischen als auch (FM1-43-)Vesikelfärbung weniger Synapsen gefunden als an den exzitatorischen (Abbildung 3.05). Bei einer etwa gleichen Anzahl von freigesetzten Vesikeln pro Zelle und Aktionspotential muß daher die Anzahl der freigesetzten Vesikel pro Synapse entsprechend höher sein (Abbildung 3.14 A). Während eine aktive, also mit FM1-43 gefärbte und entfärbbare exzitatorische Synapse nur ungefähr bei jedem dritten Aktionspotential den Inhalt eines Vesikels freisetzt, tun dies inhibitorische Synapsen bei jedem Aktionspotential (Abbildung 3.14 B). In einigen Zellen wurden auch noch höhere synaptische „Freisetzungswahrscheinlichkeiten“ gefunden, was mit einer multivesikulären Freisetzung in Verbindung gebracht werden müßte. Dieser Parameter kann somit auch durchaus Werte über eins annehmen; anderenfalls lägen solche Zahlenwerte für eine „Wahrscheinlichkeit“ außerhalb des Definitionsbereichs.

Die Größe der inhibitorischen Synapsen legen zunächst die Vermutung nahe, daß sich in ihnen mehr aktive Zonen, die parallel freisetzungskompetente Vesikel ausbilden, befinden. Entsprechend können sie, wenn stimuliert, diese Vesikel freisetzen. Wie bereits im Abschnitt „Einleitung“ erwähnt, wurden an den sehr hoch spezialisierten inhibitorischen *Purkinjeschen* Zellen des Cerebellums elektronenmikroskopisch zehn bis sechzehn aktive Zonen pro Synapse gezählt, was diesen Zellen eine bemerkenswert geringe Depression selbst bei sehr schnellen Signalfolgen ermöglicht: bei 100 Hz wurde keine signifikant stärkere Depression der synaptischen Transmission gefunden als bei 10 Hz (Telgkamp, Padgett *et al.* 2004). Die Funktion des Cerebellums ist auf eine sehr schnelle Informationsverarbeitung angewiesen, was wohl zum einen die enorm hohe Parallelisierung der neuronalen Verschaltung erforderlich macht – *Purkinjeschen* Neuronen bilden bis zu 10 000 Synapsen aus – aber auch Ursache der vielen aktiven Zonen in der einzelnen Synapse sein dürfte. Die für die vorliegende Arbeit untersuchten inhibitorischen Synapsen aus Hippocampus und Striatum zeigten hingegen deutliche synaptische Depression bereits bei einer Stimulation bei 10 Hz (Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24). Vermutlich ist auch weder im Hippocampus noch im Striatum eine so schnelle Signalverarbeitung erforderlich wie im Cerebellum, sehr wohl aber eine hohe synaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit in den inhibitorischen Synapsen. Die offenbar konstitutiv hohe Freisetzungswahrscheinlichkeit dieser Synapsen wird im Gegensatz zu der exzitatorischer Synapsen keinen wesentlichen Anteil

an Informationsspeicherung und dynamischer Informationsverarbeitung durch Plastizität *direkt* beitragen können; inhibitorischen Neuronen sollten somit eher andere Funktionen zuzuordnen sein. Für Synapsen, die Regelungsglieder der neuronalen Aktivität sind, sollte aber gerade eine hohe Freisetzungswahrscheinlichkeit von besonderem Vorteil sein. Dadurch ist es möglich, daß diese Aufgabe durch eine vergleichsweise geringe Anzahl von Synapsen bewerkstelligt wird. Zudem sind nur relativ wenige Aktionspotentiale erforderlich, um eine effektive Dämpfung zu erreichen. Eine generell hohe Effizienz der inhibitorischen Synapsen dürfte somit ein Erfordernis des Energiehaushaltes sein: auf je weniger Synapsen sie verteilt werden kann, desto weniger Energie wird verbraucht, um die Aufgabe zu bewerkstelligen. Eine konstitutiv hohe Freisetzungswahrscheinlichkeit steht zudem auch mit einer hohen Zuverlässigkeit in Zusammenhang (Foster, Kreitzer *et al.* 2002). Wie wichtig eine effektive, zuverlässige Regulation der neuronalen Aktivität exzitatorischer Neuronen durch die inhibitorischen ist, zeigt sich auch in Krankheitsbildern, die mit der Fehlerhaftigkeit der letzteren einhergehen. Bei cortical lokalisierten, fokalen Epilepsien fand man zum Beispiel entweder einen Total-, zumindest aber einen Teilverlust der inhibitorischen *Chandelier*-Zellen. Diese müßten daher eine wesentliche Schlüsselrolle in der Ausbildung dieses Krankheitsbildes eingenommen haben (DeFelipe 1999).

Erkenntnisse über molekulare und zelluläre Zusammenhänge der Signalverarbeitung im Gehirn tragen auf vielfältige Art und Weise dazu bei, den medizinischen Herausforderungen von Gegenwart und Zukunft wissenschaftsbasiert nachzukommen. Mehr noch dürften sie generell wichtig sein als elementare Grundlage für das Verständnis des menschlichen Denkens und Erinnerens – und damit unserer selbst.

Literaturverzeichnis

Afifi, A. K. (1994). *Basal ganglia: functional anatomy and physiology. Part 1.* J. Child Neurol. **9**(3): 249-260.

Afifi, A. K. (2003). *The basal ganglia: a neural network with more than motor function.* Semin. Pediatr. Neurol. **10**(1): 3-10.

Albin, R. L., Young, A. B. und Penney, J. B. (1989). *The functional anatomy of basal ganglia disorders.* Trends Neurosci. **12**(10): 366-375.

Altrock, W. D., tom Dieck, S., Sokolov, M., Meyer, A. C., Sigler, A., Brakebusch, C., Fassler, R., Richter, K., Boeckers, T. M., Potschka, H., Brandt, C., Loscher, W., Grimberg, D., Dresbach, T., Hempelmann, A., Hassan, H., Balschun, D., Frey, J. U., Brandstätter, J. H., Garner, C. C., Rosenmund, C. und Gundelfinger, E. D. (2003). *Functional inactivation of a fraction of excitatory synapses in mice deficient for the active zone protein bassoon.* Neuron **37**(5): 787-800.

Alvarez de Toledo, G., Fernández-Chacón, R. und Fernández, J. M. (1993). *Release of secretory products during transient vesicle fusion.* Nature **363**(6429): 554-558.

Aravanis, A. M., Pyle, J. L., Harata, N. C. und Tsien, R. W. (2003). *Imaging single synaptic vesicles undergoing repeated fusion events: kissing, running, and kissing again.* Neuropharmacology **45**(6): 797-813.

Ashery, U., Betz, A., Xu, T., Brose, N. und Rettig, J. (1999). *An efficient method for infection of adrenal chromaffin cells using the Semliki Forest virus gene expression system.* Eur. J. Cell Biol. **78**(8): 525-532.

Ashery, U., Varoqueaux, F., Voets, T., Betz, A., Thakur, P., Koch, H., Neher, E., Brose, N. und Rettig, J. (2000). *Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovin chromaffin cells.* EMBO J. **19**(14): 3586-3596.

Augustin, I., Rosenmund, C., Südhof, T. C. und Brose, N. (1999). *Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles.* Nature **400**(6743): 457-461.

Bekkers, J. M., Richerson, G. B. und Stevens, C. F. (1990). *Origin of variability in quantal size in cultured hippocampal neurons and hippocampal slices.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **87**(14): 5359-5362.

- Bekkers, J. M. und Stevens, C. F. (1989). *NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus*. Nature **341**(6239): 230-233.
- Bekkers, J. M. und Stevens, C. F. (1991). *Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **88**(17): 7834-7838.
- Benes, F. M. und Berretta, S. (2001). *GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder*. Neuropsychopharmacology **25**(1): 1-27.
- Betz, W. J. und Bewick, G. S. (1992). *Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction*. Science **255**(5041): 200-203.
- Betz, W. J., Mao, F. und Bewick, G. S. (1992). *Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals*. J. Neurosci. **12**(2): 363-375.
- Betz, W. J., Mao, F. und Smith, C. B. (1996). *Imaging exocytosis and endocytosis*. Curr. Opin. Neurobiol. **6**(3): 365-371.
- Biederer, T., Sara, Y., Mozhayeva, M., Atasoy, D., Liu, X., Kavalali, E. T. und Südhof, T. C. (2002). *SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly*. Science **297**(5586): 1525-1531.
- Binder, L. I., Frankfurter, A., Kim, H., Caceres, A., Payne, M. R. und Rebhun, L. I. (1984). *Heterogeneity of microtubule-associated protein 2 during rat brain development*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **81**(17): 5613-5617.
- Boeckers, T. M., Kreutz, M. R., Winter, C., Zuschratter, W., Smalla, K. H., Sanmarti-Vila, L., Wex, H., Langnaese, K., Bockmann, J., Garner, C. C. und Gundelfinger, E. D. (1999). *Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZ-domain protein highly enriched in the postsynaptic density*. J. Neurosci. **19**(15): 6506-6518.
- Brandstätter, J. H., Fletcher, E. L., Garner, C. C., Gundelfinger, E. D. und Wässle, H. (1999). *Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina*. Eur. J. Neurosci. **11**(10): 3683-3693.
- Chow, R. H., von Rüden, L. und Neher, E. (1992). *Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells*. Nature **356**(6364): 60-63.

- Clements, J. D. und Bekkers, J. M. (1997). *Detection of spontaneous synaptic events with an optimally scaled template*. Biophys. J. **73**(1): 220-229.
- Curtis, D. R., Duggan, A. W., Felix, D. und Johnston, G. A. (1970). *GABA, bicuculline and central inhibition*. Nature **226**(5252): 1222-1224.
- DeFelipe, J. (1999). *Chandelier cells and epilepsy*. Brain **122**(Pt 10): 1807-1822.
- Eichenbaum, H. (2004). *Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory*. Neuron **44**(1): 109-120.
- Engert, F. und Bonhoeffer, T. (1999). *Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity*. Nature **399**(6731): 66-70.
- Fernández-Chacón, R. und Südhof, T. C. (1999). *Genetics of synaptic vesicle function: toward the complete functional anatomy of an organelle*. Annu. Rev. Physiol. **61**: 753-776.
- Forsythe, I. D. (1994). *Direct patch recording from identified presynaptic terminals mediating glutamatergic EPSCs in the rat CNS, in vitro*. J. Physiol. **479**(Pt 3): 381-387.
- Foster, K. A., Kreitzer, A. C. und Regehr, W. G. (2002). *Interaction of postsynaptic receptor saturation with presynaptic mechanisms produces a reliable synapse*. Neuron **36**(6): 1115-1126.
- Freneau, R. T., Jr., Kam, K., Qureshi, T., Johnson, J., Copenhagen, D. R., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F. A., Nicoll, R. A. und Edwards, R. H. (2004). *Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites*. Science **304**(5678): 1815-1819.
- Freund, T. F. und Buzsáki, G. (1996). *Interneurons of the hippocampus*. Hippocampus **6**(4): 347-470.
- Graf, E. R., Zhang, X., Jin, S. X., Linhoff, M. W. und Craig, A. M. (2004). *Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins*. Cell **119**(7): 1013-1026.
- Grand, C., Arrault, J. und Cates, M. E. (1997). *Slow transients and metastability in wormlike micelle rheology*. J. Phys. II France **7**: 1071-1086.
- Gray, E. G. (1959). *Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study*. J. Anat. **93**: 420-433.

- Gundelfinger, E. D., Kessels, M. M. und Qualmann, B. (2003). *Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **4**(2): 127-139.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. und Sigworth, F. J. (1981). *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflügers Arch. **391**(2): 85-100.
- Harris, J., Ayyub, C. und Shaw, G. (1991). *A molecular dissection of the carboxyterminal tails of the major neurofilament subunits NF-M and NF-H*. J. Neurosci. Res. **30**(1): 47-62.
- Hessler, N. A., Shirke, A. M. und Malinow, R. (1993). *The probability of transmitter release at a mammalian central synapse*. Nature **366**(6455): 569-572.
- Heuser, J. E., Reese, T. S. und Landis, D. M. (1974). *Functional changes in frog neuromuscular junctions studied with freeze-fracture*. J. Neurocytol. **3**(1): 109-131.
- Jaffe, D. B. und Carnevale, N. T. (1999). *Passive normalization of synaptic integration influenced by dendritic architecture*. J. Neurophysiol. **82**(6): 3268-3285.
- Jahn, R., Lang, T. und Südhof, T. C. (2003). *Membrane fusion*. Cell **112**(4): 519-533.
- Jahn, R., Schiebler, W., Ouimet, C. und Greengard, P. (1985). *A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **82**(12): 4137-4141.
- Jahnsen, H. (1986). *Electrophysiological characteristics of neurones in the guinea-pig deep cerebellar nuclei in vitro*. J. Physiol. **372**: 129-147.
- Johnston, D. (1981). *Passive cable properties of hippocampal CA3 pyramidal neurons*. Cell. Mol. Neurobiol. **1**(1): 41-55.
- Johnston, D. und Brown, T. H. (1983). *Interpretation of voltage-clamp measurements in hippocampal neurons*. J. Neurophysiol. **50**(2): 464-486.
- Kahle, W. Taschenatlas der Anatomie: 3. Nervensystem und Sinnesorgane. 3. Aufl., Stuttgart; München, Thieme; DTV: 1979. Seite 222 f.
- Katz, B. und Miledi, R. (1968). *The role of calcium in neuromuscular facilitation*. J. Physiol. (London) **195**(2): 481-492.

- Kita, H. und Kitai, S. T. (1988). *Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat neostriatum: their morphological types and populations*. Brain Res. **447**(2): 346-352.
- Kullmann, D. M. (1994). *Amplitude fluctuations of dual-component EPSCs in hippocampal pyramidal cells: implications for long-term potentiation*. Neuron **12**(5): 1111-1120.
- Kullmann, D. M., Erdemli, G. und Asztely, F. (1996). *LTP of AMPA and NMDA receptor-mediated signals: evidence for presynaptic expression and extrasynaptic glutamate spill-over*. Neuron **17**(3): 461-474.
- Kumbhakar, M., Nath, S., Mukherjee, T. und Pal, H. (2004). *Solvation dynamics in triton-X-100 and triton-X-165 micelles: effect of micellar size and hydration*. J. Chem. Phys. **121**(12): 6026-6033.
- LeDoux, J. E. (1993). *Emotional memory systems in the brain*. Behav. Brain Res. **58**(1-2): 69-79.
- Liu, G. und Tsien, R. W. (1995). *Synaptic transmission at single visualized hippocampal boutons*. Neuropharmacology **34**(11): 1407-1421.
- Llinás, R., Sugimori, M. und Simon, S. M. (1982). *Transmission by presynaptic spike-like depolarization in the squid giant synapse*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **79**(7): 2415-2419.
- Mazer, N. A., Benedek, G. B. und Carey, M. C. (1980). *Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions*. Biochemistry **19**(4): 601-615.
- McAllister, A. K. und Stevens, C. F. (2000). *Nonsaturation of AMPA and NMDA receptors at hippocampal synapses*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **97**(11): 6173-6178.
- Medina, J. F. und Mauk, M. D. (2000). *Computer simulation of cerebellar information processing*. Nat. Neurosci. **3**(Suppl): 1205-1211.
- Meyer, A. C., Neher, E. und Schneggenburger, R. (2001). *Estimation of quantal size and number of functional active zones at the calyx of held synapse by nonstationary EPSC variance analysis*. J. Neurosci. **21**(20): 7889-7900.
- Miles, R. (1990). *Variation in strength of inhibitory synapses in the CA3 region of guinea-pig hippocampus in vitro*. J. Physiol. **431**: 659-676.

- Nägerl, U. V., Eberhorn, N., Cambridge, S. B. und Bonhoeffer, T. (2004). *Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons*. Neuron **44**(5): 759-767.
- Neher, E. (1992). *Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments*. Methods Enzymol. **207**: 123-131.
- Nicoll, R. A. und Malenka, R. C. (1995). *Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus*. Nature **377**(6545): 115-118.
- Nicholls, J. G., Martin, A. R. und Wallace, B. G.. *From neuron to brain : a cellular and molecular approach to the function of the nervous system*. Sunderland, Mass., Sinauer Assoc.: 1992. S. 320.
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L. und Svoboda, K. (2002). *Structure and function of dendritic spines*. Annu. Rev. Physiol. **64**: 313-353.
- Parra, P., Gulyas, A. I. und Miles, R. (1998). *How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus?* Neuron **20**(5): 983-993.
- Plenz, D. und Aertsen, A. (1996). *Neural dynamics in cortex-striatum co-cultures--I. anatomy and electrophysiology of neuronal cell types*. Neuroscience **70**(4): 861-891.
- Pyle, J. L., Kavalali, E. T., Piedras-Renteria, E. S. und Tsien, R. W. (2000). *Rapid reuse of readily releasable pool vesicles at hippocampal synapses*. Neuron **28**(1): 221-231.
- Rall, W. (1977). Core conductor theory and cable properties of neurons. Handbook of physiology. E. Kandel. Bethesda, ML, USA, American Physiological Society. **1. Pt.1**: 39-98.
- Renger, J. J., Egles, C. und Liu, G. (2001). *A developmental switch in neurotransmitter flux enhances synaptic efficacy by affecting AMPA receptor activation*. Neuron **29**(2): 469-484.
- Robitaille, R., Adler, E. M. und Charlton, M. P. (1990). *Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses*. Neuron **5**(6): 773-779.
- Rolfe, D. F. und Brown, G. C. (1997). *Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals*. Physiol. Rev. **77**(3): 731-758.

- Rosenmund, C., Clements, J. D. und Westbrook, G. L. (1993). *Nonuniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse*. Science **262**(5134): 754-757.
- Rosenmund, C., Sigler, A., Augustin, I., Reim, K., Brose, N. und Rhee, J. S. (2002). *Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms*. Neuron **33**(3): 411-424.
- Rosenmund, C. und Stevens, C. F. (1996). *Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses*. Neuron **16**(6): 1197-1207.
- Rosenmund, C. und Westbrook, G. L. (1993). *Rundown of N-methyl-D-aspartate channels during whole-cell recording in rat hippocampal neurons: role of Ca²⁺ and ATP*. J. Physiol. (London) **470**: 705-729.
- Ryan, T. A., Reuter, H., Wendland, B., Schweizer, F. E., Tsien, R. W. und Smith, S. J. (1993). *The kinetics of synaptic vesicle recycling measured at single presynaptic boutons*. Neuron **11**(4): 713-724.
- Ryan, T. A., Smith, S. J. und Reuter, H. (1996). *The timing of synaptic vesicle endocytosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **93**: 5567-5571.
- Sala, C. (2002). *Molecular regulation of dendritic spine shape and function*. Neurosignals **11**(4): 213-222.
- Schubert, R. und Schmidt, K. H. (1988). *Structural changes in vesicle membranes and mixed micelles of various lipid compositions after binding of different bile salts*. Biochemistry **27**(24): 8787-8794.
- Segal, M. M. und Furshpan, E. J. (1990). *Epileptiform activity in microcultures containing small numbers of hippocampal neurons*. J. Neurophysiol. **64**(5): 1390-1399.
- Stopar, D., Spruijt, R. B., Wolfs, C. J. und Hemminga, M. A. (1998). *Mimicking initial interactions of bacteriophage M13 coat protein disassembly in model membrane systems*. Biochemistry **37**(28): 10181-10187.
- Südhof, T. C. (1995). *The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions*. Nature **375**(6533): 645-653.
- Südhof, T. C. (2004). *The synaptic vesicle cycle*. Annu. Rev. Neurosci. **27**: 509-547.

- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C. und Jahn, R. (2000). *Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons.* Nature **407**(6801): 189-194.
- Telgkamp, P., Padgett, D. E., Ledoux, V. A., Woolley, C. S. und Raman, I. M. (2004). *Maintenance of high-frequency transmission at purkinje to cerebellar nuclear synapses by spillover from boutons with multiple release sites.* Neuron **41**(1): 113-126.
- Varoqueaux, F., Sigler, A., Rhee, J. S., Brose, N., Enk, C., Reim, K. und Rosenmund, C. (2002). *Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **99**(13): 9037-9042.
- Ventriglia, F. (2004). *Saturation in excitatory synapses of hippocampus investigated by computer simulations.* Biol. Cybern. **90**(5): 349-359.
- Werner, M., Chott, A., Fabiano, A. und Battifora, H. (2000). *Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry.* Am. J. Surg. Pathol. **24**(7): 1016-1019.
- Wojcik, S. M., Rhee, J. S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N. und Rosenmund, C. (2004). *An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **101**(18): 7158-7163.
- Zampighi, G. A. und Fisher, R. S. (1997). *Polyhedral protein cages encase synaptic vesicles and participate in their attachment to the active zone.* J. Struct. Biol. **119**(3): 347-359.
- Zeman, S. und Lodge, D. (1992). *Pharmacological characterization of non-NMDA subtypes of glutamate receptor in the neonatal rat hemisectioned spinal cord in vitro.* Br. J. Pharmacol. **106**(2): 367-372.
- Zucker, R. S. (1989). *Short-term synaptic plasticity.* Annu. Rev. Neurosci. **12**: 13-31.

Danksagungen:

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Christian Rosenmund, dem Betreuer der vorliegenden Arbeit, insbesondere für sein Vertrauen.

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Erwin Neher, der mir durch vielfältige Hinweise sehr geholfen hat, die nun vorliegende Arbeit abzuschließen.

Danke auch an Dr. Rafael Fernández-Chacón, der trotz räumlicher Entfernung regelmäßig über den Fortgang informiert war und so die Stetigkeit im Fortschritt unterstützte.

Herrn Dr. Jeong Seop Rhee danke ich für hervorragende Zusammenarbeit.

Bei meiner Praktikantin Leanna Südhof bedanke ich mich für die immunocytochemische Behandlung der in Abbildung 2.09 gezeigten Probe.

Meiner Tante Renate Rüggeberg und meinem Bruder Sebastian danke ich ganz herzlich für kritische Durchsicht des Manuskripts und insbesondere für die Korrektur der Druckfahnen.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Troe und Prof. Dr. Axel Zeeck sei für die Übernahme von Referat und Koreferat gedankt.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Membranbiophysik am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen bedanken, die mir in irgend einer Weise direkt und indirekt geholfen haben.

Göttingen, den 15. März 2005

Albrecht Sigler

Lebenslauf

Albrecht Sigler

Geboren am 23. September 1968 in Gadderbaum jetzt Bielefeld

1975 - 1979 Besuch der Martinschule Bielefeld

1979 - 1988 Besuch des Ratsgymnasiums Bielefeld. Abschluß Abitur mit Prüfung in den Fächern Altgriechisch, Biologie, Geschichte und Chemie

1988 - 1989 Wehrdienst als Sanitäter bei der Bundeswehr

1989 - März 1997 Studium der Chemie an der Universität Würzburg; Schwerpunkte (durch Wahl der Fortgeschrittenen-Praktika) in den Fächern Biochemie/Pharmazie und Organische Chemie; Examen in den Fächern Organische, Anorganische und Physikalische Chemie sowie Studienabschluß als Diplom-Chemiker

Mai 1996 - Februar 1997 Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema „Membranpermeation von Tetracyclinen“ an der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Friedemann W. Schneider, Lehrstuhl für Physikalische Chemie und von Prof. Dr. Roland Benz, Lehrstuhl für Biotechnologie

April 1997 bis Dezember 1998 Weiterführende Untersuchungen zum Thema der Diplomarbeit (mit Ziel der wissenschaftlichen Publikation) im Arbeitskreis von Dr. Michael Niederweis am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Erlangen

Jan 1999 bis April 1999 Arbeit als wissenschaftlicher Assistent am Lehrstuhl für Genetik, Universität München, unter Anleitung von Dr. Gero Steinberg

ab Juni 1999 wissenschaftlicher Assistent in der Arbeitsgruppe von Dr. Christian Rosenmund, Abteilung Membranbiophysik, am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen; Promotionsstudium an der Universität Göttingen

Publikationen

- Sigler, A., Schubert, P., Hillen, W. und Niederweis, M. (2000). *Permeation of tetracyclines through membranes of liposomes and Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. **267**(2): 527-534.
- Rosenmund, C., Sigler, A., Augustin, I., Reim, K., Brose, N. und Rhee, J. S. (2002). *Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms*. Neuron **33**(3): 411-424.
- Varoqueaux[†], F., Sigler[†], A., Rhee[†], J. S., Brose[†], N., Enk, C., Reim, K. und Rosenmund, C. (2002). *Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **99**(13): 9037-9042.
- Altrock, W. D., tom Dieck, S., Sokolov, M., Meyer, A. C., Sigler, A., Brakebusch, C., Fassler, R., Richter, K., Boeckers, T. M., Potschka, H., Brandt, C., Loscher, W., Grimberg, D., Dresbach, T., Hempelmann, A., Hassan, H., Balschun, D., Frey, J. U., Brandstätter, J. H., Garner, C. C., Rosenmund, C. und Gundelfinger, E. D. (2003). *Functional inactivation of a fraction of excitatory synapses in mice deficient for the active zone protein bassoon*. Neuron **37**(5): 787-800.
- Wojcik, S. M., Rhee, J. S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N. und Rosenmund, C. (2004). *An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **101**(18): 7158-7163.

[†] “F.V., A.S., J.-S.R., and N.B. contributed equally to this work.”