

Aus dem Physiologischen Institut  
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. Markus Bleich)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Strukturelle Plastizität von parvalbumin-positiven  
Interneuronen des Gyrus dentatus**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Amir Ali Ehtiati**  
aus Teheran

Kiel 2019

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Peer Wulff  
2. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Martina Böttner  
Tag der mündlichen Prüfung: 25. September 2020  
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 15. Juli 2020  
gez.: Prof. Dr. Johann Roider  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Gedächtnis.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Einteilung der Gedächtnisformen.....	1
1.1.2 Anatomische Strukturen der Gedächtnisbildung .....	2
<b>1.2 Hippocampus .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Anatomie des Hippocampus .....	4
1.2.2 Afferenzen und Efferenzen.....	5
1.2.3 Gyrus dentatus.....	6
1.2.4 GABA.....	9
1.2.5 Prinzipalzellen und Interneurone .....	9
<b>1.3 Neuronale Plastizität.....</b>	<b>12</b>
1.3.1 Funktionelle Plastizität .....	13
1.3.2 Strukturelle Plastizität .....	14
1.3.3 Plastizität GABAerger Interneurone .....	18
<b>1.4 Genetische Werkzeuge.....</b>	<b>19</b>
1.4.1 Adeno-assoziierte Viren (AAV) .....	19
1.4.2 Cre/loxP-System .....	20
<b>1.5 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>21</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Reagenzien und Lösungen .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Tierversuche.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Generierung der Adeno-assoziierten Viren (AAV) .....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 Stereotaktische Injektion.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5 Gewebsentnahme und Immunhistologie .....</b>	<b>25</b>
<b>2.6 Bildgebung .....</b>	<b>26</b>
<b>2.7 Software Analyse.....</b>	<b>27</b>
<b>2.8 Statistische Auswertung.....</b>	<b>29</b>
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Spezifität des genetischen Werkzeugs .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Dichte der Dornenfortsätze .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3 Verteilung der Dornenfortsatz-Morphologie.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4 Synaptische Verbindungen .....</b>	<b>39</b>

3.5	Verteilung der synaptischen Verbindungen auf den Dornenfortsätzen .....	41
4	Diskussion.....	44
4.1	Dornenfortsätze der parvalbumin-positiven Interneurone.....	44
4.2	Dornenfortsatz-Morphologie.....	46
4.3	Synaptische Verbindungen .....	47
4.4	Ausblick.....	50
5	Zusammenfassung.....	52
6	Literaturverzeichnis.....	54
7	Danksagung.....	61
8	Anhang .....	62
8.1	Abstract zur Postervorstellung.....	62
8.2	Poster .....	63

## Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziierte Viren
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
AP	Anterior-Posterior
AU	Airy Units
BNPI	Brain-specific Na <sup>+</sup> -dependent inorganic phosphate cotransporter
CA	Cornu Ammonis
CMV	Humane Cytomegalieviren
DV	Dorsal-Ventral
EE	Enriched Environment
EPSP	Exzitatorisch postsynaptisches Potential
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HIPP	Hilar perforant path-associated cell
HCl	Salzsäure
HK/HC	Haltungskäfig
ITRs	Invertierte terminale Sequenzwiederholungen
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LTD	Langzeit-Depression
LTP	Langzeitpotenzierung
mGluR5	Metabotrope Glutamatrezeptor
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	Normales Ziegen Serum
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PING	Petilla Interneuron Nomenclature Group
PFA	Paraformaldehyd
PSD	Postsynaptic Density
PVIs	Parvalbumin-positive Interneurone
REM	Rapid Eye Movement Schlafphase
RT	Raumtemperatur

STDP	Spike-Timing-Dependent Plasticity
Tris	Tromethamin
VGAT	Vesicular inhibitory amino acid transporter
VGLUT	Vesicular glutamate transporter

# 1 Einleitung

## 1.1 Gedächtnis

Zeit verläuft immer in eine Richtung. Das ist eines der elementarsten Naturgesetze. Von Beginn an regiert sie alles, was im Universum passiert, sei es kosmischer, geologischer, psychologischer oder physikalischer Natur. Galaxien entstehen und vergehen, Lebewesen werden alt, Ursachen gehen immer Wirkungen voraus. Der Fluss der Zeit ist unumkehrbar. Die menschliche Fähigkeit, sich an Ereignisse aus der Vergangenheit zu erinnern, bildet hierbei eine Ausnahme. Wer sich erinnert, reist mental in die eigene Vergangenheit zurück und weicht vom Gesetz der Unumkehrbarkeit des Zeitflusses ab, auch wenn diese Leistung einzig in der Wirklichkeit des Bewusstseins stattfindet und nicht in der physischen Realität.

Doch was genau steckt hinter dieser Fähigkeit? Welche Mechanismen ermöglichen uns dieses Kunststück? Eine exakte Antwort gibt es bisher nicht – vor allem, weil die Neuro- und Kognitionswissenschaften noch in den Kinderschuhen stecken (Tulving, 2002).

### 1.1.1 Einteilung der Gedächtnisformen

Erkenntnisse aus Studien an Patienten mit Amnesien sowie Tiermodelle haben zu einer anerkannten Kategorisierung beigetragen. Cohen und Squire (1980) unterteilten das Gedächtnis in einen deklarativen (expliziten) und non-deklarativen (impliziten) Teil. Das deklarative Gedächtnis erfordert die Fähigkeit, Informationen explizit abzuspeichern und diese bei Bedarf bewusst abzurufen. Dieser Teil ist bei Patienten mit Amnesien beeinträchtigt (Squire, 1987). Das non-deklarative Gedächtnis, welches bei Patienten mit einer Amnesie intakt ist, wurde als der Teil definiert, welcher ein stufenweises Lernen ermöglicht, ohne einer intentionellen Rück Erinnerung zu Grunde zu liegen (Schacter, 1987).

#### Deklaratives Gedächtnis

Die Fähigkeit des bewussten Abrufens von Fakten und Ereignissen wird dem deklarativem Gedächtnis zugeordnet (Levy et al., 2004). Die neuronale Verschaltung besteht aus bidirektionalen Verbindungen zwischen dem Neokortex, der parahippocampalen Region sowie dem Hippocampus. Jeder dieser Areale leistet dabei einen besonderen Beitrag zur Gedächtnisleistung (Eichenbaum, 2000). Tulving (1972) empfahl eine Differenzierung des deklarativen Gedächtnisses in einen episodischen und semantischen Teil.

Man geht davon aus, dass sich das episodische Gedächtnis evolutionär am spätesten gebildet hat und somit nur bei höher entwickelten Lebewesen vorhanden ist. Es ermöglicht das Aufrufen von expliziten Ereignissen durch bewusstes Erinnern und erlaubt eine zeitliche und räumliche Einordnung in der subjektiven Zeit durch eine „mentale Zeitreise“ (Tulving, 2002; Allen und Fortin, 2013).

Dem semantischen Gedächtnis wird das persönlich angeeignete Wissen zugeordnet, welches nicht mit speziellen Ereignissen der Vergangenheit assoziiert ist. Der Gebrauch des eigenen Wortschatzes dient hier als Beispiel (Tulving, 1972).

### Non-deklaratives Gedächtnis

Dem non-deklarativen Gedächtnis werden die erlernten Fähigkeiten zugeordnet, welche unbewusst abgespeichert wurden. Beispiele hierfür sind wahrnehmende und kognitive Leistungen, wie das korrekte Lesen von Wörtern in einem Spiegel (Cohen und Squire, 1980) oder motorische Fertigkeiten. Hierbei sind insbesondere die Basalganglien und das Cerebellum involviert (Cavaco et al., 2004).

### Kurzzeit-, Langzeit- und Arbeitsgedächtnis

Eine andere Kategorisierung des Gedächtnisses bezieht sich auf die zeitliche Komponente der Informationsverarbeitung und teilt diese in drei strukturelle Bestandteile ein. Informationen werden von sensorischen Organen aufgenommen, teilweise im Kurzzeitgedächtnis abgespeichert und gegebenenfalls in das Langzeitgedächtnis überführt. Das Kurzzeitgedächtnis speichert dabei Informationen für Minuten bis Stunden, wohingegen das Langzeitgedächtnis die Informationsmenge für Tage, Wochen oder sogar ein Leben lang aufnehmen kann (Bailey et al., 1996).

Der Begriff des Arbeitsgedächtnisses hingegen bezeichnet ein System von interagierenden Komponenten. Dieses ermöglicht die Verarbeitung von neuen und vorhandenen Informationen und stellt sie der Planung und Handlung zur Verfügung (Becker und Morris, 1999).

## **1.1.2 Anatomische Strukturen der Gedächtnisbildung**

Untersuchungen an Patienten mit Läsionen an unterschiedlichen Lokalisationen im Gehirn mit jeweils assoziierten spezifischen Formen von Amnesien haben zu Erkenntnissen über Struktur-Funktions-Beziehungen des Gedächtnissystems geführt.

## Medialer Temporallappen – Hippocampus

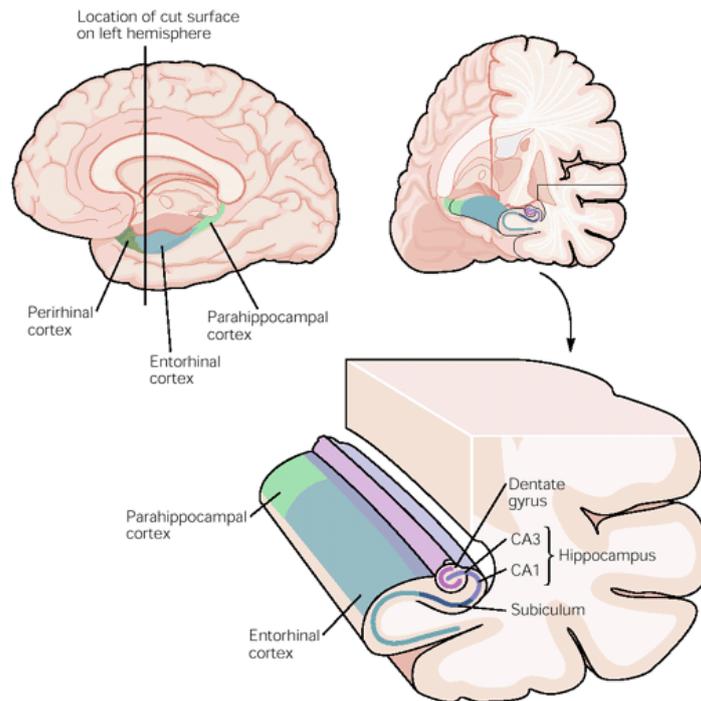
Der Krankheitsverlauf des Patienten H.M. hat einen bedeutenden Beitrag zum Verständnis von Lernen und Gedächtnis geleistet. Nach der bilateralen operativen Entfernung des medialen Temporallappens (Gyrus parahippocampalis, Amygdala und zwei Drittel des anterioren Hippocampus) zur Behandlung einer generalisierten Epilepsie, zeigte der Patient H.M. klassische Anzeichen einer anterograden Amnesie für das deklarative Gedächtnis. Nach der Operation war er nicht mehr in der Lage neue semantische oder episodische Informationen im Langzeitgedächtnis zu speichern. Er konnte sich aber durchaus an Informationen und Geschehnisse erinnern, die deutlich vor dem operativen Eingriff stattgefunden hatten. Dieses Muster der Amnesie zeigt, dass der Hippocampus zwar nicht der Speicherort des Langzeitgedächtnisses ist, aber eine essentielle Rolle bei dessen Entwicklung spielt. Die sprachlichen und motorischen Lernfähigkeiten von H.M. waren nicht betroffen, ebenso wenig sein IQ-Wert, welcher sogar postoperativ leicht erhöht war (Scoville und Milner, 1957).

Der Fall des Patienten R.B. bestätigte darüber hinaus die wichtige Rolle des Hippocampus für die Gedächtnisbildung. Nach einer zerebralen Ischämie zeigte der Patient eine anterograde Amnesie, jedoch keine weiteren kognitiven Beeinträchtigungen. Untersuchungen an dem Gehirn des Patienten zeigten post-mortem bilaterale Läsionen in der CA1 Region des Hippocampus (Zola-Morgan, 1996).

Studien mit Neuro-Bildgebung haben zudem gezeigt, dass die hippocampale Region bei räumlichen Gedächtnisinhalten aktiviert ist und diese somit eine entscheidende Rolle bei der räumlichen Orientierung einnimmt (Maguire et al., 1998).

## **1.2 Hippocampus**

Der Begriff Hippocampus wurde erstmalig im 16. Jahrhundert von dem Anatomen Arantius (1587) geprägt und leitet sich von dem griechischen Wort *ἵππόκαμπος* (Seepferdchen) ab. O'Keefe und Nadel (1978) beschreiben die paarig angelegten Hippocampi als den Kern eines neuronalen Speichersystems, das ein objektives räumliches Gerüst liefert. In diesem befinden sich die Elemente und Ereignisse der Erfahrungen eines Organismus, die miteinander verbunden werden. Sie liegen jeweils am Boden der Seitenventrikel des Temporallappens von Säugern und bilden eine essentielle Schaltstation des limbischen Systems.



**Abbildung 1: Die anatomische Organisation der hippocampalen Formation**

Die grundlegenden Komponenten des medialen Temporallappens zur Gedächtnisbildung sind in der medialen (links) und ventralen (rechts) Ebene der zerebralen Hemisphäre dargestellt.

Aus Kandel (2000).

### 1.2.1 Anatomie des Hippocampus

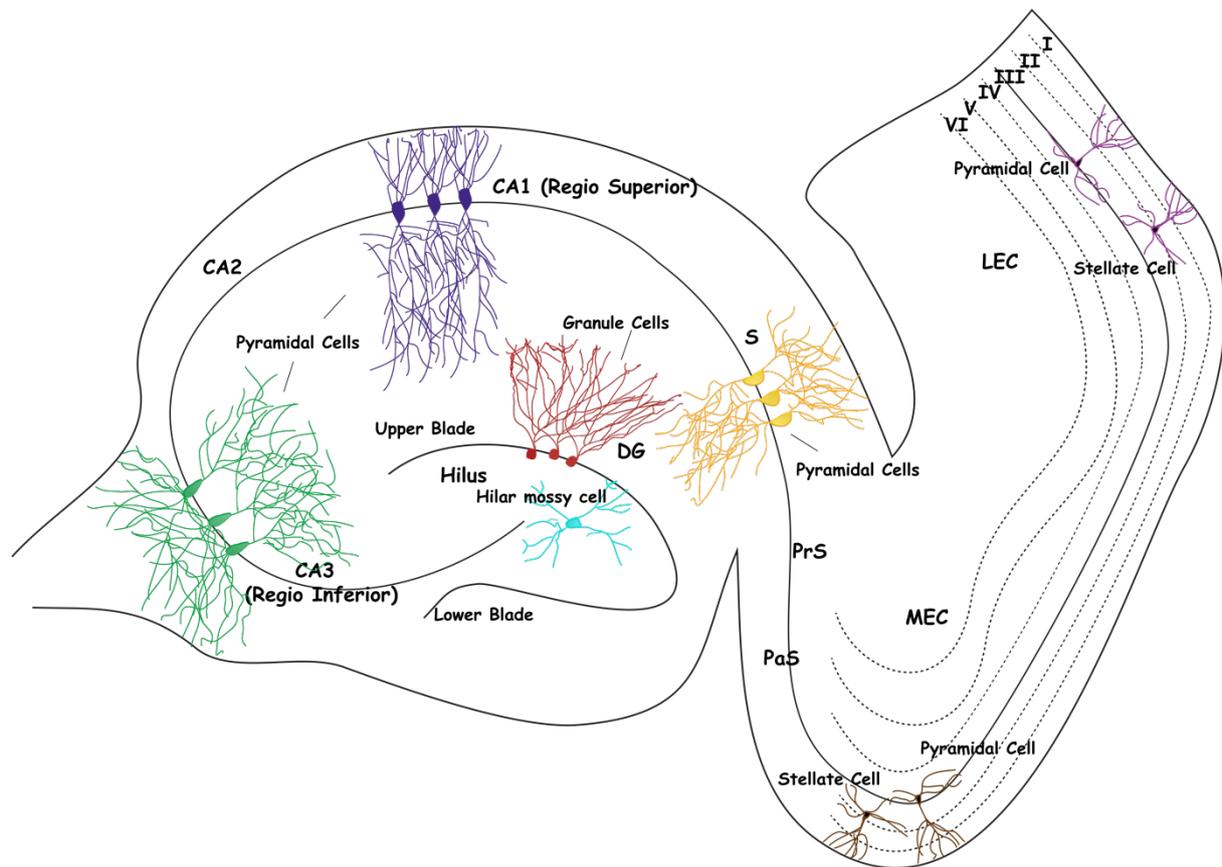
Zu der *Formatio hippocampi* gehören die Strukturen des entorhinalen Cortex, Gyrus dentatus, Hippocampus proprius (Cornu Ammonis) und das Subiculum mit Prä- und Parasubiculum (Abbildung 1).

Der sechs-schichtige entorhinale Cortex fungiert als Ausgangspunkt für den *perforant path*. Dessen Axone erreichen über die hippocampale Fissur den Gyrus dentatus sowie die CA3-Region.

Im *stratum moleculare* des Gyrus dentatus enden die Axone des *perforant path*. Hier zeichnet sich die Zytoarchitektur, im Gegensatz zur typischen sechsfachen Schichtung des Isocortex, durch eine dreigeteilte Schichtung aus. Aufgrund dessen wird die Bezeichnung Allocortex (Anders-Cortex) für den Gyrus dentatus verwendet. Die mittlere Schicht bildet das *stratum granulare* mit den glutamatergen Körnerzellen, die über die Moosfasern die Pyramidalzellen der CA3-Region erreichen.

Der Hippocampus proprius besteht aus den drei Regionen des Cornu Ammonis (CA1, CA2 und CA3) und zeigt ebenfalls eine dreigeteilte Schichtung (Abbildung 2). Die vom Gyrus dentatus kommenden Moosfasern enden im *stratum lucidum* der CA3-Region. Von hier aus projizieren die Pyramidalzellen über Schaffer-Kollaterale in die CA1-Region. Die Pyramidalzellen der

CA1-Region projizieren wiederum größtenteils an das Subiculum, welches die wichtigste Ausgangsstruktur der Formatio hippocampi ist. Hier wird die Erregung an das Prä- und Parasubiculum sowie den entorhinalen Cortex weitergeleitet (Abbildung 3) (Amaral und Witter, 1989). Diese synaptische Verschaltungsreihe, bestehend aus dem *perforant path*, den Moosfasern sowie den Schaffer-Kollateralen, wird auch als trisynaptischer Schaltkreis bezeichnet (Witter Menno P. et al., 2006).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Formatio hippocampi**

Zu sehen sind der Gyrus dentatus, Cornu Ammonis, Subiculum und die entorhinalen Areale. Beispiele der Prinzipalzellen und ihre jeweiligen Lokalisationen sind veranschaulicht.

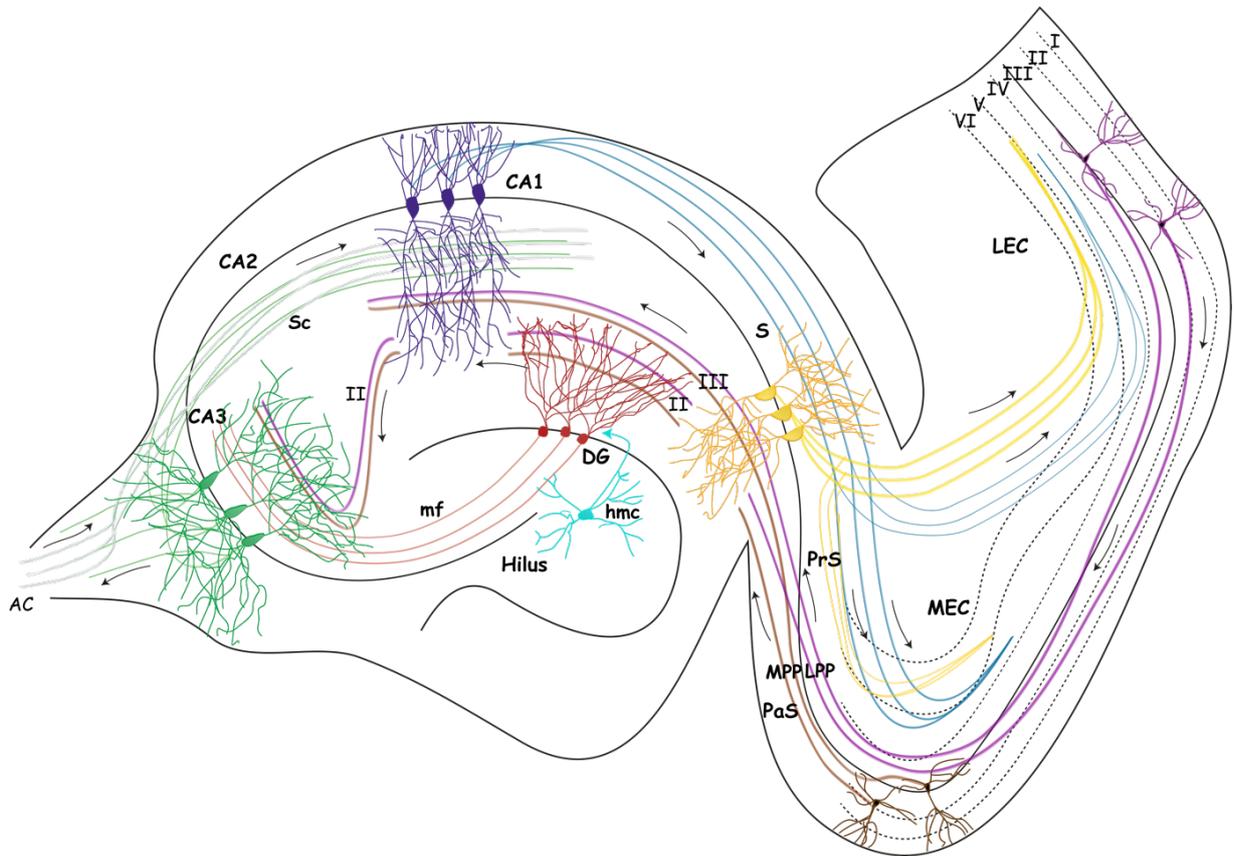
CA, Cornu Ammonis – DG, Gyrus dentatus – LEC, lateraler entorhinaler Cortex – MEC, medialer entorhinaler Cortex – PaS, Parasubiculum – PrS, Präsubiculum – S, Subiculum

Aus Foggetti (2014).

## 1.2.2 Afferenzen und Efferenzen

Die hippocampale Formation ist im Wesentlichen über drei große Faser-Bündel-Systeme mit anderen Arealen des Gehirns vernetzt. Die Fimbria-Fornix Bahn stellt Verbindung zum Hypothalamus, dem Hirnstamm und dem basalen Vorderhirn her (Meibach und Siegel, 1977). Über die Fasern des Angular Bündels sind die hippocampalen Regionen mit dem entorhinalen Cortex

verbunden (Amaral und Witter, 1989). Außerdem sind beide kontralateralen Hemisphären durch Kommissuralfasern miteinander verbunden (Abbildung 3) (Laurberg, 1979).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des hippocampalen Netzwerks**

In dieser Abbildung sind einige Inputs und Outputs der hippocampalen Formation illustriert. Das lokale Netzwerk besteht aus Inputs von der superfizialen Schicht des entorhinalen Cortex des Gyrus dentatus und des Hippocampus proprius, gefolgt von Outputs zurück zu den tiefen Schichten des entorhinalen Cortex von CA1 und Subiculum. Die Kommissuralfasern verbinden beide kontralateralen Hemisphären miteinander.

AC, assoziierende Kommissur - CA, Cornu ammonis - DG, Gyrus dentatus - hmc, hilar Moosfasern - LEC, lateraler entorhinaler Cortex - LPP, lateraler perforant path - MEC, medialer entorhinaler Cortex - mf, Moosfasern - MPP, medialer perforant path - PaS, Parasubiculum - PrS, Präsubiculum - S, Subiculum - Sc, Schaffer-Kollaterale

### 1.2.3 Gyrus dentatus

#### Anatomie

Der U- oder V-förmige Gyrus dentatus grenzt rostral an den Nuclei septales und kaudal an den Temporallappen. Er setzt sich aus einer suprapyramidalen und infrapyramidalen Lamelle zusammen. Die Zytoarchitektonik besteht aus einer dreigeteilten Schichtung: (1) Die Körnerzellschicht ist dicht gepackt mit Körnerzellen, den Prinzipalzellen des Gyrus dentatus. (2) In der Molekularschicht befinden sich hauptsächlich die Dendriten der Körnerzellen sowie deren

Afferenzen. (3) Die polymorphe Schicht, auch Hilus genannt, enthält die Moosfasern. Eine heterogene Ansammlung von Interneuronen befindet sich in allen Schichten.

Das adulte Gehirn einer Ratte enthält etwa eine Million Körnerzellen (beim Menschen etwa 15 Mal mehr). Deren elliptische Somata haben im Schnitt eine Weite von 10 $\mu$ m und eine Höhe von 18 $\mu$ m. Von diesen Somata geht jeweils ein konusförmiger Dendritenbaum ab. Die Dendriten in der suprapyramidalen Lamelle haben im Schnitt 1.6 Dornenfortsätze/ $\mu$ m. In der infrapyramidalen Lamelle sind es 1.3 Dornenfortsätze/ $\mu$ m (Amaral et al., 2007). Entgegen früherer Meinungen haben Untersuchungen gezeigt, dass in zwei Arealen des Gehirns eine adulte Neurogenese stattfindet. Neben den Zellen der subventrikulären Zone sind es vor allem die Körnerzellen des Gyrus dentatus, welche für dieses Phänomen bekannt sind (Gage, 2010). Aufgrund einer stetigen Umsatzrate bleibt jedoch die Gesamtzahl der Neurone fortlaufend gleich (Abrous et al., 2005).

Im Hilus befindet sich eine Gruppe von Interneuronen mit größeren Somata (25-35 $\mu$ m) und einer triangulären oder multipolaren Form. Es handelt sich hierbei um die glutamatergen Mooszellen. Neben den inhibierenden Interneuronen machen sie die Hälfte aller Neurone im Hilus aus (Amaral et al., 2007).

### Afferenzen und Efferenzen

Eines der charakteristischen Merkmale des Gyrus dentatus ist die größtenteils unidirektionale Anlage seiner In- und Outputs.

Als Teil des trisynaptischen Loops bekommt der Gyrus dentatus seine Hauptafferenzen aus dem entorhinalen Cortex. Die Informationen aus dem *perforant path* werden hauptsächlich von den Dendriten der Körnerzellen in den äußeren zwei Dritteln der Molekularschicht aufgenommen. Die Axone der Körnerzellen projizieren dann als Moosfasern, auf eine kleinere Anzahl von Pyramidalzellen der CA3-Region. Je nach Ursprungsregion aus dem entorhinalen Cortex unterscheidet man den lateralen vom medialen *perforant path*.

Neben diesen Afferenzen aus dem entorhinalen Cortex erreichen auch einige wenige Projektionen aus dem Prä- und Parasubiculum die Molekularschicht des Gyrus dentatus. Die Funktionen dieser Fasern sind noch weitgehend ungeklärt, jedoch lässt sich eine potentielle Verbindung zum Thalamus vermuten, da das Präsubiculum nur von den Nuclei anteriores thalami innerviert wird (Amaral et al., 2007).

Weiteren geringfügigen Input erhält der Gyrus dentatus aus den Nuclei septales, supra mammillares, den dopaminergen Neuronen der Area tegmentalis ventralis, den serotonergen

Neuronen der Nuclei Raphes sowie den noradrenergen Zellen des Locus coeruleus (Amaral et al., 2007).

Für die exzitatorischen Afferenzen des Gyrus dentatus sind VGLUT1, VGLUT2 und VGLUT3 als präsynaptische Marker bekannt. Es handelt sich hierbei um vesikuläre Glutamat Transporter, deren Vorkommen teilweise spezifischen neuronalen Populationen zugeordnet werden kann (Herzog et al., 2006).

Bei VGLUT1 handelt es sich um ein Protein (BNPI), welches die Natrium-abhängige Aufnahme von anorganischem Phosphat durch die Plasmamembran ermöglicht und hierbei auch den Transport von Glutamat in synaptischen Vesikeln bewirkt. Abgesehen vom *stratum granulare*, kommt der Transporter in allen Schichten des Gyrus dentatus vor (Leranth and Hajszan, 2007).

### Funktionen

Die Unterscheidung zwischen ähnlichen aber doch unterschiedlichen Erinnerungen wird in den Neurowissenschaften als eine der Hauptfunktionen des Gyrus dentatus angesehen. Diese Aufgabe wird als *pattern separation* bezeichnet. Insbesondere bei der Differenzierung von ähnlichen Gedächtnisinhalten spielt der Gyrus dentatus eine bedeutende Rolle. Es wird angenommen, dass diese Funktion von der spärlichen Weiterleitung der Körnerzellen aus dem Gyrus dentatus zu den Pyramidalzellen der CA3-Region bewerkstelligt wird. Zum Teil wird dies von den GABAergen Interneuronen erzeugt (Kesner, 2007). Bei Patienten mit einer posttraumatischen Belastungsstörung wird diskutiert, ob diese Funktion beeinträchtigt ist, da jene aufgrund einer exzessiven Generalisierung nicht mehr zwischen der vorrausgegangenen belastenden Situation und einer harmlosen, aber vermeintlich ähnlichen Situation unterscheiden können (Sahay et al., 2011).

Die oben erwähnte Neuroneogenese hat eine Mitwirkung an dieser Funktion (Vivar und Van Praag, 2013). Tatsächlich sind hippocampus-abhängige Lernaufgaben, Exploration und physische Aktivität starke Neuroneogenesestimuli (Gould et al., 1999; Fan et al., 2007; Thuret et al., 2009).

Zusätzlich besteht zu der *pattern separation* die andere Hauptfunktion des Gyrus dentatus im verbindenden Kodieren von diversen Informationen in das Gedächtnis, wodurch eine höhere Detailtreue der erlebten Wahrnehmung abgespeichert wird. Diese Funktion wird als *conjunctive encoding* bezeichnet (Aimone et al., 2014).

Letztendlich nimmt der Gyrus dentatus eine zentrale Rolle ein, wenn es um die Muster-Vervollständigung – *pattern completion* – geht. Durch das Kombinieren von einzelnen Details

ermöglichen hierbei die ausgereiften Körnerzellen das Auffinden von Erinnerungen. (Nakashiba et al., 2012).

#### **1.2.4 GABA**

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Seine Wirkung entfaltet GABA durch die Aktivierung von ionotropen oder metabotropen Rezeptoren, welche prä- und postsynaptisch lokalisiert sind. Die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Chloridionenkanäle, die sich öffnen, sobald GABA bindet. GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelt. Die Aktivierung führt zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit von K<sup>+</sup>-Kanälen und einer verminderten Öffnungswahrscheinlichkeit von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen. Dies resultiert in einer Hyperpolarisation der nachgeschalteten Zellmembran (Owens und Kriegstein, 2002).

Verschiedene Studien haben die außerordentliche Bedeutung von GABAergen Neuronen für die Bildung von Gedächtnisinhalten verdeutlicht. Es ist bekannt, dass Medikamente, wie z.B. Diazepam, welche die Wirkung von GABA am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor verstärken, auch die Gedächtnisfähigkeiten beeinträchtigen (Brioni, 1993). In diesem Zusammenhang haben Experimente an Mäusen während einer T-Labyrinth-Aufgabe weiterhin verdeutlicht, dass GABA-Rezeptor-Agonisten im Hippocampus die Gedächtnisfunktion negativ beeinflussen, wohingegen Rezeptor-Antagonisten das Erinnern erleichtern (Farr et al., 2000).

Die Bedeutung von GABA für die Gedächtnisfunktion im Hippocampus verdeutlicht sich des Weiteren dadurch, dass bei alternden Tieren mit Beeinträchtigungen in der Gedächtnisleistung gleichzeitig eine Reduktion der GABAergen Interneurone in der CA1 Region des Hippocampus festgestellt wurde (Stanley et al., 2012). Murray et al. (2011) fanden zudem heraus, dass nach der Blockade von GABAergen parvalbumin-positiven Interneuronen in der CA1-Region von Mäusen das räumliche Arbeitsgedächtnis beeinträchtigt wird.

#### **1.2.5 Prinzipalzellen und Interneurone**

Bereits 1917 beschrieb Ramón y Cajal eine heterogene Gruppe von Neuronen mit kurzen Axonen. Die funktionelle Überlegenheit des menschlichen Gehirns führte er unter anderem auf das Vorhandensein dieser sogenannten Interneurone zurück, da diese insbesondere im Neocortex von höheren Primaten existent sind.

Die Pyramidalzellen, die wie die Körnerzellen des Gyrus dentatus zu den Prinzipalzellen gezählt werden, machen etwa 80-90% der Neurone im Neocortex aus. Sie haben weitreichende Axone, mit welchen sie oftmals in andere Hirnregionen projizieren. Dadurch wird die lokal

verarbeitete Information weitergeleitet. Interneurone hingegen regulieren lokal die Aktivität der Prinzipalzellen (Yuste, 2005).

Die Prinzipalzellen benutzen für ihre Signalübertragung meist den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat, während die Interneurone überwiegend  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ausschütten und somit inhibierend auf lokale Prinzipalzellen und andere Interneurone wirken. Zudem setzen sie diverse Neuropeptide frei (Cholecystinin, Enkephalin, Neuropeptid Y, Somatostatin, vasoaktives intestinales Peptid) (Freund, 2003; Yuste, 2005).

Über ihre inhibierende Wirkung regulieren Interneurone die exzitatorischen glutamatergen Prinzipalzellen und sorgen somit für eine zeitlich geordnete Aktivität. Sie fungieren als Dirigenten des neuronalen Netzwerkes (de Lanerolle et al., 1989; Lovett-Barron und Losonczy, 2014).

Es sind vor allem zwei Inhibitions-Schaltkreise bekannt. Bei der *feedback inhibition* hemmt sich die Zielzelle selbst über ein Interneuron, welches als eine disynaptische Rückkopplungsschleife dient. Bei der *feed-forward* Inhibition wird ein inhibitorisches Interneuron von der gleichen präsynaptischen Zelle aktiviert, wie die Zelle, welche daraufhin durch das Interneuron gehemmt wird (Kullmann, 2011).

### Interneurone des Gyrus dentatus

Bei den Interneuronen handelt es sich um eine höchst diverse und heterogene Gruppe von Nervenzellen. Die Variabilität kann auf anatomische, elektrophysiologische, neurochemische und pharmakologische Aspekte beruhen.

Für eine neurochemische Klassifizierung werden molekulare Marker benutzt. Die Expression von spezifischen Molekülen ist häufig verbunden mit bestimmten Morphologien und elektrophysiologischen Eigenschaften. Unter den bisher bekannten molekularen Markern sind drei Kalzium-bindende Proteine: Parvalbumin, Calbindin und Calretinin. Zudem sind diverse Neuropeptide in diesem Zusammenhang beschrieben worden: Somatostatin, Cholecystinin, Enkephalin, Neuropeptid Y, Substanz P, VIP etc. (Freund und Buzsáki, 1996).

Als Eingangsstruktur des Hippocampus erhält der Gyrus dentatus eine große Menge an Informationen. Daher ist insbesondere hier eine regelrechte Funktion der Interneurone von großer Bedeutung, um eine geordnete Weitergabe des Inputs zu gewährleisten.

Die Axone der verschiedenen Interneurone projizieren sowohl auf die Somata der Körnerzellen, wie auch auf deren Dendriten und Axone (Houser, 2007).

Interneurone haben eine eindeutige anatomische Organisation innerhalb einer definierten Region. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sie hoch differenziert sind und spezifische Funktionen für die Kontrolle der Erregbarkeit der Körnerzellen erfüllen (Mott et al., 1997).

Obwohl die Unterteilung anhand molekularer Merkmale enorm vielfältig sein kann, hat die Petilla Interneuron Nomenclature Group (PING) eine Kategorisierung der Interneurone mittels folgender Gruppen von Molekülen vorgenommen: Transkriptionsfaktoren, Neurotransmitter, Neuropeptide, Kalzium-bindende Proteine, Neurotransmitter-Rezeptoren, Strukturproteine, Ionenkanäle, Connexine, Pannexine und Membrantransporter (Ascoli et al., 2008).

Eine besonders prominente Rolle nehmen die sogenannten parvalbumin-positiven Interneurone (PVI) ein, da sie vornehmlich die Somata oder proximalen Dendriten ihrer Zielzellen innervieren und dadurch die Aktivität der Körnerzellen besonders effektiv regulieren können (Klausberger et al., 2003).

#### *Parvalbumin-positive Interneurone*

Parvalbumin ist ein kalzium-bindendes Protein. Im Gyrus dentatus kommen parvalbumin-positiv Interneurone morphologisch als Korb- oder axo-axonische Zellen vor. Interessanterweise innervieren sie jeweils spezifische subzelluläre Bereiche der nachgeschalteten Zelle (Klausberger und Somogyi, 2008).

Das unterscheidende Hauptmerkmal der axo-axonischen Interneurone sind die charakteristischen Endungen der Axone, welche 2-30 Reihen an Synapsen mit den Axoninitialsegmenten der Prinzipalzellen bilden. Ihre Zellkörper liegen innerhalb des *stratum granulare* oder grenzen daran an. Sie haben einen Dendritenbaum mit sternförmig verlaufenden Ästen durch des *stratum moleculare* (Freund und Buzsáki, 1996).

Die Somata der Korbzellen befinden sich meist zwischen den Körnerzellen, angrenzend an den Hilus. Ribak und Seress (1983) haben fünf verschiedenen Typen von Korbzellen anhand ihrer Morphologie, Lokalisation und dem Vorkommen von Dornenfortsätzen beschrieben. Diese sind die pyramidalen und invertiert fusiformen Korbzellen mit wenigen Dornenfortsätzen, sowie fusiforme, horizontale und Korbzellen der Molekularschicht ohne Dornenfortsätze. Die basalen Dendriten ziehen immer in den Hilus ein und sorgen somit dafür, dass die Korbzellen sowohl über einen *feed-forward* Mechanismus von Zellen aus dem entorhinalen Cortex und der CA3-Region als auch über einen *feedback* Mechanismus von den Moosfasern im Hilus innerviert werden können. Die *feed-forward* Inhibition wird hierbei über die apikalen Dendriten in der Molekularschicht ausgelöst (Freund und Buzsáki, 1996; Houser, 2007).

Das Nervengeflecht einer Korbzelle kann es ihr ermöglichen, sich mit bis zu 10.000 (1%) Körnerzellen zu verknüpfen (Morgan et al., 2007). Im Gyrus dentatus machen parvalbumin-exprimierende Neurone etwa 15-21% der gesamten Zellen aus (Freund und Buzsáki, 1996).

Sowohl die axo-axonischen Interneurone als auch die Korbzellen haben wesentlich größere Somata (25-35µm) als die Körnerzellen (Houser, 2007).

Die genaue Funktion von Parvalbumin ist allerdings noch nicht geklärt. Erste Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Präsenz dieses Kalzium-bindenden Proteins eine mögliche physiologische Adaptation an das hohe Level der besonders schnell-antwortenden Gruppe von Interneuronen darstellt (Houser, 2007).

### 1.3 Neuronale Plastizität

Bereits 1949 postulierte der Psychologe Donald Hebb, eine plastische Formbarkeit des Gehirns, welche die Grundlage von Lern- und Gedächtnisprozessen darstellt.

Er formulierte in seinem Buch *The Organization of Behavior*:

Wenn ein Axon der Zelle A [...] Zelle B erregt und wiederholt und dauerhaft zur Erzeugung von Aktionspotentialen in Zelle B beiträgt, so resultiert dies in Wachstumsprozessen oder metabolischen Veränderungen in einer oder in beiden Zellen, die bewirken, dass die Effizienz von Zelle A in Bezug auf die Erzeugung eines Aktionspotentials in B größer wird.

In der Tat spielt das von ihm beschriebene Modell der synaptischen Plastizität eine zentrale Rolle für die diversen Formen von Lernen und Gedächtnis, mit der sich die neuronalen Strukturen funktionell und morphologisch an spezifische Reize anpassen können.

Seine Theorie erläuterte er damit, dass je häufiger Neurone gleichzeitig aktiv sind, desto eher würden sie aufeinander reagieren („what fires together, wires together“) (Hebb, 1949).

Da der Hippocampus – auch durch die Untersuchungen am Patienten H.M. – als wichtige Struktur für die Gedächtnisbildung identifiziert wurde und eine ausgeprägte Vernetzung aufweist, eignet er sich besonders gut dafür, plastische Phänomene an neuronalen Strukturen zu untersuchen. Dies machte sich 1966 auch der damalige Doktorand Terje Lømo in Oslo zu Nutze, als er das Phänomen der Langzeitpotenzierung (LTP) entdeckte. Er beobachtete, dass eine kurze hochfrequente elektrische Stimulation in einer lang andauernden Vergrößerung des exzitatorisch postsynaptischen Potentials (EPSP) resultiert. Zudem fand er heraus, dass nach einem solchen Tetanus eine größere Anzahl an Zellen die Reizschwelle für ein Aktionspotential überschreiten können (Bliss und Lømo, 1973).

### 1.3.1 Funktionelle Plastizität

Zur funktionellen Plastizität werden plastische Vorgänge gezählt, welche vor allem das synaptische Übertragungssystem beeinflussen und somit die funktionelle Verschaltung eines Netzwerks verändern (Kampfhammer, 2000).

#### LTP und Gedächtnis

Die verschiedenen Gedächtnisformen und beteiligten anatomischen Strukturen wurden eingangs bereits beschrieben. Gewiss basiert das Gedächtnis auf neuronalen Veränderungen, welche durch Erfahrungen induziert werden (Kandel, 2001). Welche Mechanismen führen aber zu den plastischen Prozessen? Als Beispiel kann die Langzeitpotenzierung (LTP) aufgrund verschiedener Charakteristika dienen, denn sie ist eine der am besten untersuchten Formen neuronaler Plastizität.

Zunächst einmal agiert die LTP spezifisch, was bedeuten soll, dass LTP nur an jenen Synapsen stattfindet, in welchen die Kalzium-Konzentration durch Aktivierung der *N*-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Rezeptoren nach einer postsynaptischen Depolarisation erfolgt ist. Ein Übergreifen auf benachbarte, nicht depolarisierte Strukturen findet in der Regel nicht statt. Diese Eigenschaft ist für ein spezifisches Erinnern von großer Bedeutung (Bear und Malenka, 1994).

Außerdem ist die LTP assoziativ, wodurch sie zum Beispiel eine Reihe von ankommenden unterschiedlichen Afferenzen zu einem Potential akkumuliert und somit eine LTP auf eine gemeinsame Zelle induzieren kann (Martinez et al., 2002).

Ferner ist die Beständigkeit eine wichtige Eigenschaft der LTP für die Gedächtnisbildung (Davis et al., 2004). Der Hippocampus hat hierbei aber nur eine zeitbegrenzte Rolle. Das permanente Langzeit-Gedächtnis wird hauptsächlich in neokortikalen Arealen abgespeichert (Squire, 1987), wahrscheinlich während Tief- oder REM-Schlafphasen (Maquet, 2001).

Ein alternativer Mechanismus, welcher ebenfalls Einfluss auf die synaptische Verbindungsstärke hat, ist die *Spike-Timing-Dependent Plasticity* (STDP). Hierbei handelt es sich um einen Vorgang, welcher eine LTP oder Langzeit-Depression (LTD; Gegenstück zur LTP; Bear und Malenka, 1994) einleiten kann, je nach zeitlicher Korrelation des postsynaptischen Aktionspotentials zur präsynaptischen Transmitterfreisetzung (Fröhlich, 2016).

#### Molekulare Basis der LTP

Der Großteil der Experimente zum Verständnis der LTP wurde an den Synapsen zwischen den Schaffer-Kollateralen und CA1-Pyramidalzellen durchgeführt. Von besonderem Interesse sind hierbei die NMDA- und Aminomethylphosphonsäure(AMPA)-Glutamatrezeptoren.

Eine Aktivierung der NMDA-Rezeptoren erhöht die Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  und  $\text{K}^{+}$ , jedoch führt erst eine ausreichende postsynaptische Depolarisierung zu einem synaptischen Strom, da ansonsten der Kanal mit Magnesium-Ionen blockiert ist. Dieser Vorgang führt dazu, dass bestimmte synaptische Verbindungen, die häufiger und stärker benutzt werden, leitfähiger werden - ein wichtiger molekularer Mechanismus für das Lernen und das Gedächtnis (Morris, 2013). Anhand eines NMDA-Rezeptor-Antagonisten konnten Morris et al. (1986) auch die Involvierung dieser Rezeptoren in das räumliche Lernen zeigen. Nach Injektion war die Induktion der LTP unterdrückt und folglich das räumliche Lernen beeinträchtigt.

Das entscheidende Ereignis für die Induktion einer LTP ist der intrazelluläre Kalzium-Einstrom. Es werden dadurch verschiedene Kinasen aktiviert, unter anderem die Proteinkinase C (PKC), welche an der Ausbildung der LTP beteiligt ist (Shaw, 1994). Die Aktivierung verschiedener Proteinkinasen kann dann zum Beispiel zur Phosphorylierung von AMPA-Rezeptoren führen, wodurch ihre Membranexpression oder ihre Leitfähigkeit steigt (Wang et al., 2005; Collingridge et al., 2004). Forschungen zur Proteinkinase C haben gezeigt, dass das Enzym bei der Ausbildung von neuronalen Netzwerken eine wichtige Rolle einnimmt, da es vor allem zu Zeiten von synaptischen Formierungen gehäuft vorkommt (Shirai et al., 2008).

Des Weiteren führt der postsynaptische Kalziumeinstrom zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren mit konsekutiver Geninduktion und Synthese von neuen Proteinen, die für die langfristige Aufrechterhaltung der LTP benötigt werden (Teyler und DiScenna, 1987).

### **1.3.2 Strukturelle Plastizität**

Bei der strukturellen Plastizität kommt es zu anatomisch fassbaren Veränderungen im neuronalen Netzwerk, welche prä- und postsynaptisch stattfinden können (Kampfhammer, 2000). Schaefers et al. (2010) konnten nachweisen, dass ein angereichertes Umfeld (Enriched Environment) bei Mäusen die präsynaptische Umsatzrate steigern kann und somit zur strukturellen Plastizität beiträgt. Bislang gibt es aber noch relativ wenige Informationen zu präsynaptischen strukturellen Umformungen. Obwohl gewisse synaptische Strukturen langlebig sind und vielleicht sogar für ein Leben lang bestehen bleiben, ist es bekannt, dass ein Teil zell-spezifische, erfahrungsabhängige strukturelle Plastizität aufweisen können (Holtmaat und Svoboda, 2009). Im Gegensatz zu den inhibitorischen Synapsen, die sich meist direkt auf den Zweigen der Dendriten bilden, werden exzitatorische Synapsen hauptsächlich an kleinen Vorwölbungen der Dendriten gebildet. Diese Strukturen werden als Dornenfortsätze bezeichnet und dienen der synaptischen Übertragung und Plastizität. Auf der postsynaptischen Seite einer exzitatorischen Synapse befindet sich eine postsynaptische Verdickung, welche aus mannigfaltigen Proteinen

besteht und postsynaptische Dichte (PSD) genannt wird. Während ihrer Entwicklung unterliegt ihre Struktur und Komposition dynamischen Veränderungen in Abhängigkeit von der synaptischen Aktivität. Ein Kernbestandteil dieser Verdickung ist das Protein PSD95 (Sheng und Hoogenraad, 2007). Das Zytoskelett der Dornenfortsätze besteht aus Aktinfilamenten, welche eine wesentliche Rolle in der Plastizität einnehmen. Durch synaptische Aktivitäten werden sie stetig remodelliert, um sich morphologisch den Anforderungen anzupassen. Es ist beispielsweise bekannt, dass nach LTP-Induktion die Dornenfortsätze einen breiteren und kürzeren Hals bekommen, wodurch höchstwahrscheinlich der Widerstand verringert und elektrische Fortleitung erleichtert wird (Hlushchenko et al., 2016). Des Weiteren wird über eine Korrelation der Dornenfortsatz-Umsatzrate und der erfahrungsabhängigen Plastizität spekuliert. In einigen Studien konnte bereits eine ansteigende Dornenfortsatz- und Synapsen-Dichte nach Training in einem angereicherten Umfeld beobachtet werden (Holtmaat und Svoboda, 2009).

Im Folgenden wird auf die Struktur, Morphologie und Funktionen der Dornenfortsätze näher eingegangen.

### Dornenfortsätze

Dornenfortsätze kommen primär an den Dendriten von Prinzipalzellen vor. Es sind aber auch Interneurone beschrieben worden, wie zum Beispiel die *Hilar perforant path-associated Cell* (HIPP)-Interneurone, die eine spärliche Verteilung dieser hoch spezialisierten Strukturen tragen (Freund und Buzsáki, 1996). Darüber hinaus sind, trotz der wichtigen Rolle des inhibitorischen Netzwerkes, kaum Arbeiten bekannt, welche Dornenfortsätze an Interneurone untersuchen (Guirado et al., 2014). Nur einige wenige Forschungsarbeiten haben kürzlich zeigen können, dass auch manche Interneurone dem dendritischen Umbau durch Bildung von Dornenfortsätzen unterliegen. Dazu gehört die Arbeit von Sancho und Bloodgood (2018), die kürzlich nachweisen konnten, dass parvalbumin-positive Interneurone im visuellen Kortex der Maus spärlich Dornenfortsätze tragen.

Der Kopf hat in der Regel einen Durchmesser von  $0,5\mu\text{m}$  bis  $1,5\mu\text{m}$  und ist über einen  $0,35\mu\text{m}$  bis  $3,80\mu\text{m}$  langen Hals mit dem Dendriten-Ast verbunden. Dieser fungiert als Diffusionsbarriere für organische Moleküle und Ionen und kann eine Dicke von  $0,1\mu\text{m}$  bis  $0,5\mu\text{m}$  erreichen (Yuste, 2010). Mit Zunahme der synaptischen Aktivität steigt auch das Volumen des Kopfes, wodurch die PSD größer wird und vermehrt AMPA-Rezeptoren eingebaut werden. Dies hat dann eine erhöhte Glutamat-Sensitivität zur Folge (Holtmaat und Svoboda, 2009). Auf molekularer Ebene wird die Stabilität innerhalb der Dornenfortsätze über das F-Aktin gewährleistet (Abbildung 4). Diese Filamente verankern die vielen Proteine der PSD und sorgen für die

Verteilung der AMPA-Rezeptoren. Zudem begünstigen diverse Adhäsions-Moleküle im synaptischen Spalt eine stabile Verbindung zur präsynaptischen Endigung. Die Stabilität der Dornenfortsätze korreliert auch mit deren Größe. Je größer der Kopf ist, desto stabiler und langlebiger ist die Synapse (Allison et al., 1998; Kasai et al., 2003).

Je nach Grad der Entwicklung variiert die Morphologie der Dornenfortsätze stark. Es sind allgemein vier Formen klassifiziert worden.

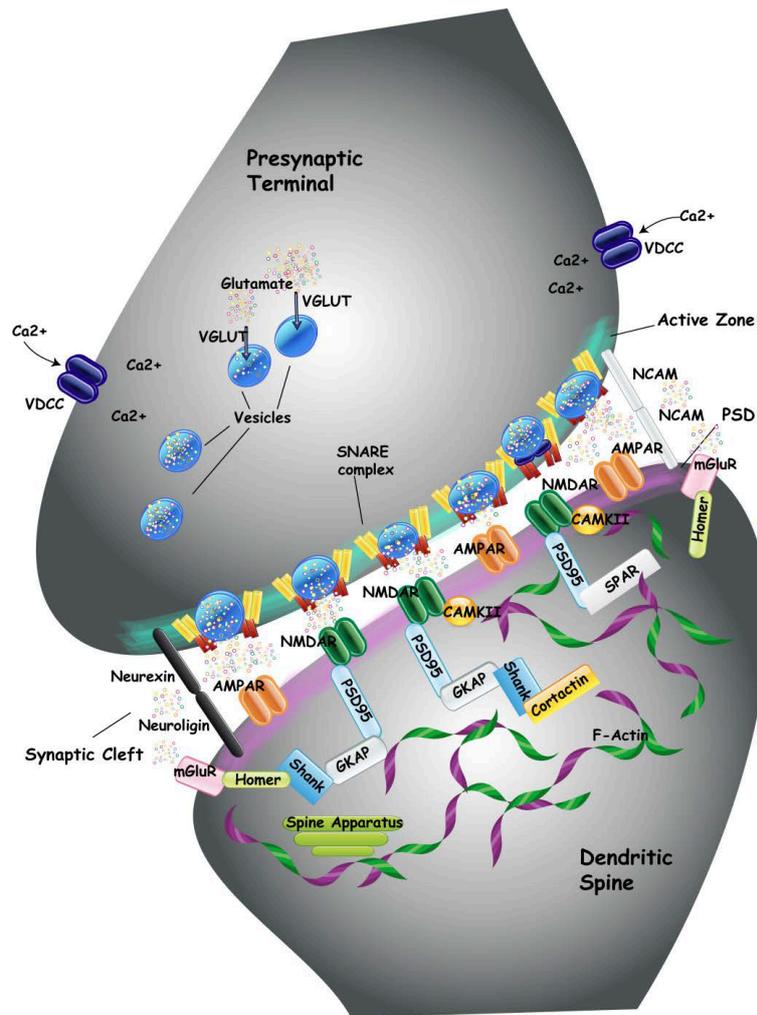
Die *Filopodien* werden als eine Art Vorläufer für reife, stabile Dornenfortsätze angesehen. Sie haben einen langen (2-20µm) und dünnen (<0,3µm im Durchmesser) Körper und sind hauptsächlich in jungen Dendriten aufzufinden. Aufgrund ihrer Form wird ihnen eine explorierende Funktion nachgesagt. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass an reifen Neuronen die *Filopodien* selten auffindbar sind.

Die stummelförmigen Dornen (engl. *stubby spines*) haben keinen deutlich abgrenzbaren Kopf. Sie gehen als Vorwölbung aus den Dendriten hervor (Abbildung 5).

Dünne Dornen (engl. *thin spines*) sind lang und dünn. Ihr schmaler Körper endet in einem kleinen bauchigen Kopf. Sie repräsentieren die häufigste morphologische Form in Prinzipalzellen adulter Nervensysteme.

Die zweithäufigste Form stellen die pilzförmigen Dornen (engl. *mushroom spines*) dar. Ihr voluminöser bauchiger Kopf ist über einen schmalen Hals mit dem Ansatz verbunden. Sie gelten als die stabilsten Dornenfortsätze und stehen im Entwicklungsprozess an letzter Stelle (Holtmaat und Svoboda, 2009; Peters und Kaiserman-Abramof, 1970; Ruan et al., 2008).

Bereits 1888 beschrieb Ramon y Cajal die Existenz der Dornenfortsätze und schloss daraufhin zunächst aufgrund der Oberflächenvergrößerung auf eine mögliche Beteiligung an der Schaffung von synaptischen Kontakten (Ramón y Cajal, 1899). Zudem geht eine weit verbreitete Annahme davon aus, dass die Dornenfortsätze aufgrund ihrer Morphologie zur lokalen Beschränkung biochemischer Signale führen sollen und den elektrischen Impuls isolieren (Yuste, 2010).



**Abbildung 4: Illustration einer exzitatorischen Synapse mit prä- und postsynaptischen Elementen**

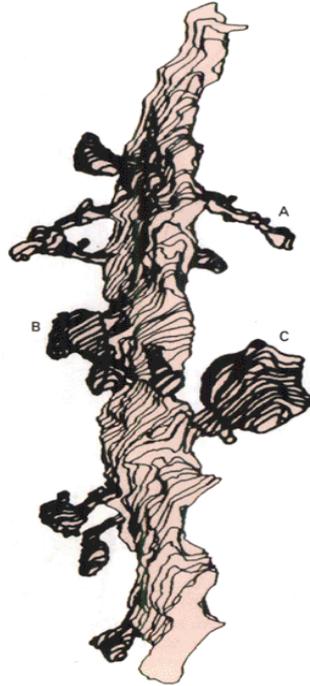
Einige Moleküle der präsynaptischen Endigung eines glutamatergen Axons sowie Elemente der postsynaptischen Dichte sind hier beispielhaft gezeigt. Präsynaptisch wird das Glutamat in Vesikel über den Transporter VGLUT transferiert. In der aktiven Zone triggert Kalzium die Verschmelzung der Vesikel mit der Membran über den SNARE-Komplex. Entlang der postsynaptischen Dichte sind an der Membran des Dornenfortsatzes AMPA- und NMDA-Rezeptoren eingebaut, an welchen das Glutamat bindet. Zudem sind perisynaptisch mGlu-Rezeptoren vorhanden. Einige Proteinstrukturen der postsynaptischen Dichte sind beispielhaft dargestellt, teilweise mit Anbindung an die F-Aktin-Filamente.

AMPA,  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionat Rezeptor - CAMKII, Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II - GKAP, Guanylatkinase-assoziiertes Protein - mGluR, metabotroper Glutamat Rezeptor - NCAM, neurales Zelladhäsions Molekül - NMDAR, N-methyl-D-aspartate Rezeptor - PSD, postsynaptische Dichte - PSD95, postsynaptisches Dichte Protein 95 - SPAR, Dornen-assoziiertes Rap-Gap - VDCC, spannungsabhängiger Kalzium-Kanal - VGLUT, Vesikel Glutamat-Rezeptor.

Aus Foggetti (2014).

Kasai et al. (2003) beschreiben ein wechselseitiges Verhältnis von Struktur, Stabilität und Funktion mit jeweils eindeutigen Rollen beim Lernen und Erinnern. Hierbei sind die stabilen, großen und „schreibgeschützten“ Dornenfortsätze verantwortlich für die Aufrechterhaltung präexistierender Verbindungen, wohingegen die kleineren, auch aufgrund ihrer Wandelbarkeit

zu großen Dornen, die Beschaffung neuer Gedächtnisinhalte ermöglichen. Angesichts ihrer anhaltenden Verstärkung von synaptischen Verknüpfungen kann somit insbesondere den größeren Dornen eine mögliche Korrelation zum Langzeitgedächtnis zugerechnet werden.



**Abbildung 5: Variationen von Dornenfortsätzen auf einem dendritischen Segment**

Auf dieser dreidimensionalen Rekonstruktion sind verschiedene dendritische Dornenfortsätze zu erkennen.

A, Dornenfortsatz vom dünnen Typ (engl. *thin spine*) - B, Dornenfortsatz vom stummelförmigen Typ (engl. *stubby spine*) - C, Dornenfortsatz vom pilzförmigen Typ (engl. *mushroom spine*)

Aus Harris und Stevens (1989).

### 1.3.3 Plastizität GABAerger Interneurone

Obwohl inhibitorische Synapsen essentiell sind für ein regelrechtes Funktionieren des neuronalen Netzwerkes, haben sich die meisten Studien in der Vergangenheit mit Veränderungen an exzitatorischen glutamatergen Synapsen beschäftigt. Erst seit relativ kurzer Zeit sind verschiedene Formen der Plastizität an GABAergen Interneuronen beschrieben worden. Dies liegt eventuell auch an der Heterogenität der Interneurone, die dementsprechend verschiedene Formen der Plastizität zeigen. Zum Beispiel erfolgt die NMDA-abhängige Plastizität eher an dendritischen als an somatischen GABAergen Synapsen (Gaiarsa et al., 2002).

Pérez-Rando et al. (2017) haben die Wirkung von NMDA-Rezeptor-Aktivierungen auf Somatostatin-positive Interneurone im Hippocampus untersucht. Von dieser Interneuronart ist bekannt, dass sie die sonst für Prinzipalzellen typischen Dornenfortsätze besitzt. Sie konnten zeigen, dass 24 Stunden nach Aktivierung die Umsatzrate der Dornenfortsätze an den

Interneuronen anstieg und 48 Stunden danach wieder zum Ausgangswert zurückkehrte. Somit konnte gezeigt werden, dass die NMDA-Rezeptor-Aktivierung mit strukturellen Veränderungen an den Interneuronen einhergeht.

Für Parvalbumin-positive Interneurone im Gyrus Dentatus, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, konnten Hainmüller et al. (2014) zeigen, dass die Ausbildung einer LTP an den exzitatorischen Eingängen dieser Interneurone von metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR5) und der konsekutiven Aktivierung von Proteinkinase C abhängt.

## **1.4 Genetische Werkzeuge**

### Virale Vektoren

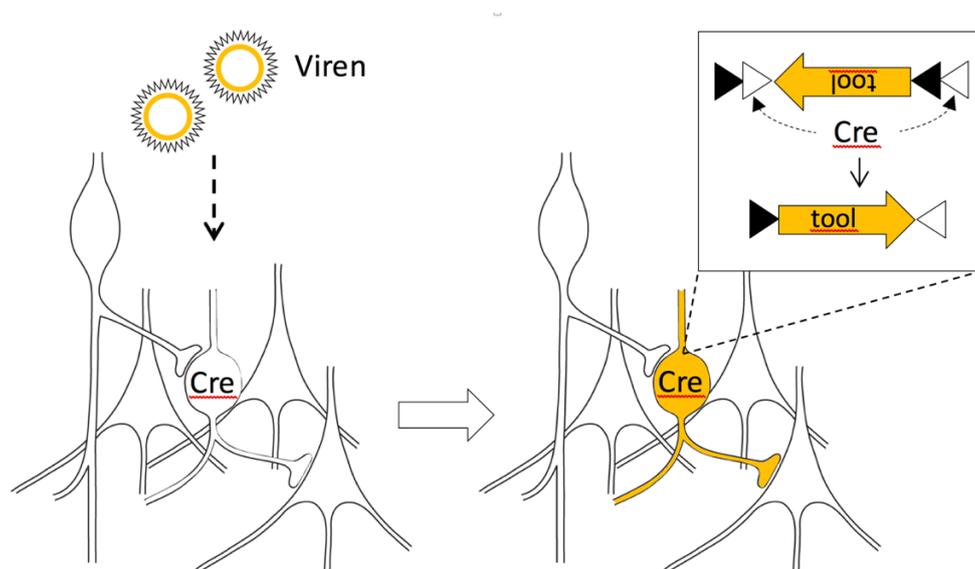
Viren sind infektiöse Partikel mit einfachen DNA- oder RNA-Genomen. Für ihre Reproduktion und ihren Metabolismus sind sie auf den Stoffwechsel der Wirtszelle angewiesen. Seit den 1980er Jahren versuchen Virologen möglichst nicht-toxikologische, rekombinante virale Vektoren zur Gen-Transferierung in Säugerzellen zu entwickeln. Einige virale Vektoren sind diesem Ziel jüngst bereits sehr nahegekommen, darunter die Adeno-assoziierten Viren (AAV) (Osten et al., 2007).

#### **1.4.1 Adeno-assoziierte Viren (AAV)**

AAV gehören zu den Dependoviren und sind somit für die Replikation ihres Genoms abhängig von einem Helfervirus. Dabei handelt es sich meist um Adenoviren, wobei auch die Herpes-simplex-Viren 1 oder Humane Cytomegalieviren (CMV) die benötigten Proteine für die Replikation liefern können. Ihr Genom besteht aus einer EinzelstrangDNA mit einer Größe von 4,7 Kilobasen. Die beiden Gene Rep und Cap, welche die Replikation, virale Transkription und Integration sowie Synthese von Strukturproteinen bewirken, werden von 145 Nukleotiden Sequenzen, den sogenannten invertierten terminalen Sequenzwiederholungen (ITRs) flankiert. In diesen ITRs sind alle wichtigen Elemente für die Replikation enthalten, welche aber nur bei Präsenz des Helfervirus funktionieren. In rekombinanten AAV (rAAV) kann die Kapazität zwischen den ITRs anstelle von Rep und Cap mit einem anderen Gen substituiert werden, welches dann in infizierten Zellen stattdessen exprimiert wird. In der Wirtszelle integrieren sich die AAV Vektoren nicht in das Wirtsgenom und bleiben somit episomal (Osten et al., 2007).

### 1.4.2 Cre/loxP-System

Ein weit verbreitetes Werkzeug in der molekularbiologischen Forschung ist das Cre/loxP-System. Die Cre/loxP-DNA-Sequenz entstammt dem Bakteriophagen P1 und besteht aus 34 Basenpaaren. Acht dieser Basenpaare sind mittig angereiht und werden von 13 Basenpaaren an den Enden flankiert. Das Enzym Cre katalysiert gezielt die Spaltung und Neuverknüpfung von den Basenpaaren der loxP-Enden. Wenn beide loxP-Endsequenzen in gleicher Richtung orientiert sind, schneidet das Enzym das Gen aus dem DNA-Strang heraus. Bei antiparalleler Richtung katalysiert das Enzym die ständige Umkehrung der flankierten DNA-Sequenz (Gorman und Bullock, 2000). Wird das Gen zwischen zwei heterotype antiparallele Paare von loxP-Sequenzen gesetzt, resultiert eine permanente Umkehr der Gensequenz (Murray et al., 2011).



**Abbildung 6: Cre/loxP-System**

Die Cre-Rekombinase (Cre) lässt sich anhand Zelltyp-spezifischer Promoter in definierten Nervenzelltypen exprimieren. Rekombinante Viren werden verwendet für die transgene Expression der molekularen Werkzeuge (tool). Cre wird benötigt, um die kodierende Sequenz des viralen Transgens in die richtige Orientierung für Transkription und Translation zu schalten. Daher erfolgt die Expression des molekularen Werkzeugs nur in den Neuronen, welche Cre-Rekombinase enthalten, obwohl nach Applikation die Viren alle Zellen des Netzwerkes transduzieren. Die schwarzen und weißen Dreiecke in der rechten Abbildung symbolisieren die heterotypen antiparallelen Paare von loxP-Sequenzen.

In viralen rAAV Vektoren können die Gene, die artifiziell exprimiert werden sollen mit heterotypen antiparallelen Paaren von loxP-Sequenzen flankiert werden. Werden diese rAAV anschließend stereotaktisch in Hirnstrukturen von transgenen Mäusen injiziert, die Cre-

Rekombinase unter einem Zell-Typ spezifischen Promoter exprimieren, so kommt es selektiv nur in diesen Zellen und in dieser Hirnregion zur Expression des viralen Transgens (Abbildung 6) (Murray et al., 2011).

## **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Die Ausbildung von langandauernden Gedächtnisinhalten basiert auf der Neuverknüpfung neuronaler Schaltkreise. In den Neurowissenschaften galt lange die Annahme, dass diese strukturelle Plastizität allein zwischen den exzitatorischen Prinzipalzellen stattfindet. Foggetti (2014) konnte in vorangegangenen Arbeiten zeigen, dass auch bestimmte GABAerge Interneurone dendritische Dornenfortsätze besitzen, die als „Hubs“ struktureller Plastizität gelten. Außerdem hat eine kooperierende Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Ausbildung funktioneller Plastizität an diesen Zellen von der Proteinkinase C abhängt.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, mit Hilfe neuer molekularer Werkzeuge die Bedeutung der Proteinkinase C für die Bildung von Dornenfortsätzen und Synapsen an parvalbumin-positiven Interneuronen darzustellen. Es sollte untersucht werden, ob die Formierung von Dornenfortsätzen von der Aktivität der Proteinkinase C abhängig ist und ob eine Einbindung von parvalbumin-positiven Interneuronen in das Netzwerk des Gyrus dentatus dem Verhalten untergeordnet ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien und Lösungen

#### PBS (10x)

1.37 M NaCl, 26.8 mM KCl, 14.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 81 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> bei einem pH-Wert von 7.4 mit 0.1 M NaOH. 1x verdünnt angewendet.

#### PFA 4%

40g Paraformaldehyd wurden 1L dest. H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Der pH-Wert wurde mittels Anwendung von Salzsäure auf 7.3 eingestellt. Die Lösung wurde kurz vor der Perfusion hergestellt, danach gefiltert und kühl gelagert.

#### Polyvinyl Alkohol 4-88 Eindeckmedium (Mowiol)

4.8g Mowiol 4-88, 1.25g 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) und 12g Glycerin wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) vermengt. 12ml von doppelt destilliertem H<sub>2</sub>O wurden dann hinzugefügt und für 3 Stunden bei RT angerührt. Als nächstes wurden 24ml von 0.2M TrisHCl (pH 8.5) bei einer Temperatur von 50°C hinzugefügt und verrührt bis sich das Mowiol komplett aufgelöst hat. Daraufhin wurde die Lösung bei 5000 x g für 15min zentrifugiert und die Überstände entfernt. Die Teilportionen wurden bei -20°C gelagert.

### 2.2 Tierversuche

Alle durchgeführten Versuche entsprachen den ethischen Richtlinien der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Adulte (7-10 Wochen alt) heterozygote PV-Cre Mäuse (genetischer Hintergrund C57BL/6) beider Geschlechter wurden für die Experimente eingesetzt (B6;129P2-Pvalbtm1(cre)Arbr/J The Jackson Laboratory JAX stock #008069 (Hippenmeyer et al., 2005)). Diese durchliefen individuell einen 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus und hatten *ad libitum* Zugang zu Wasser und Nahrung.

#### Enriched environment

Für stimulierende Umwelteinflüsse sind die Mäuse der *enriched* Gruppe eine Woche lang in Käfigen mit anderen Mäusen gehalten worden, um eine soziale Interaktion zu ermöglichen. Männliche Mäuse wurden mit Wurfgeschwistern zusammengesetzt, während die Weibchen auch mit nicht verwandten Mäusen gehalten wurden. Im angereicherten Käfig betrug die Größe 80cm x 45cm x 25cm (BxTxH). Folgende Objekte befanden sich im Käfig: Treppen, Laufrad,

rotes Plastikhäuschen, Tunnel, Holzsäulen zum Klettern etc. (Abbildung 7). Diese sind täglich ausgewechselt oder umgesetzt worden. Wegen der kurzen Verweildauer ist die Streu nicht ausgetauscht worden. Die Kontrollgruppen wurde jeweils einzeln in Standardkäfigen der Größe 40cm x 20cm x 15cm gehalten. Diese Käfige enthielten lediglich Streu, Wasser und Futter.



**Abbildung 7: Beispiel eines *enriched* Käfigs**

Das Bild zeigt beispielhaft ein Käfig aus der *enriched* Gruppe. Verschieden Objekte sind erkennbar, welche täglich versetzt oder ausgetauscht wurden.

### **2.3 Generierung der Adeno-assoziierten Viren (AAV)**

Für das vorliegende Projekt wurden FLEX-GFP (Murray et al., 2011) und FLEX-PKCi-GFP verwendet. Die Produktion erfolgte durch Mitarbeiter des physiologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Die PKC Pseudosubstrat Sequenz (Arg-Phe-Ala-Arg-Lys - Gly- Ala - Leu - Arg- Gln - Lys -Asn – Val / RFARKGALRQKNV) korrespondiert zu den Residuen 19 bis 36 der regulierenden Domäne von PKC (De Zeeuw et al., 1998; House und Kemp, 1987). Zwei synthetische Oligonukleotide (50-mer / 5' phosphoryliert: ggccAGGTT-CGCCAGGAAGGGCGCCCTGAGGCAGAAGAACGTGTAAagct und 42-mer / 5' phosphoryliert:

TTACACGTTCTTCTGCCTCAGGGCGCCCTTCCTGGCGAACCT; produziert von Sigma) wurden hybridisiert, um die DNA Sequenz kodierend für das PKC Inhibitor Peptid herzustellen (RFARKGALRQKNV (PKCi)).

Das DNA-Fragment kodierend für PKCi wurde gemeinsam mit EGFP und T2A Sequenzen, 3' zu den EGFP-T2A Sequenzen in den pAM-Flex Vektor geklont. Das resultierende Konstrukt (pAM-Flex-EGFP-T2A-PKCi) wurde in AAV1/2 Kapside verpackt. Somit sollten Cre-exprimierende PV-positive Neurone, welche infiziert waren mit AAV1/2-Flex-EGFP-T2A-PKCi gleichzeitig EGFP und PKCi Peptide in äquimolarem Verhältnis exprimieren. Cre-negative Zellen sollten kein PKCi exprimieren.

Bezüglich weiterer Details zur Herstellung und der Ermittlung des Titers verweise ich auf McClure et al. (2011).

## **2.4 Stereotaktische Injektion**

Um eine hohe Genauigkeit bei der Injektion zu erreichen, wurde ein stereotaktischer Hirneingriff vorgenommen. Die Mäuse wurden vor dem Eingriff einzeln unter einem 12-Stunden-Licht/12-Stunden-Dunkelheit Zyklus gehalten. Die Injektion erfolgte in der Lichtphase. Zunächst wurden die Mäuse durch die Inhalation von 3% Isofluran in O<sub>2</sub> anästhesiert. Die Anästhesie wurde dann während der OP bei 2% aufrechterhalten. Die Mäuse wurden anschließend in einem stereotaktischen Rahmen (Stoelting) fixiert. Prä- und postoperativ wurde ein Analgetikum (Temgesic, Schering-Plough) mit einer Dosierung von 0.3mg/kg KG verabreicht. Es erfolgte eine Inzision der Kopfhaut und der Schädelknochen wurde freigelegt, nachdem vorher mit einer Pinzette zur Prüfung der Anästhesietiefe eine Pfote für den Reflextest gekniffen wurde. Die anatomischen Punkte Bregma und Lambda wurden als Referenzpunkte verwendet und es wurden entsprechend der Koordinaten für die Injektionsstelle Punkte auf die Kalotte projiziert, wo mit Hilfe eines zahnmedizinischen Bohrers (Microtorque II mit Tech2000 Handbohrer, Aufsatz 0,5mm) kleine Löcher bis zur Dura mater gebohrt wurden. Daraufhin erfolgte die Einführung der Virus-beladenen Glaspipette (VWR, 8µm Durchmesser) bis zur errechneten Tiefe und schließlich die Injektion der rAAV (  $1 \times 10^7$  infektiöse Partikel pro ml). Jeweils 1µl wurde bilateral in den Gyrus dentatus mit folgenden Koordinaten abgegeben (in mm): AP -1.9, lateral  $\pm 1.1$  und DV 2.1. Nach der Injektion wurde die Pipette für 5 Minuten an der Einstichstelle belassen, um einen Rückstrom zu vermeiden. Das Bohrloch wurde nach dem Entfernen der Pipette mit Knochenwachs aufgefüllt und die Wunde mit Gewebekleber (Vetbond tissue adhesive, 3M) verschlossen. Um eine maximale virale Expression sicherzustellen, konnten die

Mäuse sich schließlich postoperativ 10 Tage erholen, bevor weitere Experimente durchgeführt worden sind.

## 2.5 Gewebentnahme und Immunhistologie

Die Mäuse wurden anhand intraperitonealer Injektion mit Narcoren (Boehringer Ingelheim, 0.3ml, 0.16g/ml, pro 30g Körpergewicht) eingeschlafert. Ob eine ausreichende Narkotisierung vorlag, wurde durch Reflextests kontrolliert. Dem folgte die Eröffnung des Thorax sowie anschließende transkardiale Perfusion mit PBS (pH 7.4) für 4 Minuten, gefolgt von 4% PFA in PBS für 10 Minuten, um eine ausreichende Gewebefixierung herbeizuführen. Daraufhin wurden die Gehirne entnommen und diese sind dann in 4% PFA über Nacht bei 4°Celsius postfixiert worden. Hiernach erfolgte die Einbettung in 4% Agar mit PBS. An einem Vibratom (Leica VT1200S) wurden 80µm dicke koronale Schnitte angefertigt.

Die Schnitte wurden zunächst für die immunhistologische Färbung mit 0.4% Triton X-100 in PBS für 30 Minuten permeabilisiert. Um nicht-spezifische Bindungsstellen zu blocken, wurde folgende Pufferlösung eingesetzt: 0.2% Triton X-100, 4% normales Ziegen Serum (NGS) und 0.01% Natriumazid in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Primäre Antikörper wurden in PBS mit 2% NGS, 0.01% Natriumazid und 0.1% Triton X-100 verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Folgende primäre Antikörper wurden verwendet:

Antikörper	Bezugsquelle	Ursprung	Verdünnung
Monoklonal anti-GFP	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	Maus	1:1000
Polyklonal anti-GFP	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	Kaninchen	1:1000
Polyklonal anti-PV	Swant, Marly, Schweiz	Kaninchen	1:2000
Polyklonal anti-PSD95	Abcam, Cambridge, UK	Kaninchen	1:2000
Polyklonal anti-VGLUT1	Merck, Darmstadt, Deutschland	Meerschweinchen	1:5000

Die Schnitte wurden anschließend 3 Mal für jeweils 10 Minuten in PBS mit 1% NGS bei Raumtemperatur gewaschen und mit den sekundären Antikörpern sowie 1.5% NGS für 3 Stunden inkubiert. Folgende sekundäre Antikörper wurden verwendet:

<b>Antikörper</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Verdünnung</b>
Alexa-Flour 488 anti-mouse	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	Ziege	1:1000
Alexa-Flour 488 anti-rabbit	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	Ziege	1:1000
Cy3 anti-rabbit	Jackson Immuno-Research, Cambridge, UK	Ziege	1:1000
Cy5 anti-guinea pig	Jackson Immuno-Research, Cambridge, UK	Ziege	1:500

Abschließend wurden die Schnitte 2 Mal in PBS mit 1% NGS und 2 Mal in PBS für jeweils 10 Minuten gewaschen. Nach kurzem Waschen in destilliertem Wasser sind die Schnitte auf Superfrost Objektträger (VWR International) aufgezogen worden und mit Polyvinyl Alkohol 4-88 (Mowiol) unter Deckgläsern (Sigma) eingedeckelt.

## **2.6 Bildgebung**

Es wurden nur immunhistologisch angefärbte Neurone verwendet, bei denen der gesamte Dendritenbaum in Kontinuität mit den Zellsomata darstellbar war.

Für die Aufnahme fluoreszierender dendritischer Dornenfortsätze wurde ein Zeiss Axio-Imager M2 Mikroskop mit Apotome-Funktion mit einem Plan-Apochromat Öl-Immersion-Objektiv (63-fache Vergrößerung, numerische Apertur 1,4; Zeiss) verwendet. Es wurden Bildstapel aus 100-150 Schichten zu je 0.1-0.3µm Dicke aufgenommen. Das Bild wurde mit der Software ZEN 2011 (Zeiss) in zwei bis vier Kacheln pro Z-Ebene aufgeteilt, um das Neuron in seiner X/Y-Ausdehnung vollständig aufnehmen zu können.

Die Aufnahme der prä- und postsynaptischen Marker (PSD95 und VGLUT1) erfolgte mit Hilfe eines Konfokalmikroskops LSM510 (Zeiss) mit einem Öl-Immersion-Objektiv (40-fache Vergrößerung, numerische Apertur 1,4; Zeiss). Die passenden Software LSM 5 von Zeiss wurde

im „Expert Mode“ verwendet. Die Z-Achse der Bildstapel bestand aus 100-150 Schichten zu je 0.3µm Dicke und die Pinhole war auf 1 AU eingestellt. Es wurden insgesamt vier Bilder pro Neuron angefertigt. Im ersten Bild erfolgte eine Totalaufnahme des Neurons samt Dendritenbaum mit dem Laser Tunable Argon 488. Anhand der *Crop*-Funktion wurde dann die *region of interest* ausgewählt, woraufhin drei weitere Aufnahmen der inneren, mittleren und äußeren Molekularschicht mit den Lasern Tunable Argon 488nm (30mW), Helium-Neon 543nm (1mW) und Helium-Neon 633nm (3mW) aufgezeichnet wurden.

## 2.7 Software Analyse

Alle erfassten Bilder wurden zunächst in dem Format .czi (12bit) gespeichert. Für die Analyse der Dornenfortsätze wurden die entsprechenden Bilder anschließend mit NeuronStudio (CNIC) in das Format .tiff (8bit) konvertiert. Dabei wurde die Skalierung pro Pixel übernommen, um einheitliche Ergebnisse zu erhalten.

### Dendriten und Dornenfortsätze

Die halbautomatische Software NeuronStudio wurde entsprechend publizierter Protokolle (Wearne et al., 2005; Rodriguez et al., 2008) benutzt, um die Länge und Weite der Dendriten sowie Anzahl und Durchmesser der Dornenfortsätze dreidimensional zu erfassen. Zudem kann die Software zwischen den morphologischen Typen der Dornenfortsätze unterscheiden. Die Bilder werden zwar auch in der Z-Achse erfasst, jedoch als ein konventionelles zweidimensionales Bild angezeigt. Anhand der vorher festgelegten Voxel-Dimensionierungen konnten konstant vergleichbare Ergebnisse gesammelt werden.

Nach der Festlegung eines Startpunktes erfasste die Software automatisch den weiteren Verlauf des Dendriten. Dieser wurde sodann manuell kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert, da teilweise auch Dendriten von anderen Neuronen fälschlicherweise erfasst wurden, wenn diese den Weg kreuzten (Abbildung 11).

Für die Analyse der Dornenfortsätze wurde zunächst die automatische Detektion der Software benutzt. Anschließend wurde manuell das Ergebnis kontrolliert, da die Software sowohl falsch positive wie auch falsch negative Ergebnisse lieferte. Ebenso wurden die Dornenfortsätze, die auf der Z-Achse lagen, entfernt (Abbildung 12). Folgende Parameter wurden zur Detektion benutzt: Dornenfortsatz-Höhe zwischen 0.2-3µm, maximale Weite von 3µm, minimales Volumen von 5 Voxeln. Anschließend wurde die durchschnittliche Anzahl an Dornenfortsätzen pro

Mikrometer entlang der longitudinalen Achse der Dendriten als Dornenfortsatz-Dichte ausgerechnet.

Für die morphologische Klassifizierung der Dornenfortsätze wurden folgende Einstellungen festgelegt: Wenn das Kopf-Hals-Durchmesser-Verhältnis größer als 1.1 war: *thin* oder *mushroom*. Wenn das Kopf-Hals-Durchmesser-Verhältnis kleiner als 1.1 war: *thin*. Wenn das Längen-Kopf-Durchmesser-Verhältnis größer als 2.5 war: *stubby*. Dornenfortsätze, die ein Kopf-Hals-Durchmesser-Verhältnis größer als 1.1 zeigten, wurden als *mushroom* klassifiziert, wenn der Kopfdurchmesser größer als 0.35  $\mu\text{m}$  war.

### Analyse der Synapsen und dreidimensionale Rekonstruktion

Um die synaptischen Verbindungen zu quantifizieren, wurde die Software IMARIS (BitPlane) verwendet. Mit dieser Software konnten die Dendriten, gemäß bekannter Protokolle, semiautomatisch nach vorhandenen synaptischen Kontakten untersucht werden (Belmer et al., 2017; Fogarty et al., 2013). Hierfür ist als erster Schritt das Werkzeug „Create Surface“ benutzt worden. Dadurch konnte eine passende Oberfläche erzeugt werden, welche sich dazu eignet, die postsynaptische von der präsynaptischen Domäne abzugrenzen. Um artifizielle Uniformitäten zu verhindern, wurde „smoothing“ deaktiviert. Die zu untersuchende Region wurde mittels „Region of Interest“ eingegrenzt. Die Funktion „Background Subtraction“ wurde aktiviert, damit störende Hintergrundfärbungen subtrahiert werden, da die Schnitte mit 80 $\mu\text{m}$  relativ dick waren. Danach wurde das Spektrum des *Green Fluorescent Proteins* (GFP) festgelegt, wodurch ein Schwellenwert entstand, bei dem viel vom Neuron erkennbar war, aber auch gleichzeitig wenig störende Hintergrundsignale vorhanden waren. Die Funktion „Number of Voxels“ wurde auf das Maximum gesetzt. Anschließend wurden die prä- und postsynaptischen Farbkanäle mit der Funktion „Add Spot“ (Cy5 für VGLUT1 und Cy3 für PSD95) separat gefiltert. Dies beinhaltete auch das Entfernen von jeglichen präsynaptischen Signalen (Cy5) innerhalb der Dendriten und postsynaptischen Signalen (Cy3) außerhalb der Dendriten. Dafür wurde die Funktion „Set voxels inside surface to 0.0“ und respektive „...outside...“ angewendet. Der minimale Durchmesser für PSD95 wurde auf 0.5 $\mu\text{m}$  und für VGLUT1 auf 0.6 $\mu\text{m}$  festgelegt, entsprechend der aus der Literatur bekannten Werte (Belmer et al., 2017; Fogarty et al., 2013; Kim und Sheng, 2009; Kitahara et al., 2016). Mit dem Werkzeug „Colocalize Spots“ wurden darauffolgend alle Cy3- und Cy5-Signale dargestellt, welche eine maximale Entfernung von 1 $\mu\text{m}$  zueinander hatten. Diese Entfernung liegt innerhalb der Begrenzung (0.7-2.5 $\mu\text{m}$ ), die sich in zahlreichen Studien zur synaptischen Morphologie mit ähnlichen Methoden etabliert hat (Fogarty et al., 2013). Diese Signale wurden schließlich mit dem Werkzeug „Measuring Points“

quantifiziert, woraus sich die Anzahl der Synapsen für das dargestellte Neuron ergab. Die ermittelten Werte wurden tabellarisch in Microsoft Excel aufgelistet und statistisch analysiert.

## **2.8 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung wurde die Version 6 der Software GraphPad Prism benutzt. Die gesammelten Daten wurden mittels eines ungepaarten Student t-Test analysiert. Lag ein p-Wert von unter 0.05 vor, wurde dieser als signifikant gewertet. Bei allen Graphen ist der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes zu sehen. Der nicht-parametrische Kolmogorov-Smirnov-Test wurde benutzt, wenn die Daten nicht normal verteilt waren. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen ist one-way ANOVA als Testmethode benutzt worden. Der Chi-Quadrat-Test wurde eingesetzt, um die Verteilungen zu vergleichen.

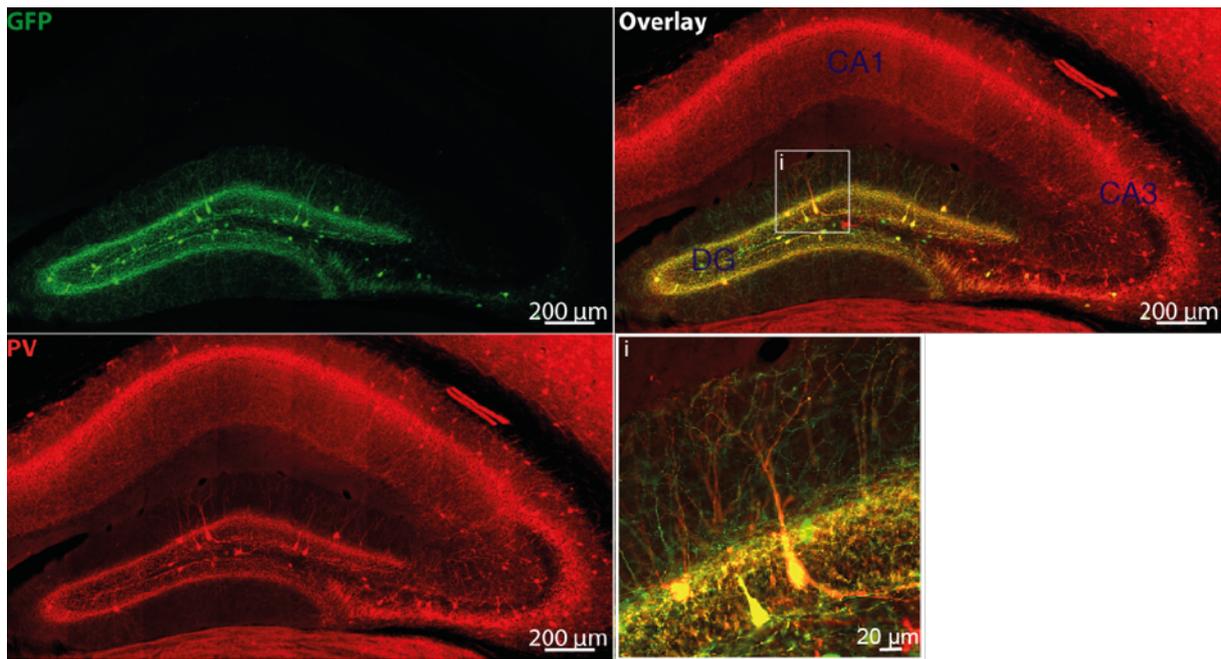
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Spezifität des genetischen Werkzeugs

Um die Bedeutung der PKC für die Ausbildung von Dornenfortsätzen und synaptischen Verbindungen in parvalbumin-positiven Neuronen des Gyrus dentatus zu untersuchen, wurde von Frau Dr. Balueva eine Virus-basierte Zell- und Regionen-spezifische Methode zur Inhibition von PKC entwickelt. Die Methode basiert darauf, dass die PKC-Aktivität sehr effektiv und spezifisch über ein 13 Aminosäuren langes Pseudosubstrat (PKCi) geblockt werden kann, welches alle PKC-Isoformen gleichermaßen inaktiviert (De Zeeuw et al., 1998; House und Kemp, 1987). Dieses Pseudosubstrat wurde über eine 2A-Peptid-Schnittstelle mit GFP verbunden und mit invertiertem Leserahmen zwischen zwei heterotype antiparallele Paare von loxP-Stellen (FLEX; siehe Material und Methoden) eingesetzt, um daraus AAV-PKCi-GFP herzustellen. Wird nun eine Zelle mit diesem Virus transduziert, die Cre-Rekombinase enthält, werden beide Peptide in stöchiometrischem Verhältnis exprimiert. Das heißt die Zelle leuchtet grün und die Substratbindungsstelle für die Proteinkinase C ist blockiert. Ist keine Cre-Rekombinase vorhanden, werden weder PKCi noch GFP exprimiert. Als Kontroll-Virus diente ein AAV, das nur GFP in Abhängigkeit von Cre-Rekombinase exprimiert (AAV- GFP). Somit würden transduzierte Zellen grün fluoreszieren.

Eine Voraussetzung für das Experiment war es, dass die stereotaktische Injektion Cre-Rekombinase-abhängiger AAV in den Gyrus dentatus von transgenen Mäusen, die Cre-Rekombinase unter dem Parvalbumin Promoter exprimieren, ausschließlich in parvalbumin-positiven Neuronen zur Expression des viralen Transgens führt. Dies wurde zunächst überprüft, indem koronale Schnitte des Hippocampus injizierter PV-Cre Mäuse mittels Doppelimmunfluoreszenz gegen GFP und Parvalbumin untersucht wurden (Abbildung 8).

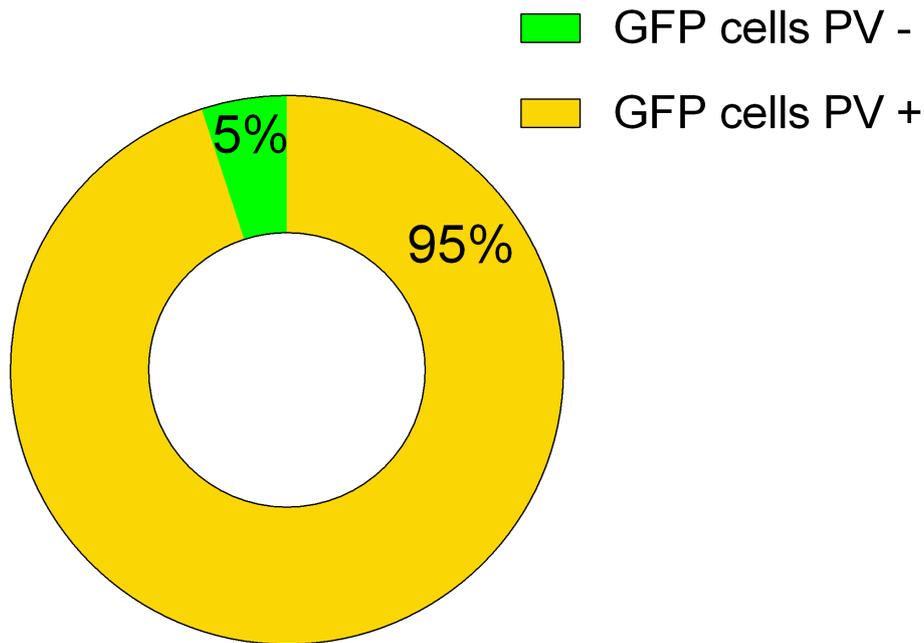
Die Auswertung von 318 GFP-positiver Zellen aus 15 Schnitten von drei Mäusen ergab, dass 95% der GFP-positiven Neurone parvalbumin-positiv und nur 5% parvalbumin-negativ waren (Abbildung 8 und 9). Eventuell liegt der tatsächliche Wert parvalbumin-positiver Zellen noch höher, da die Expressionsspiegel von Parvalbumin unterhalb der Detektionsschwelle der Immunhistologie liegen könnten.



**Abbildung 8: Spezifität der verwendeten AAVs.**

In allen Bildern ist jeweils ein Gyrus dentatus abgebildet nach Infektion mit AAV-PKCi-GFP. Aufgenommen mit einem Apotome-Mikroskop. Maßstab-Linie 200µm (GFP, PV, Overlay) bzw. 20µm (i). **GFP** zeigt die Strukturen, welche nach immunhistologischer anti-GFP Färbung erkennbar sind. **PV** zeigt Strukturen nach anti-parvalbumin Färbung. Im **Overlay** sind beide Färbungen zusammengefügt erkennbar. Cornu ammonis 1 und 3 (CA1 und CA3) sowie der Gyrus dentatus (DG) sind zu sehen. **i** zeigt eine vergrößerte Aufnahme des im Overlay umrahmten Bereiches.

Die Wirksamkeit des PKCi-Peptids wurde durch elektrophysiologische Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Marlene Bartos am Physiologischen Institut in Freiburg untersucht. Nach Injektion von AAV-PKCi-GFP in den Gyrus dentatus von PV-Cre Mäusen verhinderte die Expression von PKCi in parvalbumin-positiven Interneuronen die Induktion von LTP vollständig.



**Abbildung 9: Verteilung der GFP-positiven Neurone nach Parvalbumin-Expression**

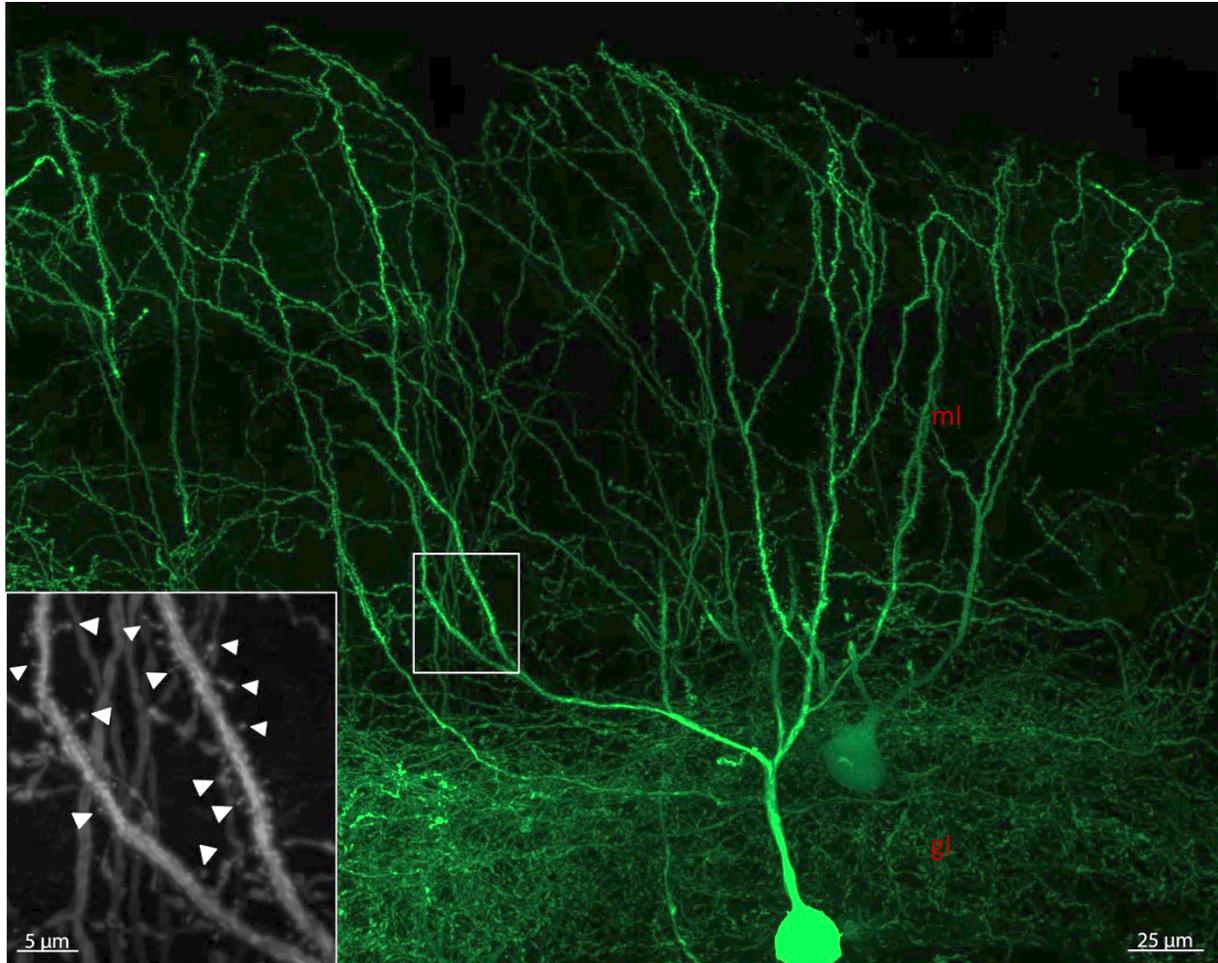
Das Ringdiagramm veranschaulicht die Verteilung von GFP-positiven Zellen aufgeteilt nach parvalbumin-positiv (PV+) und parvalbumin-negativ (PV-). 95% der Zellen waren parvalbumin-positiv (gelb), 5% parvalbumin-negativ (grün).

### 3.2 Dichte der Dornenfortsätze

Nachdem die selektive Expression und die Effizienz der viralen Vektoren bestätigt worden waren, sollten die Auswirkungen der PKC-Blockade auf die Ausbildung dendritischer Dornenfortsätze parvalbuminerner Neurone im Gyrus dentatus unter Basalbedingungen und nach „enriched environment“ untersucht werden. Die Versuchstiere wurden auf insgesamt vier Kohorten aufgeteilt:

- 1.) 3 Mäuse mit Expression von nur GFP in parvalbumin-positiven Interneuronen des Gyrus dentatus (PV-GFP-Kontrollmäuse-HK) im Haltungskäfig zur Kontrolle. Diese Tiere dienten der „Baselinebestimmung“.
- 2.) 4 Mäuse mit Expression von PKCi + GFP in parvalbumin-positiven Interneuronen des Gyrus dentatus (PV-PKCi-Mäuse-HK) im Haltungskäfig. An diesen Mäusen wurde untersucht, welche Auswirkung die PKC-Blockade auf die Zahl der Dornenfortsätze unter basalen Bedingungen im Haltungskäfig hat.
- 3.) 3 Mäuse mit Expression von nur GFP in parvalbumin-positiven Interneuronen des Gyrus dentatus (PV-GFP-Kontrollmäuse-EE) im „enriched environment“ zur Induktion struktureller Plastizität.

- 4.) 3 Mäuse mit Expression von PKCi + GFP in parvalbumin-positiven Interneuronen des Gyrus dentatus (PV-PKCi-Mäuse-EE) im „enriched environment“ zur Induktion struktureller Plastizität bei gleichzeitiger Inhibition von PKC.



**Abbildung 10: Beispiel eines GFP-markierten Neurons im Gyrus dentatus**

Beispiel für ein intaktes Neuron als 12bit ZEN-Bild, welches für die Analyse verwendet wurde. Aufgenommen mit einem Zeiss Axio-Imager Mikroskop. Erkennbar ist das Zellsoma mit dem abgehenden Dendritenbaum. **ml** steht für *stratum moleculare* und **gl** für *stratum granulare*. Maßstab-Linie 25µm. Unten links ist eine Vergrößerung des in der großen Abbildung umrahmten dendritischen Segments gezeigt. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf Dornenfortsätze, die von den Dendriten ausgehen. Maßstab-Linie 5µm.

Über eine stereotaktische Injektion erhielten 7 Mäuse AAV-PKCi-GFP und 6 Mäuse AAV-GFP jeweils 1µl bilateral in den Gyrus dentatus entsprechend der Koordinaten AP -1.9, lateral ±1.1 und DV 2.1.

Die Mäuse aus den beiden EE-Gruppen wurden in einem *enriched environment* gehalten, was bedeutet, dass sie stimulierenden Umwelteinflüssen ausgesetzt waren. Die Mäuse aus den beiden HK-Gruppen wurden jeweils in einem Standardkäfig ohne soziale Interaktionen gehalten.

Nach 7 Tagen wurden die Mäuse mittels intraperitonealer Injektion von Narcoren eingeschläfert und es erfolgte nach transkardialer Perfusion mit PBS und PFA die Entnahme der Gehirne, welche dann postfixiert und eingebettet wurden. An einem Vibratom wurden anschließend 80µm dicke Schnitte von der Bregma-Position -0.94mm AP bis -4mm AP angefertigt.

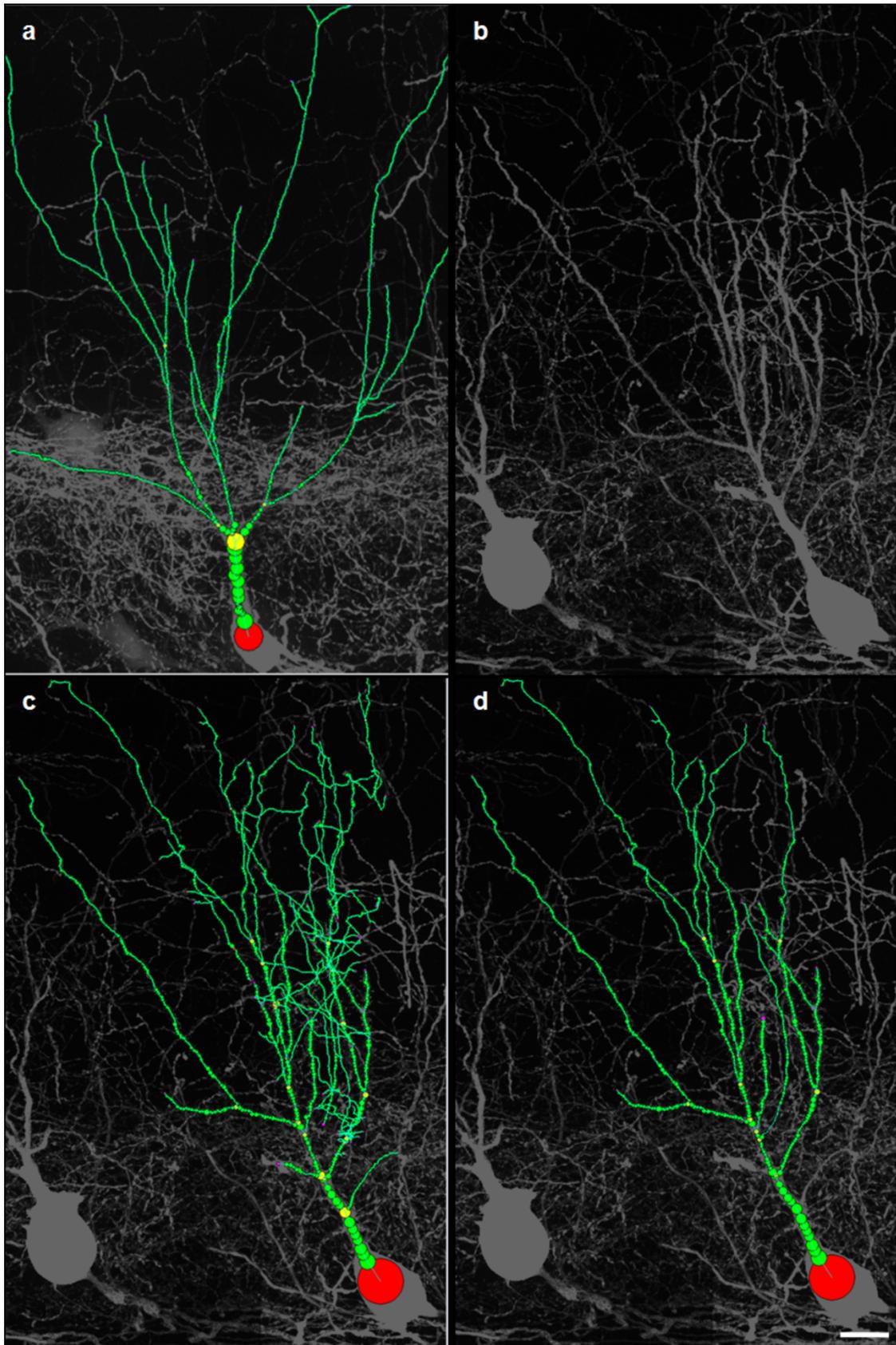
Die Schnitte wurden für die immunhistologische Färbung zunächst mit den spezifischen primären Antikörpern behandelt und am nächsten Tag mit den jeweiligen sekundären Antikörpern inkubiert. Nach den abschließenden Waschungen sind die Schnitte auf Deckgläsern eingedeckelt worden.

Mit einem Zeiss Axio-Imager M2 Mikroskop mit Apotome-Funktion und einem Plan-Apochromat Öl-Immersionsobjektiv (63-fache Vergrößerung) wurden die dendritischen Dornenfortsätze aufgenommen. Hierauf sind die Bilder mit der Software ZEN 2011 (Zeiss) aufgeteilt worden, um diese in der vollständigen Ausdehnung aufnehmen zu können (Abbildung 10).

Nach anschließender Konvertierung des Formats von .czi (12bit) zu .tiff (8bit) wurden die Bilder mit der halbautomatischen Software NeuronStudio (CNIC) analysiert. Zunächst wurde nach Festlegung eines Startpunktes der weitere Verlauf des Dendriten automatisch erfasst und diese dann manuell korrigiert (Abbildung 11).

Hiernach erfolgte eine automatische Detektion der Dornenfortsätze, welche daraufhin ebenfalls manuell kontrolliert und korrigiert wurden (Abbildung 12). Anhand festgelegter Parameter wurde die durchschnittliche Anzahl an Dornenfortsätzen pro Mikrometer entlang der longitudinalen Achse der Dendriten als Dornenfortsatz-Dichte ausgerechnet. GFP-positive Neurone wurden aus der Analyse entfernt, wenn 1. das Zellsoma nicht erkennbar war; 2. nur kleine Anteile des Dendritenbaums erfassbar waren und 3. die Dendriten von einer Vielzahl von anderen benachbarten GFP-positiven Dendriten und Axone gekreuzt wurden.

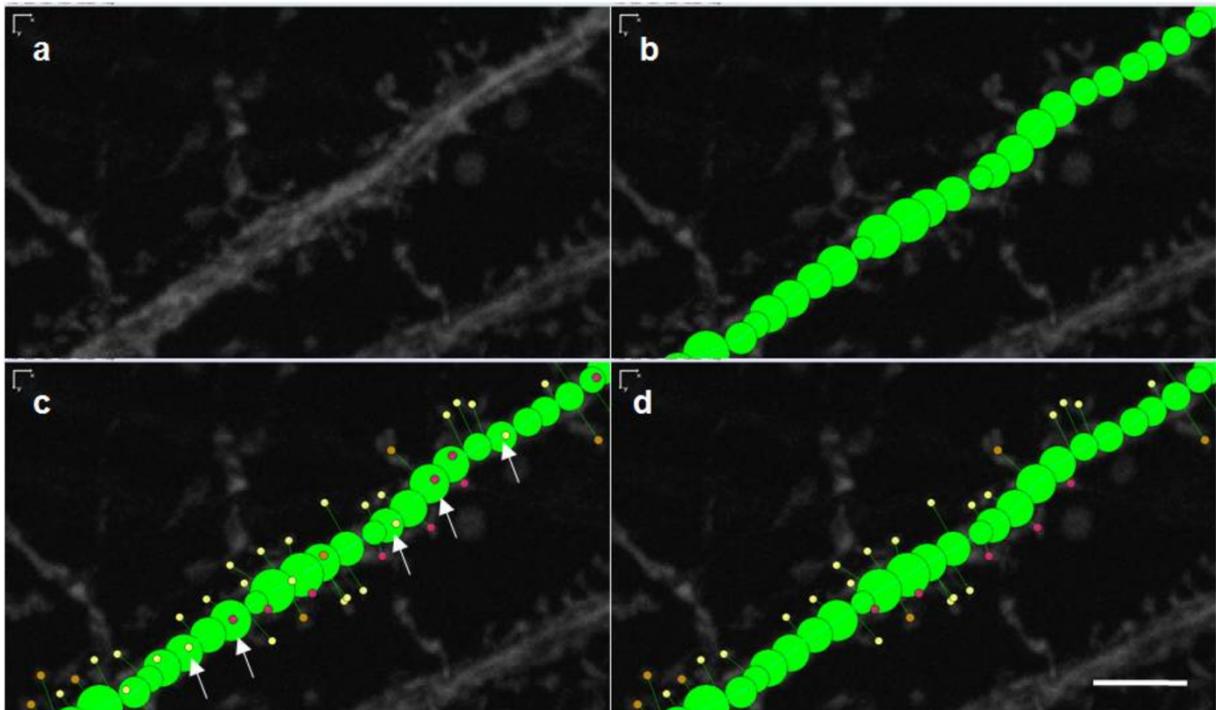
Ein dendritisches Segment galt als *spiny*, wenn der Schwellenwert von 0.02 Dornen/µm überschritten wurde. Abbildung 10 zeigt beispielsweise die gelungene Darstellung eines transduzierten parvalbumin-positiven Interneurons samt Dendritenbaum. Für weitere Informationen zum Vorgehen verweise ich auf das Kapitel 2 (Material und Methoden).



**Abbildung 11: Erfassung eines GFP-positiven Neurons in NeuronStudio**

**a** Beispiel eines automatisch detektierten GFP-positiven Neurons. Der Dendritenbaum ist deutlich vom Hintergrund isolierbar, wodurch die Software automatisch den korrekten Verlauf darstellen kann. **b** Beispiel eines

anderen GFP-positiven Neurons. Hierbei kreuzen Axone und Dendriten anderer Neurone den Dendritenbaum. **c** Automatische Erfassung des Neurons aus **b** resultiert in fälschlicher Rekonstruktion der dendritischen Verzweigungen, da externe Filamente von der Software ebenfalls dem Neuron zugeordnet werden. **d** Manuelle Korrektur der Erfassung des Neurons aus **b** und **c** ermöglicht korrekte Rekonstruktion der Verzweigungen. Rote Kreise stellen das Soma dar, grüne Kreise repräsentieren dendritische Segmente, gelbe Kreise kennzeichnen Verzweigungspunkte und violette Kreise markieren das Ende eines Segments. Maßstab-Linie 20 $\mu$ m.

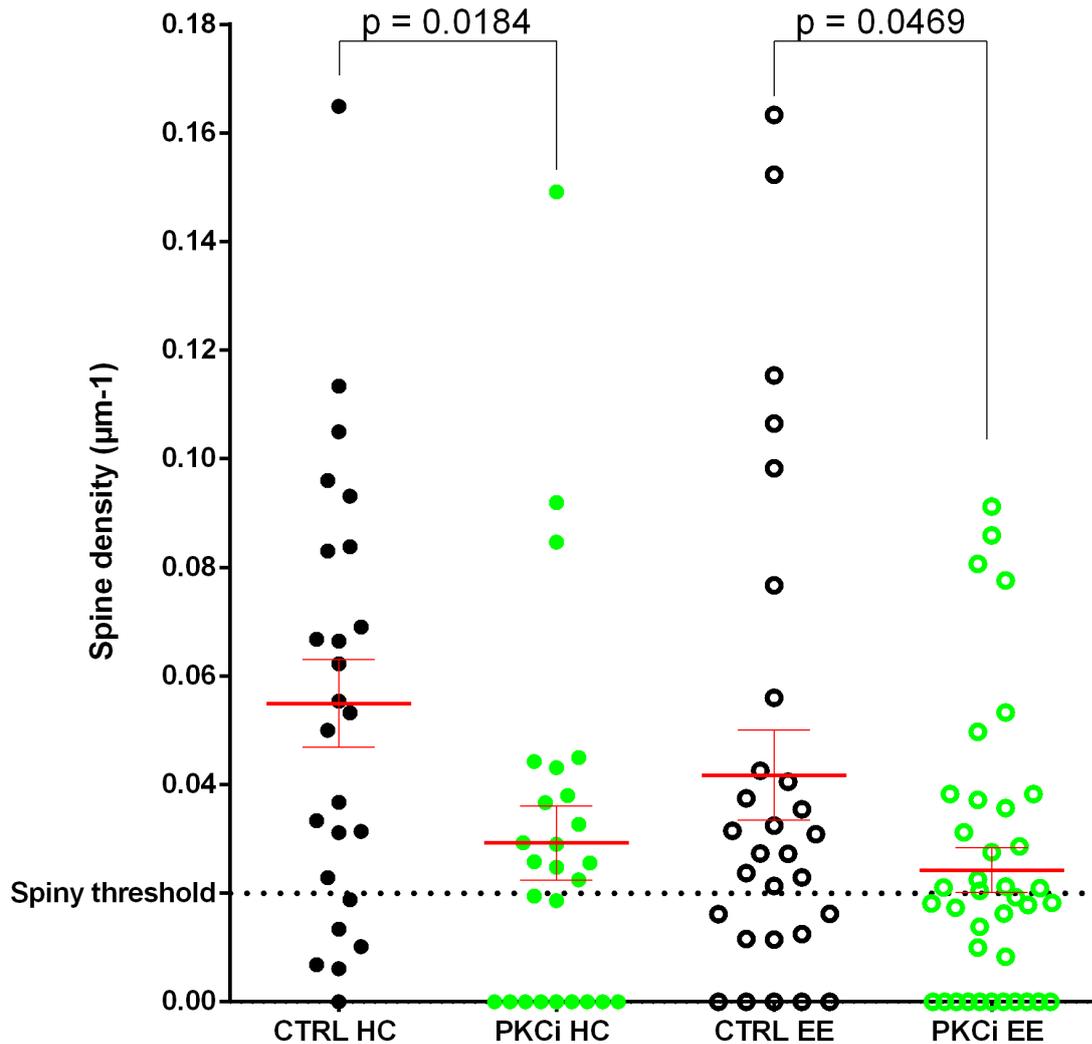


**Abbildung 12: Beispiel der Dornenfortsatz-Detektion mit NeuronStudio**

Vergrößerte Darstellung eines GFP-positiven dendritischen Segments,

**a** nach Konvertierung zu 8bit, TIFF Format. **b** Erfassung des Dendriten. **c** Automatische Erfassung der Dornenfortsätze entlang des Segments. Die Pfeile zeigen Dornenfortsätze, welche den Dendriten auf der Z-Achse aufliegen. Farbliche Unterschiede stehen für verschiedene Morphologie. **d** Manuelle Entfernung der der Z-Achse aufliegenden Dornenfortsätze. Maßstab-Linie 5 $\mu$ m.

Die Analyse und statistische Auswertung der Kohorten ergab eine signifikant niedrigere Dichte der Dornenfortsätze bei den beiden Kohorten, welche mit AAV-PKCi-GFP infiziert waren (Abbildung 13). Die beiden Gruppen aus dem *enriched environment* haben tendenziell eine niedrigere Dornenfortsatz-Dichte gegenüber der jeweiligen Gruppe aus den Haltungskäfigen, jedoch ist hierbei keine statistische Signifikanz vorhanden.



**Abbildung 13: Dichte der Dornenfortsätze nach PKC-Blockade im Haltungskäfig und nach *enriched environment***

Abgebildet ist die Dichte der Dornenfortsätze für die jeweilige Kohorte. Die gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für die Bezeichnung *spiny* dar. Die Datenpunkte stellen jeweils ein Neuron dar. Für die beiden Kohorten, die mit dem AAV-PKCi-GFP infiziert waren (PKCi HC und PKCi EE), zeigt sich eine signifikant niedrigere Dichte an Dornenfortsätzen.

CTRL HC, PV-GFP-Kontrollmäuse im Haltungskäfig; PKCi HC, PV-PKCi-Mäuse im Haltungskäfig; CTRL EE, PV-GFP-Kontrollmäuse aus *enriched environment*; PKCi EE, PV-PKCi-Mäuse aus *enriched environment*  
 Unpaired t-test: HC CTRL vs HC PKCi p=0.0184; EE CTRL vs EE PKCi p=0.0469

### 3.3 Verteilung der Dornenfortsatz-Morphologie

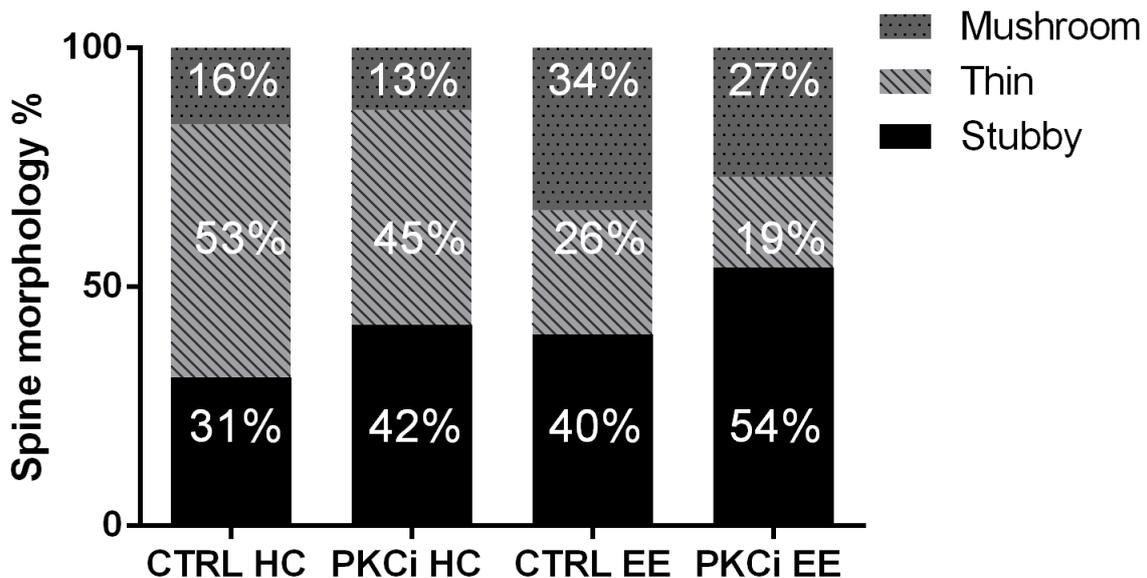
Es sind unterschiedliche Typen von Dornenfortsätzen an Prinzipalzellen bekannt. Diese lassen sich klassifizieren in *thin*, *stubby* und *mushroom*. Die automatische Detektion der Dornenfortsatz-Morphologie anhand der Software NeuronStudio erfolgte mithilfe eines Algorithmus, der basierend auf den Parametern Kopf-Hals-Länge die jeweilige Morphologie bestimmen konnte (Abbildung 12). Die Ergebnisse wurden manuell evaluiert und gegebenenfalls korrigiert, da die

Software teilweise auch Dornenfortsätze von kreuzenden Dendriten erfasste (siehe Material und Methoden).

Die Abbildung 14 zeigt das Ergebnis an. Dabei ist erkennbar, dass der Anteil der *stubby* Dornenfortsätze nach Einsatz des PKCi höher ist (31% » 42%; 40% » 54%). Gleichzeitig ist das Vorhandensein der *thin* (53% » 45%; 26% » 19%) und *mushroom* (16% » 13%; 34% » 27%) Dornenfortsätze bei der Inhibition der Proteinkinase C gesunken.

Der Vergleich zwischen den Gruppen im Haltungskäfig (HC) gegenüber den Gruppen aus dem *enriched environment* (EE) demonstriert einen höheren Anteil an *mushroom* (27% » 13%; 34% » 16%) und *stubby* (54% » 42%; 40% » 31%) Dornenfortsätzen bei den Gruppen aus dem *enriched environment*, wohingegen der Anteil von den *thin* (19% » 45%; 26% » 53%) Dornenfortsätzen bei diesen Gruppen niedriger ist.

Anhand des Chi-Quadrat-Test wurde die Verteilung verglichen: CTRL HC vs PKCi HC  $p = 0.0586$ ; CTRL HC vs CTRL EE, CTRL HC vs PKCi EE und PKCi HC vs PKCi EE  $p < 0.0001$ .



**Abbildung 14: Veränderungen der Dornenfortsatz-Morphologien nach PKC-Inhibition im Haltungskäfig und nach *enriched environment***

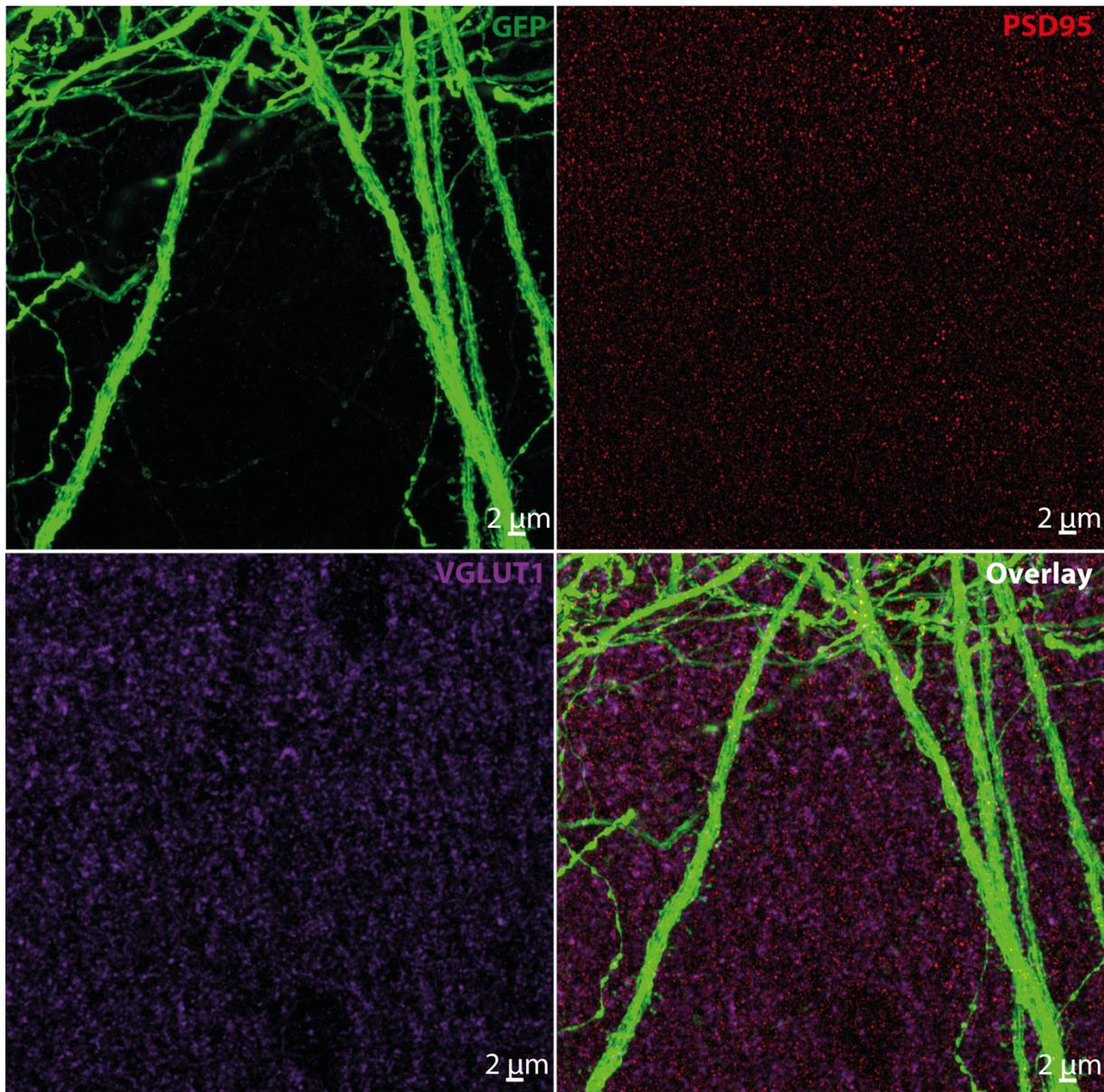
Die Abbildung zeigt die Dornenfortsatz-Morphologie für die vier analysierten Kohorten an. Gepunktet dargestellt sind die *mushroom*, gestrichelt die *thin* und schwarz die *stubby* Dornenfortsätze.

CTRL HC, PV-GFP-Kontrollmäuse im Haltungskäfig; PKCi HC, PV-PKCi-Mäuse im Haltungskäfig; CTRL EE, PV-GFP-Kontrollmäuse aus *enriched environment*; PKCi EE, PV-PKCi-Mäuse aus *enriched environment*.

### 3.4 Synaptische Verbindungen

Parvalbumin-positive Interneurone des Gyrus dentatus erhalten an ihren apikalen Dendriten eine Vielzahl exzitatorischer Eingänge aus dem entorhinalen Cortex und aus subkortikalen Hirnregionen. Um zu untersuchen, ob es durch verhaltensbedingte strukturelle Plastizität zu einer Reorganisation der exzitatorischen Verknüpfung parvalbuminerner Interneurone kommt und um zu untersuchen, welche Rolle die PKC für die Ausbildung synaptischer Kontakte spielt, wurden die putativen glutamatergen Synapsen, die auf einzelne parvalbuminerge Interneurone im Gyrus dentatus konvergieren quantifiziert. Putative Synapsen wurden durch immunfluoreszente Markierung prä- und postsynaptischer Marker visualisiert. Als präsynaptischer Marker wurde VGLUT1 (vesicular glutamate transporter 1, exprimiert in glutamatergen präsynaptischen Domänen) ausgewählt, während als postsynaptischer Marker PSD95 (postsynaptic density protein 95, eine Membran assoziierte Guanylat-Kinase, exprimiert in der PSD der postsynaptischen Domänen) verwendet wurde. Zudem wurde das in parvalbumin-positiven Neuronen exprimierte GFP immunfluoreszent verstärkt. Wegen der höheren räumlichen Auflösung, vor allem in der Z-Achse, wurden in diesem Falle die Bilder an dem Konfokal-Mikroskop LSM510 (Zeiss) mit einem Öl-Immersion-Objektiv (40-fache Vergrößerung, numerische Apertur 1,4; Zeiss) aufgenommen. Die aus vielen optischen Schnittebenen bestehenden „Bildstapel“ wurden mit Hilfe der Software IMARIS dreidimensional rekonstruiert (Abbildung 15).

Anhand bekannter Protokolle wurden die Dendriten mit IMARIS semiautomatisch nach vorhanden prä- und postsynaptischen Kontakten untersucht (Belmer et al., 2017; Fogarty et al., 2013). Dafür wurde zunächst eine passende Oberfläche mit der Software erzeugt, auf welcher die prä- von der postsynaptischen Domäne abgegrenzt werden konnte und es wurde die zu untersuchende Region ausgewählt. Es erfolgte die separate Filterung der prä- und postsynaptischen Farbkanäle. Der minimale Durchmesser wurde für PSD95 auf  $0.5\mu\text{m}$  und für VGLUT1 auf  $0.6\mu\text{m}$  festgelegt. Diese Werte für die Spot-Größen gehen aus diversen Untersuchungen zu PSD95 und VGLUT1 hervor (Belmer et al., 2017; Fogarty et al., 2013; Kim und Sheng, 2009; Kitahara et al., 2016). Anschließend wurden alle Spots, die eine maximale Entfernung von  $1\mu\text{m}$  zueinander hatten, als Synapsen gewertet und quantifiziert. Dieser Wert stimmt mit den bisherigen Ergebnissen aus anderen Arbeiten mit ähnlichen Methoden zur Morphologie von synaptischen Verbindungen überein (Fogarty et al., 2013).

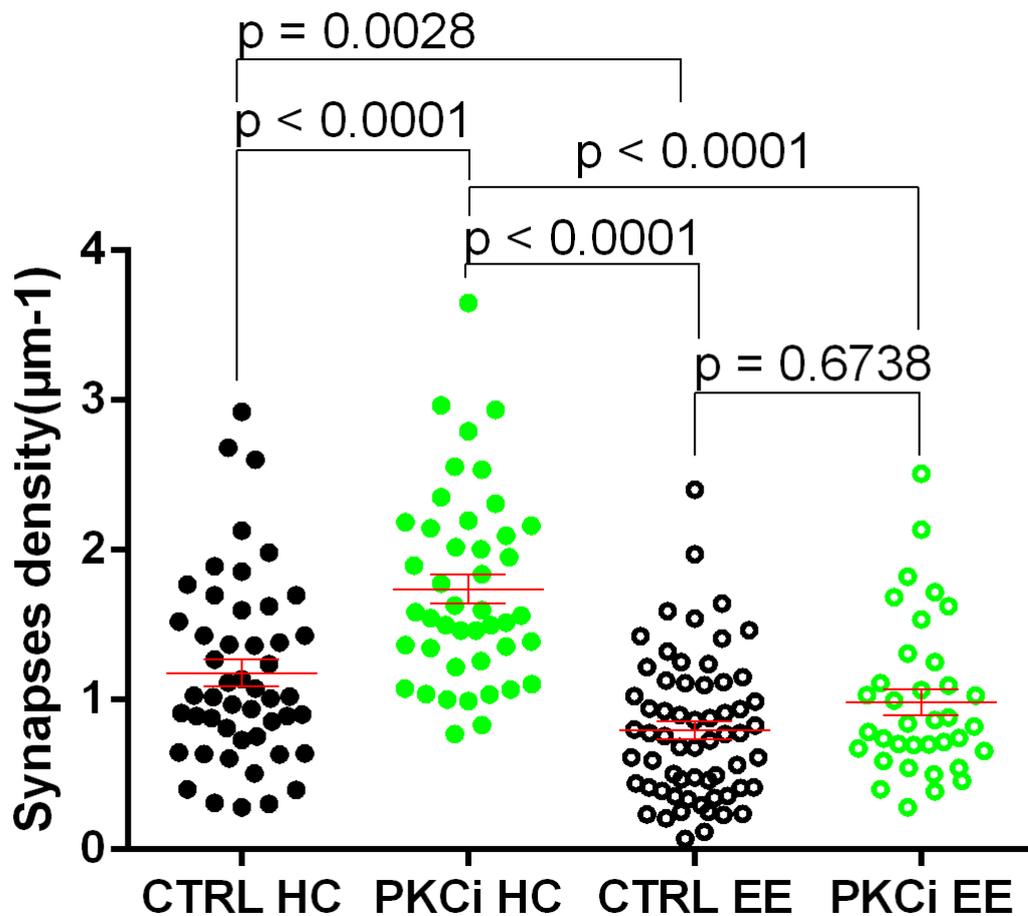


**Abbildung 15: Visualisierung prä- und postsynaptischer Markerproteine in Bezug auf GFP-markierte Neurone**

Abgebildet ist eine konfokale Aufnahme eines dendritischen Segments von einem GFP-positiven Neuron im Gyrus dentatus mit immunhistologischer Anfärbung von GFP (grün), PSD95 (rot), VGLUT1 (violett). Während die ersten drei Abbildungen die einzelnen Kanäle zeigen, ist auf der letzten Abbildung ein „overlay“ von allen drei Kanälen dargestellt. Maßstab-Linie 2µm.

Nach statistischer Auswertung (Abbildung 16) ist erkennbar, dass die Dichte der Synapsen bei der Gruppe der Proteinkinase C-inhibierten Mäuse im Haltungskäfig signifikant höher ist, als bei der Kontrollgruppe aus dem Haltungskäfig. Bei den zwei Gruppen aus dem *enriched environment* zeigt sich dieselbe Tendenz, jedoch ohne eine statistische Signifikanz.

Vergleicht man die Kontrollgruppe und PKCi-Gruppe aus dem Haltungskäfig jeweils mit der Kontrollgruppe und PKCi-Gruppe aus dem *enriched environment*, zeigt sich eine signifikante Reduktion der Synapsendichte nach *environmental enrichment*.



**Abbildung 16: Dichte der Synapsen an apikalen Dendriten parvalbuminerner Interneurone nach PKC-Blockade im Haltungskäfig und nach *enriched environment***

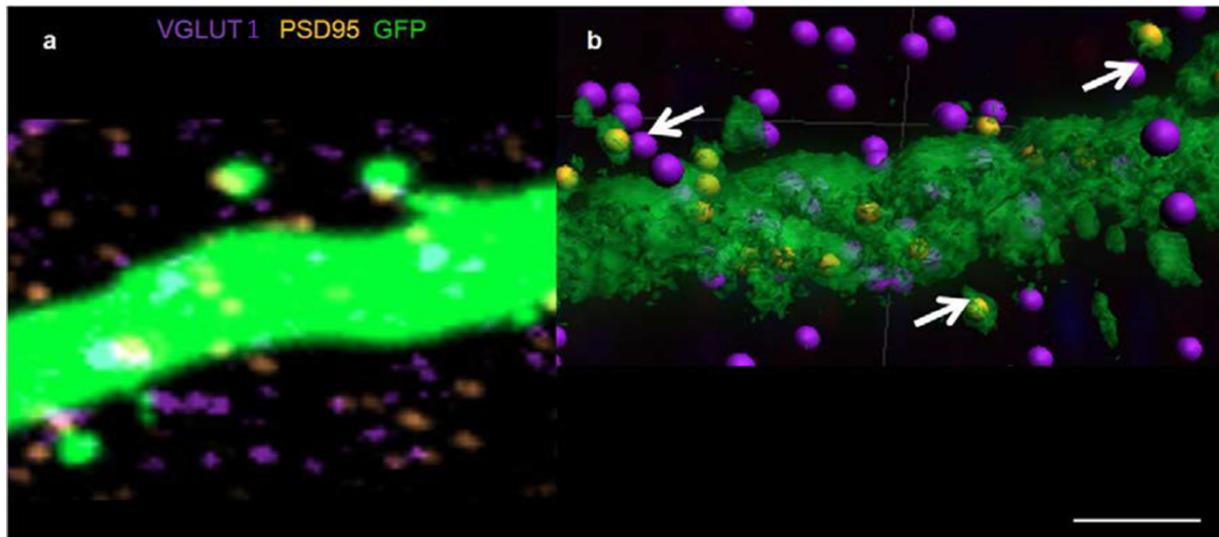
Der Graph zeigt die Dichte der Synapsen für die jeweilige Kohorte an. Die Datenpunkte stellen jeweils ein dendritisches Segment dar. Die mit dem AAV-PKCi-GFP infizierte Kohorte aus dem Haltungskäfig (PKCi HC) trägt eine signifikant höhere Dichte an Synapsen, als die jeweilige Kontrollgruppe (CTRL HC) und als die PKCi-EE-Kohorte.

One-way ANOVA  $F_{25.47}$ ,  $p < 0.0001$  – Bonferroni's multiple comparisons test, HC CTRL vs HC PKCi  $p < 0.0001$  - HC CTRL vs EE CTRL  $p = 0.0028$  - HC PKCi vs EE PKCi  $p < 0.0001$  – CTRL EE vs PKCi EE  $p = 0.6738$

### 3.5 Verteilung der synaptischen Verbindungen auf den Dornenfortsätzen

Die Dendriten exzitatorischer Prinzipalzellen tragen sehr hohe Dichten an Dornenfortsätzen und die weit überwiegende Zahl der exzitatorischen Synapsen, die auf eine Prinzipalzelle konvergieren, bilden den Kontakt an diesen Dornenfortsätzen aus (Holtmaat und Svoboda, 2009). Die Existenz von Dornenfortsätzen auf parvalbuminergen Interneuronen bedeutet allerdings nicht per se, dass diese Strukturen synaptische Verbindungen tragen. Mit Hilfe der immunhistologischen Visualisierung putativer synaptischer Verbindungen wurde im nächsten Schritt untersucht, welcher Anteil exzitatorischer Synapsen tatsächlich auf dendritischen

Dornenfortsätzen gebildet wird und welcher Anteil am dendritischen Stamm ansetzt, wie es normalerweise für GABAerge Interneurone beschrieben ist (Freund und Buzsáki, 1996). Die Analyse der Verteilung putativer Synapsen auf Dornenfortsätzen und Stamm erfolgte mit Hilfe der Software IMARIS, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben (Abbildung 17). Die Parameter zur Detektion von Dornenfortsätzen und putativen Synapsen entsprachen jenen in Kapiteln 3.2 und 3.4 beschriebenen.

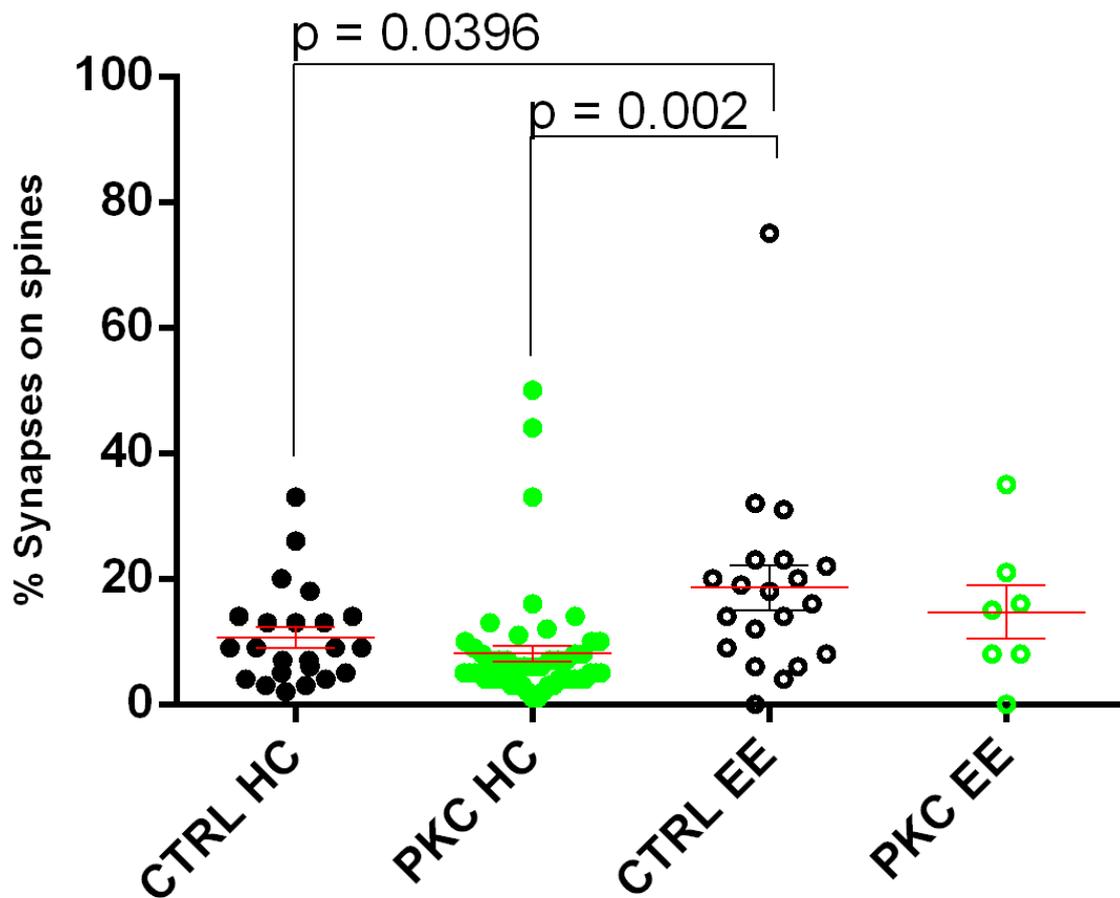


**Abbildung 17: Detektion von prä- und postsynaptischen Markern am dendritischen Stamm oder auf Dornenfortsätzen mit IMARIS**

Abgebildet ist ein dendritisches Segment eines GFP-positiven Neurons aus dem Gyrus dentatus. Nach Immunhistologische Färbung ist GFP grün markiert, VGLUT1-immunoreaktive Puncta sind violett, PSD95-positive Puncta sind orange.

**a** zeigt eine am Konfokal-Mikroskop aufgenommene optische Schnittebene; **b** zeigt das gleiche Bild nach Rekonstruktion in IMARIS. Pfeile markieren Synapsen auf Dornenfortsätzen. Maßstab-Linie 2µm.

Die Quantifizierung der putativen exzitatorischen Synapsen entsprechend ihrer Lokalisation zeigte, dass die überwiegende Mehrzahl der Synapsen in allen Kohorten am dendritischen Stamm ansetzte. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen parvalbumin-positiven Interneuronen, in denen die PKC inhibiert worden war und solchen mit intakter PKC, weder unter basalen Bedingungen im Haltungskäfig noch im EE. Allerdings zeigte sich interessanterweise eine leichte Zunahme der Synapsen an Dornenfortsätzen gegenüber solchen am dendritischen Stamm in Kontroll-Mäusen nach EE gegenüber Haltungskäfig. Die prozentuale Verteilung von Synapsen auf den Dornenfortsätzen in den jeweiligen Kohorten ist der Abbildung 18 zu entnehmen.



**Abbildung 18: Anteil der exzitatorischen Eingangssynapsen an Dornenfortsätzen parvalbumin-positiver Interneurone nach PKC-Blockade im Haltungskäfig und nach *enriched environment***

Abgebildet ist die Verteilung von putativen glutamatergen Synapsen auf den Dornenfortsätzen als prozentualer Anteil aller putativen glutamatergen Synapsen an den apikalen Dendriten parvalbumin-positiver Interneurone. Die Datenpunkte stellen jeweils ein Neuron dar. Zwischen den einzelnen Kohorten besteht kein signifikanter Unterschied.

One-way ANOVA  $F 4.896$ ,  $p = 0.0033$  – Newman-Keuls multiple comparisons test, CTRL HC vs CTRL EE  $p = 0.0396$ ; PKC HC vs CTRL EE  $p = 0.002$ ; alle anderen  $p > 0.05$

## 4 Diskussion

### 4.1 Dornenfortsätze der parvalbumin-positiven Interneurone

Seit der Entdeckung der dendritischen Dornenfortsätze durch Camillo Golgi und Santiago Ramón y Cajal vor mehr als einem Jahrhundert, hat sich die Aufmerksamkeit der Neurowissenschaften vor allem auf die exzitatorischen Nervenzellen und ihre Kompartimente gerichtet. Für inhibitorische Interneurone war die Lehrbuchmeinung bis in die jüngste Zeit, dass ihre Dendriten weitestgehend glatt sind und keine Dornenfortsätze besitzen würden (Freund und Buzsáki, 1996; Gulyás et al., 1999; Hu et al., 2014).

Aus der Literatur geht hervor, dass bei einigen Typen von kortikalen Interneuronen bereits sporadisch Dornenfortsätze entdeckt wurden, insbesondere an somatostatin-positiven Zellen (Guirado et al., 2014; Keck et al., 2011; McBain et al., 1994; Sancho und Bloodgood, 2018; Scheuss und Bonhoeffer, 2014). Eine detaillierte Charakterisierung dieser interneuronalen Dornenfortsätze auf der Ebene ganzer dendritischer Bäume erfolgte erstmals durch Foggetti (2014) für parvalbumin-positiv Interneurone des Gyrus dentatus.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Proteinkinase C (PKC) für die Ausbildung dendritischer Dornenfortsätze in parvalbumin-positiven Interneuronen unter basalen Bedingungen und unter Bedingungen lernabhängiger struktureller Veränderungen untersucht. Zudem wurde die Bedeutung der PKC für die Ausbildung exzitatorischer Synapsen an Dendriten parvalbumin-positiver Interneurone unter basalen Bedingungen und unter Bedingungen lernabhängiger struktureller Veränderungen untersucht. Diese Untersuchungen waren durch die Tatsache motiviert, dass die Ausbildung einer funktionellen Langzeitpotenzierung an den exzitatorischen Eingängen dieser Interneurone von der Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren (mGluR5) und der konsekutiven Aktivierung der PKC abhängt (Hainmuller et al., 2014). Dafür sind transgenen Mäusen, die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Parvalbumin-Promoters exprimieren Cre-Rekombinase-abhängige AAV in den Gyrus dentatus injiziert worden, um eine selektive Inhibition der Proteinkinase C zu bewirken. Dieser neuartige Ansatz hat eine hohe Zell- und Regionenspezifität der molekularen Intervention ermöglicht. Anhand einer GFP-Expression konnten die Nervenzellen in der Bildgebung dargestellt werden, woraufhin mittels Software-Analyse die Dornenfortsatz- und Synapsendichte der verschiedenen Kohorten eruiert wurde.

Die Spezifität der molekularen Interferenz war mit 95% sehr hoch. Dieser Wert konnte anhand einer immunhistologischen Färbung gegen Parvalbumin ermittelt werden. Es ist anzunehmen,

dass der tatsächliche Wert sogar noch etwas höher liegt, da zum einen Parvalbumin bei niedriger Expression nicht immer deutlich nachweisbar ist und zudem die Dicke der Schnitte (80µm) eine optimale Permeabilisierung während der Immunhistologie verhindert haben könnte.

Aus einer *in vitro* Untersuchung von Hongpaisan und Alkon (2007) ist bereits bekannt, dass die PKC-Aktivierung anhand des Alzheimer-Medikaments Bryostatin die Entwicklung von *mushroom* Dornenfortsätzen verbessert und zu einem Gedächtnis-spezifischem Anstieg ihrer Anzahl führt. Folglich konnte vermutet werden, dass die Inhibition der PKC zu einer Abnahme der *mushroom* Dornenfortsätze und somit auch der gesamten Anzahl an Dornenfortsätzen führen kann.

Diesbezüglich ergab die Analyse und statistische Auswertung der Kohorten eine signifikant niedrigere Dichte der Dornenfortsätze bei den beiden Kohorten, welche mit AAV-PKCi-GFP infiziert waren, im Gegensatz zu den beiden Kohorten, bei denen die Expressierung der PKC nicht blockiert wurde (siehe Abb. 3.4). Daraus kann geschlossen werden, dass der Einsatz des Inhibitors für Proteinkinase C (PKCi) zu einer Beeinträchtigung der Ausbildung von Dornenfortsätzen an parvalbumin-positiven Interneuronen geführt hat. Dies unterstützt die anfangs aufgestellte Hypothese, dass die Dornenfortsätze in parvalbumin-positiven Interneuronen plastischen Veränderungen unterliegen, die PKC-abhängig sind. Hainmuller et al. (2014) haben die Rolle der PKC in der Bildung der Langzeitplastizität verdeutlicht. Interneurone senden nach deren Aktivierung mittels der PKC ein retrogrades Signal an die Prinzipalzelle zurück, wodurch die Wahrscheinlichkeit der Neurotransmitter-Freisetzung anschließend steigt. Es ist anzunehmen, dass der Einsatz des PKCi das retrograde Signal unterbindet und somit die Bildung der Langzeitplastizität blockiert. Die Blockade dieses Signalweges scheint sich auch auf die Ausbildung der Dornenfortsätze auszuwirken. Zudem ist aus der Literatur bekannt, dass die PKC direkt an der Bildung des Aktin-Zytoskeletts der Dornenfortsätze beteiligt ist (Hongpaisan et al., 2013). Demzufolge kann die Inhibition der PKC wohlmöglich deren Bildung und Stabilität auf molekularer Ebene obstruiert haben.

Um eine Induktion der strukturellen Plastizität zu bewirken, wurden außerdem PV-PKCi- und Kontrolltiere einem angereicherten Umfeld (*enriched environment*) ausgesetzt. Die aktuelle Studienlage hierzu ist allerdings nicht eindeutig. Zum Beispiel konnten Rampon et al. (2000) zeigen, dass Nagetiere in einem angereicherten Umfeld eine erhöhte Dornenfortsatz-Dichte an den Prinzipalzellen der CA1-Region entwickelten. Dahingegen konnten Turner et al. (2003)

keine Unterschiede in der Dornenfortsatz-Dichte an Körnerzellen des Gyrus dentatus nach Exposition gegenüber einem angereicherten Umfeld beobachten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten bezüglich der Haltung keine signifikanten Unterschiede zwischen der Dornenfortsatz-Dichte an den parvalbumin-positiven Interneuronen der Versuchsgruppen nachweisen (siehe Abb. 3.4). Tatsächlich deutet der Trend sogar eher auf eine höhere Dichte bei den Haltungskäfig-Gruppen hin, welche keinem angereicherten Umfeld ausgesetzt waren.

Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass ein angereichertes Umfeld eher den Informationsfluss im glutamatergen System fördert und dazu unter anderem die Aktivierung des GABAergen inhibitorischen Systems senkt (Donato et al., 2013). Diese Hypothese könnte in zukünftigen Experimenten untersucht werden, in denen nach Exposition gegenüber einem angereicherten Umfeld sowohl die Dornenfortsatz-Dichte an den Prinzipalzellen als auch an den Interneuronen analysiert wird. Abgesehen von diesen Überlegungen zur unterschiedlichen Beeinflussung des exzitatorischen und inhibitorischen Systems durch das *enriched environment* besteht außerdem die Möglichkeit, dass sich die induzierte strukturelle Plastizität nicht in der Nettozunahme von Dornenfortsätzen niederschlägt, sondern in der Verschiebung von Dornenfortsätzen von ungenutzten zu relevanten Eingängen. Diese Möglichkeit wäre experimentell sehr viel schwerer zu untersuchen. Eventuell könnten aktive Verbindungen mit Hilfe von sogenannten „immediate early genes“ markiert werden, um Ihre Beziehungen zu detektierten Dornenfortsätzen darzustellen (Abdou et al., 2018).

## 4.2 Dornenfortsatz-Morphologie

Wie eingangs bereits erwähnt wurde, können die verschiedenen Dornenfortsatz-Morphologie meist einem bestimmten Entwicklungsgrad zugeordnet werden. Die dünnen *thin* Dornenfortsätze werden eher als unreif angesehen, wohingegen die größeren, pilzförmigen *mushroom* Dornen eine stabilere zytoskelettale Struktur aufweisen, reich an postsynaptischen Elementen sind und vermehrt AMPA- und NMDA-Rezeptoren in der Membran vorweisen können. Diese Komplexität erfordert einen längeren Reifeprozess, wodurch die *mushroom* Dornenfortsätze entwickelter erscheinen (Holtmaat und Svoboda, 2009; Yuste, 2010). Die Rolle der stummelförmigen *stubby* Dornenfortsätze wird noch kontrovers diskutiert. Einige Untersuchungen deuten auf eine unreife Form hin, da eine Prävalenz vor allem während der Entwicklungsphase vorgefunden wurde (zusammen mit *Filopodien*) (Kasai et al., 2003). Aus der Literatur geht wiederum

auch die Annahme hervor, dass es sich hierbei um eine stabilere Form handelt, da diese Dornenfortsätze kürzer und somit weniger beweglich sind (Peebles et al., 2010).

Eine Analyse von der Verteilung der Dornenfortsatz-Morphologie nach Inhibition der Proteinkinase C erscheint nach den oben genannten Unterschieden aufschlussreich.

Da die Analyse der Dornenfortsätze gezeigt hat, dass die Inhibition der PKC zu einer Abnahme ihrer Dichte führt, besteht der Verdacht, dass die PKC notwendig ist für die Ausbildung neuer Dornenfortsätze. Dementsprechend würde unter PKC-Blockade vor allem die Anzahl der neu gebildeten unreifen dünnen Dornenfortsätze sinken.

Tatsächlich bestätigen die Ergebnisse die aufgestellte Hypothese (siehe Abb. 3.5). Beide Kontrollgruppen tragen einen höheren Anteil an dünnen *thin* Dornenfortsätzen und lassen dadurch vermuten, dass der Einsatz des PKCi die Bildung neuer Dornenfortsätze eingeschränkt hat. Gleichzeitig ist auch der Anteil an den stabileren *mushroom* Dornenfortsätzen gesunken. Ursächlich hierfür könnte eine gestörte Bildung des Aktin-Zytoskeletts der Dornenfortsätze mit nachfolgender Beeinträchtigung ihrer Ausreifung sein (Hongpaisan et al., 2013). Der höhere Anteil von stummelförmigen *stubby* Dornenfortsätzen bei den PKC-inhibierten Gruppen ließe sich dann mit der anteiligen Abnahme der *thin* und *mushroom* Dornenfortsätze erklären.

Vergleicht man die beiden Gruppen aus dem *enriched environment* mit den beiden Gruppen aus der normalen Käfighaltung, zeigt sich ein höherer Anteil an *mushroom* und *stubby* und ein niedrigerer Anteil an *thin* Dornenfortsätzen bei angereicherter Haltung (siehe Abb. 3.5). Diese Umverteilung zugunsten der stabileren *mushroom* und den *stubby* Dornenfortsätzen könnte mit der zur Reifung anregenden komplexen Umgebung erklärt werden.

In diesem Zusammenhang wäre eine *in vivo* Untersuchung der Dornenfortsätze (Gu et al., 2014) aufschlussreich, da dabei der kontinuierliche Umsatz über einen bestimmten Zeitraum beobachtet werden könnte und somit besser nachvollziehbarere Ergebnisse zur Verfügung stünden.

### **4.3 Synaptische Verbindungen**

Zusätzlich zu den strukturellen Veränderungen an den Dornenfortsätzen hat sich die Aufmerksamkeit in jüngster Zeit auch auf die Plastizität an den synaptischen Verbindungen von Interneuronen gerichtet. Insbesondere die Mechanismen, die zur regulierenden Wirkung der Interneurone führen und somit das regelrechte Funktionieren des Verschaltungsnetzwerkes sichern, haben große Beachtung erhalten – auch wenn sich die Studienlage hierzu noch in einem frühen Stadium befindet (Donato et al., 2013; Favuzzi et al., 2017). Im Gegensatz zu den Neuronen

des exzitatorischen Systems ist die Aufgabe der inhibierenden Neurone hauptsächlich das Modulieren und Regulieren der Aktivität von exzitatorischen Neuronen und ihrer Synapsen, entweder direkt oder durch Disinhibition. Aufgrund dieser gänzlich unterschiedlichen Funktion wird davon ausgegangen, dass sich der Umbau von Synapsen auf oder von inhibierenden Neuronen von dem der exzitatorischen Synapsen auf exzitatorischen Neuronen unterscheidet (Caroni et al., 2014). Aus der Literatur ist bislang bekannt, dass *enriched environment* und inkrementelles Lernen zu einem Anstieg der inhibitorischen Synapsen-Dichte an parvalbumin-positiven Interneuronen der CA1-Region führen können (Donato et al., 2013). Unsere Ergebnisse in Kontrollmäusen haben interessanterweise gezeigt, dass im Gyrus dentatus die Exposition gegenüber einem EE zu einer Abnahme der exzitatorischen synaptischen Kontakte an parvalbumin-positiven Interneuronen führt (siehe Abb. 3.7). Beide Mechanismen – die Zunahme der Inhibition und die Reduktion der Exzitation – wären gleichermaßen geeignet die Aktivität der parvalbumin-positiven Interneurone zu senken und somit den Informationsfluss und auch die Plastizität im exzitatorischen System der Körnerzellen zu fördern. Dies wiederum wäre eine plausible mechanistische Erklärung für die gesteigerte Lernfähigkeit von Mäusen nach EE (Donato et al., 2013). Würden zukünftige Untersuchungen zeitgleich die Verteilung der Synapsen an glutamatergen Prinzipalzellen berücksichtigen und dort eine erhöhte Dichte vorfinden, würde diese Hypothese bekräftigt. Zudem könnte auch hier eine zusätzliche Immunhistologie für inhibitorische Synapsen mit anti-VGAT und anti-GABA<sub>A</sub> weitere Erkenntnisse liefern (Fogarty et al., 2013).

Neben dieser einfachen binären Erklärung für die Abnahme der exzitatorischen Synapsendichte nach EE sind aber auch andere Szenarien vorstellbar. So kann die Haltung in einem angereicherten Umfeld auch das Verhältnis von relevanten zu weniger relevanten Verbindungen beeinflusst haben. Die signifikant niedrigere Dichte an Synapsen bei den *enrichment* Gruppen könnte dadurch erklärt werden, dass die *enriched* Umgebung das Auftreten von wenigen eventuell langzeitpotenzierten Verbindungen gefördert hat und so zu einer Konzentrierung der synaptischen Verbindungen auf relevante Eingänge geführt hat, weswegen die synaptische Dichte insgesamt niedriger ausfällt. Diese These wird durch die vermehrte Präsenz von stabilen *mushroom* Dornenfortsätzen bei der *enrichment* Haltung und dem großen Anteil von unbeständigen *thin* Dornenfortsätzen ohne *enrichment* Haltung bekräftigt (siehe Abb. 3.5). Bekanntermaßen repräsentieren *mushroom* Dornenfortsätze stabile und komplexe Verbindungen, wohingegen die *thin* Dornenfortsätze bei weniger komplexen Verbindungsstrukturen vermehrt zu finden sind (Holtmaat und Svoboda, 2009a). Weiterhin könnte der Anteil an Synapsen auf den Dornenfortsätzen diese Erklärung bekräftigen. Die Kontrollgruppe aus der *enrichment* Haltung

zeigt signifikant mehr Synapsen auf Dornenfortsätzen, als die Gruppen ohne *enrichment* Haltung. Auch die PKCi-Gruppe aus der *enrichment* Haltung hat tendenziell mehr Synapsen auf Dornenfortsätzen als die PKCi ohne *enrichment* Haltung (siehe Abb. 3.9).

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass das Auftreten von mehr *mushroom* Dornenfortsätzen gekoppelt mit einem höheren Anteil an Synapsen auf Dornenfortsätzen die Hypothese einer Umverteilung (und Konzentrierung) synaptischer Eingänge auf parvalbumin-positiven Interneuronen im Gyrus dentatus nach *enriched environment* unterstützen.

Die Inhibition der PKC hatte unerwartete Effekte auf die Ausbildung von exzitatorischen Synapsen unter basalen und *enriched* Bedingungen. Erwartet hatte ich, dass die Blockade der PKC in parvalbumin-positiven Neuronen parallel zu der Reduktion der Dornenfortsätze auch zu einer Reduktion der exzitatorischen Synapsen an diesen Zellen führen würde.

Interessanterweise zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit aber eine signifikant höhere Dichte an Synapsen bei der PKCi-Kohorte aus dem Haltungskäfig gegenüber der Kontrollgruppe aus dem Haltungskäfig an. Für die PKCi-Kohorte aus der *enrichment* Haltung ist derselbe Trend erkennbar, jedoch ohne eine statistische Signifikanz (siehe Abb. 3.7).

Um eine Erklärung hierfür zu finden, kann die genauere Betrachtung der PKC von großer Bedeutung sein. Es ist bekannt, dass die PKC als Teil einer Signalkaskade fungiert und direkt auf die GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Bindung und -Phosphorylierung wirkt (Kullmann et al., 2012). Möglicherweise hat die Inhibition der PKC die Bindung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren gestört, wodurch die inhibierende Regulierung des exzitatorischen Systems gedrosselt wurde. Infolgedessen ist die Entstehung glutamaterger Synapsen begünstigt worden. Weiterführende Untersuchungen könnten in Zukunft zeitgleich den Effekt des PKCi auf die GABAergen Synapsen untersuchen und somit diese These überprüfen. Dies könnte durch eine zusätzliche Immunhistologie für inhibitorische Synapsen mit anti-VGAT und anti-GABA<sub>A</sub> erfolgen (Fogarty et al., 2013).

Eine mögliche Erklärung betrifft die Auswirkungen des PKCi auf die komplexeren Verbindungen zwischen den parvalbumin-positiven Interneuronen und den exzitatorischen Prinzipalzellen. Es ist vorstellbar, dass der Einsatz des PKCi die plastische Reifung von wenigen relevanten synaptischen Kontakten beeinträchtigt hat und im Gegenzug das Auftreten von vielen unspezifischen Verbindungen begünstigt hat, im Sinne eines Verdünnungseffektes. Dies kann dadurch erfolgt sein, dass die Inhibition der PKC die Langzeitpotenzierung behindert hat (Hainmüller et al., 2014). Aus der Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass der Anteil an diesen reifen Dornenfortsätzen bei den PKCi-Kohorten geringer ausfällt. Zudem ist bei den PKCi-Kohorten der Anteil an Synapsen auf Dornenfortsätzen geringer, wenn auch ohne statistische Signifikanz (siehe

Abb. 3.9). Wenn also sowohl der Anteil an *mushroom* Dornenfortsätzen als auch der Anteil an Synapsen auf Dornenfortsätze bei den PKCi-Kohorten niedriger ist, kann dies die aufgestellte Hypothese bestätigen, wonach die erhöhte Synapsen-Dichte der PKCi-Kohorten auf einen Verlust an spezifischen Verbindungen zurückzuführen wäre.

Zusammenfassend lässt sich nach den Ergebnissen dieser Arbeit sagen, dass anscheinend plastische Veränderungen an den Dornenfortsätzen von parvalbumin-positiven-Interneuronen PKC-abhängig stattfinden. Die PKC greift zudem auch in den Reifeprozess der Dornenfortsätze ein. Bezüglich der synaptischen Verbindungen waren die Ergebnisse unerwartet und haben gezeigt, dass die Inhibition der PKC zu einer höheren Dichte an Synapsen geführt hat, wahlweise durch den Umbau von wenigen spezifischen zu vielen unspezifischen Kontakten. Demgegenüber hat ein angereichertes Umfeld zur Abnahme von synaptischen Kontakten an parvalbumin-positiven Interneuronen geführt, welches wahrscheinlich auf die Konzentrierung der synaptischen Verbindungen auf relevante Eingänge zurückzuführen wäre.

#### **4.4 Ausblick**

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die strukturelle Plastizität von parvalbumin-positiven Interneuronen mit und ohne Blockade der plastizitäts-relevanten PKC zu untersuchen. In der Zukunft könnte eine Markierung von spezifischen, an der Bildung von Gedächtnisspuren beteiligten parvalbumin-positiven Neuronen mittels des Proteins C-fos in weiterführenden Untersuchungen helfen die strukturellen Veränderungen dieser Zellen noch spezifischer zu fassen. Die Expression von C-fos wird für die Induktion einer LTP benötigt. Aktivierte Neurone könnten via C-fos Expression identifiziert werden und hinsichtlich der Dornenfortsatz-Dichte, -Verteilung und -Morphologie mit nicht aktivierten Neuronen verglichen werden (Miyamoto 2006). Außerdem können zukünftige Verhaltenstests verdeutlichen, welche Konsequenzen die Inhibition der strukturellen Plastizität für die Fähigkeit der Mäuse hat, verschiedene aber ähnliche kontextuelle Gedächtnisinhalte voneinander zu trennen. Es kann untersucht werden, ob andere Erfahrungen als das *enriched environment*, wie z.B. ein Wasser-T-Labyrinth oder die Angstkonditionierung, Unterschiede in der Dichte des synaptischen Inputs triggern (Morris und Frey, 1997). Eine zeitgleiche Immunhistologie für inhibitorische und exzitatorische Synapsen und die parallele Analyse struktureller Plastizität an den exzitatorischen Körnerzellen könnte wie oben beschrieben genutzt werden, um Nettoveränderungen im Informationsfluss zwischen

inhibitorischem und exzitatorischem System bei verschiedenen Verhaltensparadigmen näher zu beleuchten (Fogarty et al., 2013).

Insgesamt sind die molekularen und zellulären Vorgänge in dem Zusammenspiel von GABA-ergen Interneuronen und glutamatergen Prinzipalzellen noch nicht genügend erforscht und sollten in Zukunft Gegenstand ausführlicher Untersuchungen sein, um einen weiteren Schritt zum Verständnis der Lern- und Gedächtnisbildung unseres Gehirns beizutragen. Dieses Wissen kann zukünftig helfen, die Therapiemaßnahmen bei klinischen Hirnerkrankungen nachhaltig zu verbessern.

## 5 Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass Lernprozesse zu strukturellen Veränderungen an Neuronen führen. Diese strukturelle Plastizität wurde bislang hauptsächlich an glutamatergen Prinzipalzellen nachgewiesen. Es gibt jedoch Hinweise, welche auch an GABAergen Interneuronen plastische Veränderungen nach Lernprozessen vermuten lassen. Ziel dieser experimentellen Promotionsarbeit war es, die strukturelle Plastizität von parvalbumin-positiven Interneuronen (PVIs) des Gyrus dentatus zu analysieren. Außerdem sollte die Beteiligung der Proteinkinase C (PKC), von der bekannt ist, dass sie für die funktionelle Plastizität an diesen Zellen notwendig ist, an diesen Prozessen untersucht werden.

Um die Funktion der PKC selektiv in PVIs zu blockieren und außerdem morphologische Veränderungen von PVIs detektieren zu können, habe ich neuartige molekulare Werkzeuge zur PKC-Blockade (PKCi) und fluoreszenten Markierung (GFP) der Zellen durch die stereotaktische Injektion Cre-Rekombinase-abhängiger Adeno-assoziierten Viren in den Gyrus dentatus Parvalbumin-Cre transgener Mäuse eingebracht. PKCi plus GFP injizierte Mäuse (PV-PKCi-GFP) wurden mit GFP injizierten Kontrollmäusen (PV-GFP) einerseits unter basalen Bedingungen im Haltungskäfig und andererseits unter plastizitäts-stimulierenden Bedingungen eines *enriched environments* (EE) verglichen. Die Mäuse der vier Kohorten wurden mit Hilfe immunhistologischer Verfahren, konfokaler Bildgebung und Analyse-Software hinsichtlich der Dichte und Morphologie dendritischer Dornenfortsätze, sowie Dichte und Verteilung exzitatorischer Synapsen untersucht.

Der Einsatz des Proteinkinase C-Inhibitors führte sowohl unter basalen als auch unter *enriched* Bedingungen zu einer signifikant niedrigeren Dichte an Dornenfortsätzen. Auch die Verteilung der Dornenfortsatz-Morphologie hat bei den PKC-inhibierten Gruppen zu einem niedrigeren Anteil an stabilen Dornenfortsätzen geführt. Diese Ergebnisse weisen auf eine entscheidende Rolle der PKC bei der Ausbildung dendritischer Dornenfortsätze hin.

Hinsichtlich exzitatorischer Eingänge an parvalbumin-positiven Interneuronen zeigte sich, dass die Exposition gegenüber einem EE zu einer deutlichen Reduktion der Synapsendichte führt. Auf diese Weise würde die Inhibition reduziert und der Informationsfluss im exzitatorischen System der Körnerzellen gesteigert. Dieses Ergebnis bietet eine plausible mechanistische Erklärung für die gesteigerte Lernfähigkeit nach EE. Allerdings führt das EE offensichtlich auch zu einer Umverteilung exzitatorischer synaptischer Eingänge. Es finden sich nach EE mehr Synapsen auf dendritischen Dornenfortsätzen, was die Vermutung nahelegt, dass die Eingänge auf solche von besonderer Relevanz kondensiert werden. Inhibition der Proteinkinase C führte

interessanterweise zu einer Zunahme der synaptischen Kontakte an den PVIs. Dieses Ergebnis war überraschend und lässt sich auf Grundlage unseres momentanen Wissensstandes nicht eindeutig erklären. Vermutet werden kann eine Zunahme unspezifischer synaptischer Verknüpfungen, aber es sind weitere Untersuchungen nötig, um verlässliche Aussagen treffen zu können.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass inhibitorische parvalbumin-positive Interneurone des Gyrus dentatus unter EE strukturelle Veränderungen an ihren exzitatorischen Eingängen durchlaufen und dass die PKC in diesen Neuronen sowohl eine wichtige Rolle bei der Ausbildung dendritischer Dornenfortsätze als auch bei der Einbindung in das exzitatorische Netzwerk spielt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abdou, K., Shehata, M., Choko, K., Nishizono, H., Matsuo, M., Muramatsu, S., and Inokuchi, K. (2018). Synapse-specific representation of the identity of overlapping memory engrams. *Science* *360*, 1227–1231.
- Abrous, D.N., Koehl, M., and Le Moal, M. (2005). Adult Neurogenesis: From Precursors to Network and Physiology. *Physiol. Rev.* *85*, 523–569.
- Aimone, J.B., Li, Y., Lee, S.W., Clemenson, G.D., Deng, W., and Gage, F.H. (2014). Regulation and Function of Adult Neurogenesis: From Genes to Cognition. *Physiol. Rev.* *94*, 991–1026.
- Allen, T.A., and Fortin, N.J. (2013). The evolution of episodic memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 10379–10386.
- Allison, D.W., Gelfand, V.I., Spector, I., and Craig, A.M. (1998). Role of Actin in Anchoring Postsynaptic Receptors in Cultured Hippocampal Neurons: Differential Attachment of NMDA versus AMPA Receptors. *J. Neurosci.* *18*, 2423–2436.
- Amaral, D.G., and Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* *31*, 571–591.
- Amaral, D.G., Scharfman, H.E., and Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). In *Progress in Brain Research*, H.E. Scharfman, ed. (Elsevier), pp. 3–790.
- Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsáki, G., Cauli, B., DeFelipe, J., Fairén, A., et al. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 557–568.
- Bailey, C.H., Bartsch, D., and Kandel, E.R. (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 13445–13452.
- Bear, M.F., and Malenka, R.C. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* *4*, 389–399.
- Becker, J.T., and Morris, R.G. (1999). Working Memory(s). *Brain Cogn.* *41*, 1–8.
- Belmer, A., Klenowski, P.M., Patkar, O.L., and Bartlett, S.E. (2017). Mapping the connectivity of serotonin transporter immunoreactive axons to excitatory and inhibitory neurochemical synapses in the mouse limbic brain. *Brain Struct. Funct.* *222*, 1297–1314.
- Bliss, T.V.P., and Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* *232*, 331–356.
- Caroni, P., Chowdhury, A., and Lahr, M. (2014). Synapse rearrangements upon learning: from divergent–sparse connectivity to dedicated sub-circuits. *Trends Neurosci.* *37*, 604–614.
- Cavaco, S., Anderson, S.W., Allen, J.S., Castro-Caldas, A., and Damasio, H. (2004). The scope of preserved procedural memory in amnesia. *Brain* *127*, 1853–1867.

- Cohen, N., and Squire, L. (1980). Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science* *210*, 207–210.
- Collingridge, G.L., Isaac, J.T.R., and Wang, Y.T. (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 952–962.
- Davis, C.D., Jones, F.L., and Derrick, B.E. (2004). Novel Environments Enhance the Induction and Maintenance of Long-Term Potentiation in the Dentate Gyrus. *J. Neurosci.* *24*, 6497–6506.
- De Zeeuw, C.I., Hansel, C., Bian, F., Koekkoek, S.K.E., van Alphen, A.M., Linden, D.J., and Oberdick, J. (1998). Expression of a Protein Kinase C Inhibitor in Purkinje Cells Blocks Cerebellar LTD and Adaptation of the Vestibulo-Ocular Reflex. *Neuron* *20*, 495–508.
- Donato, F., Rompani, S.B., and Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature* *504*, 272–276.
- Eichenbaum, H. (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat. Rev. Neurosci.* *1*, 41–50.
- Fan, Y., Liu, Z., Weinstein, P.R., Fike, J.R., and Liu, J. (2007). Environmental enrichment enhances neurogenesis and improves functional outcome after cranial irradiation. *Eur. J. Neurosci.* *25*, 38–46.
- Farr, S.A., Flood, J.F., and Morley, J.E. (2000). The Effect of Cholinergic, GABAergic, Serotonergic, and Glutamatergic Receptor Modulation on Posttrial Memory Processing in the Hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.* *73*, 150–167.
- Favuzzi, E., Marques-Smith, A., Deogracias, R., Winterflood, C.M., Sánchez-Aguilera, A., Mantoan, L., Maeso, P., Fernandes, C., Ewers, H., and Rico, B. (2017). Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican. *Neuron* *95*, 639–655.e10.
- Fogarty, M.J., Hammond, L.A., Kanjhan, R., Bellingham, M.C., and Noakes, P.G. (2013). A method for the three-dimensional reconstruction of Neurobiotin<sup>TM</sup>-filled neurons and the location of their synaptic inputs. *Front. Neural Circuits* *7*.
- Foggetti, A. (2014). Anatomical and functional study of parvalbumin-positive interneurons in the hippocampal formation. Ph.D. University of Aberdeen.
- Freund, T.F. (2003). Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci.* *26*, 489–495.
- Freund, T.F., and Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* *6*, 347–470.
- Fröhlich, F. (2016). *Network Neuroscience* (Academic Press).
- Gage, F.H. (2010). Molecular and Cellular Mechanisms Contributing to the Regulation, Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells in the Adult Dentate Gyrus. *Keio J. Med.* *59*, 79–83.
- Gaiarsa, J.-L., Caillard, O., and Ben-Ari, Y. (2002). Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. *Trends Neurosci.* *25*, 564–570.
- Gorman, C., and Bullock, C. (2000). Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. *Curr. Opin. Biotechnol.* *11*, 455–460.

- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., and Shors, T.J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat. Neurosci.* *2*, 260–265.
- Gu, L., Kleiber, S., Schmid, L., Nebeling, F., Chamoun, M., Steffen, J., Wagner, J., and Fuhrmann, M. (2014). Long-Term In Vivo Imaging of Dendritic Spines in the Hippocampus Reveals Structural Plasticity. *J. Neurosci.* *34*, 13948–13953.
- Guirado, R., Perez-Rando, M., Sanchez-Matarredona, D., Castillo-Gómez, E., Liberia, T., Rovira-Esteban, L., Varea, E., Crespo, C., Blasco-Ibáñez, J.M., and Nacher, J. (2014). The Dendritic Spines of Interneurons Are Dynamic Structures Influenced by PSA-NCAM Expression. *Cereb. Cortex* *24*, 3014–3024.
- Gulyás, A.I., Megías, M., Emri, Z., and Freund, T.F. (1999). Total Number and Ratio of Excitatory and Inhibitory Synapses Converging onto Single Interneurons of Different Types in the CA1 Area of the Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* *19*, 10082–10097.
- Hainmuller, T., Kriegstein, K., Kulik, A., and Bartos, M. (2014). Joint CP-AMPA and group I mGlu receptor activation is required for synaptic plasticity in dentate gyrus fast-spiking interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 13211–13216.
- Harris, K., and Stevens, J. (1989). Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J. Neurosci.* *9*, 2982–2997.
- Hebb, D.O. (1949). *The organization of behavior: a neuropsychological theory* (Mahwah, N.J: L. Erlbaum Associates).
- Herzog, E., Takamori, S., Jahn, R., Brose, N., and Wojcik, S.M. (2006). Synaptic and vesicular colocalization of the glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the mouse hippocampus. *J. Neurochem.* *99*, 1011–1018.
- Hippenmeyer, S., Vrieseling, E., Sigrist, M., Portmann, T., Laengle, C., Ladle, D.R., and Arber, S. (2005). A Developmental Switch in the Response of DRG Neurons to ETS Transcription Factor Signaling. *PLOS Biol.* *3*, e159.
- Hlushchenko, I., Koskinen, M., and Hotulainen, P. (2016). Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity. *Cytoskeleton* *73*, 435–441.
- Holtmaat, A., and Svoboda, K. (2009a). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 647–658.
- Holtmaat, A., and Svoboda, K. (2009b). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 647–658.
- Hongpaisan, J., and Alkon, D.L. (2007). A structural basis for enhancement of long-term associative memory in single dendritic spines regulated by PKC. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 19571–19576.
- Hongpaisan, J., Xu, C., Sen, A., Nelson, T.J., and Alkon, D.L. (2013). PKC activation during training restores mushroom spine synapses and memory in the aged rat. *Neurobiol. Dis.* *55*, 44–62.
- House, C., and Kemp, B.E. (1987). Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* *238*, 1726–1728.

- Houser, C.R. (2007). Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. In *Progress in Brain Research*, H.E. Scharfman, ed. (Elsevier), pp. 217–811.
- Hu, H., Gan, J., and Jonas, P. (2014). Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science* *345*, 1255263.
- Kampfhammer, J. (2000). *Plastizität im Nervensystem*.
- Kandel, E. (2000). *Principles of Neural Science*.
- Kandel, E.R. (2001). The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science* *294*, 1030–1038.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., and Nakahara, H. (2003). Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* *26*, 360–368.
- Keck, T., Scheuss, V., Jacobsen, R.I., Wierenga, C.J., Eysel, U.T., Bonhoeffer, T., and Hübener, M. (2011). Loss of Sensory Input Causes Rapid Structural Changes of Inhibitory Neurons in Adult Mouse Visual Cortex. *Neuron* *71*, 869–882.
- Kesner, R.P. (2007). A behavioral analysis of dentate gyrus function. In *Progress in Brain Research*, H.E. Scharfman, ed. (Elsevier), pp. 567–576.
- Kim, E., and Sheng, M. (2009). The postsynaptic density. *Curr. Biol.* *19*, R723–R724.
- Kitahara, Y., Ohta, K., Hasuo, H., Shuto, T., Kuroiwa, M., Sotogaku, N., Togo, A., Nakamura, K., and Nishi, A. (2016). Chronic Fluoxetine Induces the Enlargement of Perforant Path-Granule Cell Synapses in the Mouse Dentate Gyrus. *PLOS ONE* *11*, e0147307.
- Klausberger, T., and Somogyi, P. (2008). Neuronal Diversity and Temporal Dynamics: The Unity of Hippocampal Circuit Operations. *Science* *321*, 53–57.
- Kullmann, D.M. (2011). Interneuron networks in the hippocampus. *Curr. Opin. Neurobiol.* *21*, 709–716.
- Kullmann, D.M., Moreau, A.W., Bakiri, Y., and Nicholson, E. (2012). Plasticity of Inhibition. *Neuron* *75*, 951–962.
- de Lanerolle, N.C., Kim, J.H., Robbins, R.J., and Spencer, D.D. (1989). Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* *495*, 387–395.
- Laurberg, S. (1979). Commissural and intrinsic connections of the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* *184*, 685–708.
- Leranth, C., and Hajszan, T. (2007). Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. In *Progress in Brain Research*, H.E. Scharfman, ed. (Elsevier), pp. 63–799.
- Levy, D.A., Stark, C.E.L., and Squire, L.R. (2004). Intact Conceptual Priming in the Absence of Declarative Memory. *Psychol. Sci.* *15*, 680–686.
- Lovett-Barron, M., and Losonczy, A. (2014). Behavioral consequences of GABAergic neuronal diversity. *Curr. Opin. Neurobiol.* *26*, 27–33.

- Maguire, E.A., Burgess, N., Donnett, J.G., Frackowiak, R.S.J., Frith, C.D., and O'Keefe, J. (1998). Knowing Where and Getting There: A Human Navigation Network. *Science* 280, 921–924.
- Maquet, P. (2001). The Role of Sleep in Learning and Memory. *Science* 294, 1048–1052.
- Martinez, C.O., Do, V.H., Martinez, J.L., and Derrick, B.E. (2002). Associative long-term potentiation (LTP) among extrinsic afferents of the hippocampal CA3 region in vivo. *Brain Res.* 940, 86–94.
- McBain, C.J., DiChiara, T.J., and Kauer, J.A. (1994). Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *J. Neurosci.* 14, 4433–4445.
- McClure, C., Cole, K.L.H., Wulff, P., Klugmann, M., and Murray, A.J. (2011). Production and Titering of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Meibach, R.C., and Siegel, A. (1977). Efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Brain Res.* 124, 197–224.
- Miyamoto, E. (2006). Molecular Mechanism of Neuronal Plasticity: Induction and Maintenance of Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *J. Pharmacol. Sci.* 100, 433–442.
- Morgan, R.J., Santhakumar, V., and Soltesz, I. (2007). Modeling the dentate gyrus. In *Progress in Brain Research*, H.E. Scharfman, ed. (Elsevier), pp. 639–658.
- Morris, R.G.M. (2013). NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology* 74, 32–40.
- Morris, R.G.M., and Frey, U. (1997). Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 352, 1489–1503.
- Morris, R.G.M., Anderson, E., Lynch, G.S., and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774.
- Mott, D.D., Turner, D.A., Okazaki, M.M., and Lewis, D.V. Interneurons of the Dentate–Hilus Border of the Rat Dentate Gyrus: Morphological and Electrophysiological Heterogeneity. 16.
- Murray, A.J., Sauer, J.-F., Riedel, G., McClure, C., Ansel, L., Cheyne, L., Bartos, M., Wisden, W., and Wulff, P. (2011). Parvalbumin-positive CA1 interneurons are required for spatial working but not for reference memory. *Nat. Neurosci.* 14, 297–299.
- Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., McHugh, T.J., Barrera, V.R., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., McBain, C.J., et al. (2012). Young Dentate Granule Cells Mediate Pattern Separation, whereas Old Granule Cells Facilitate Pattern Completion. *Cell* 149, 188–201.
- O'Keefe, J., and Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map* (Oxford : New York: Clarendon Press ; Oxford University Press).
- Osten, P., Grinevich, V., and Cetin, A. (2007). Viral Vectors: A Wide Range of Choices and High Levels of Service. In *Conditional Mutagenesis: An Approach to Disease Models*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 177–202.
- Owens, D.F., and Kriegstein, A.R. (2002). Is there more to gaba than synaptic inhibition? *Nat. Rev.*

Neurosci. 3, 715–727.

Peebles, C.L., Yoo, J., Thwin, M.T., Palop, J.J., Noebels, J.L., and Finkbeiner, S. (2010). Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 18173–18178.

Pérez-Rando, M., Castillo-Gómez, E., Bellés, M., Carceller, H., and Náchter, J. (2017). The activation of NMDA receptors alters the structural dynamics of the spines of hippocampal interneurons. *Neurosci. Lett.* 658, 79–84.

Peters, A., and Kaiserman-Abramof, I.R. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am. J. Anat.* 127, 321–355.

Rampon, C., Tang, Y.-P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., and Tsien, J.Z. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat. Neurosci.* 3, 238–244.

Ribak, C.E., and Seress, L. (1983). Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *J. Neurocytol.* 12, 577–597.

Rodriguez, A., Ehlenberger, D.B., Dickstein, D.L., Hof, P.R., and Wearne, S.L. (2008). Automated Three-Dimensional Detection and Shape Classification of Dendritic Spines from Fluorescence Microscopy Images. *PLOS ONE* 3, e1997.

Ruan, Y.-W., Lei, Z., Fan, Y., Zou, B., and Xu, Z.C. (2008). Diversity and fluctuation of spine morphology in CA1 pyramidal neurons after transient global ischemia. *J. Neurosci. Res.* 87, 61–68.

Sahay, A., Wilson, D.A., and Hen, R. (2011). Pattern Separation: A Common Function for New Neurons in Hippocampus and Olfactory Bulb. *Neuron* 70, 582–588.

Sancho, L., and Bloodgood, B. (2018). Functional Distinctions between Spine and Dendritic Synapses Made onto Parvalbumin-Positive Interneurons in Mouse Cortex | Elsevier Enhanced Reader. 2075–2087.

Schacter, D.L. (1987). Implicit expressions of memory in organic amnesia: learning of new facts and associations. *Hum. Neurobiol.* 6, 107–118.

Scheuss, V., and Bonhoeffer, T. (2014). Function of Dendritic Spines on Hippocampal Inhibitory Neurons. *Cereb. Cortex* 24, 3142–3153.

Scoville, W.B., and Milner, B. (1957). LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 11–21.

Shaw, C.A.S. (1994). The origin of synaptic neuroplasticity: crucial molecules or a dynamical cascade? 23.

Sheng, M., and Hoogenraad, C.C. (2007). The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 823–847.

Shirai, Y., Adachi, N., and Saito, N. (2008). Protein kinase C $\epsilon$ : function in neurons. *FEBS J.* 275, 3988–3994.

Squire, L.R. (1987). The organization and neural substrates of human memory. *Int. J. Neurol.* 21–22,

218–222.

Stanley, E.M., Fadel, J.R., and Mott, D.D. (2012). Interneuron loss reduces dendritic inhibition and GABA release in hippocampus of aged rats. *Neurobiol. Aging* 33, 431.e1-431.e13.

Teyler, T.J., and DiScenna, P. (1987). Long-Term Potentiation. *Annu. Rev. Neurosci.* 10, 131–161.

Thuret, S., Toni, N., Aigner, S., Yeo, G.W., and Gage, F.H. (2009). Hippocampus-dependent learning is associated with adult neurogenesis in MRL/MpJ mice. *Hippocampus* 19, 658–669.

Tulving, E. (2002). Episodic Memory: From Mind to Brain. *Annu. Rev. Psychol.* 53, 1–25.

Turner, C.A., Lewis, M.H., and King, M.A. (2003). Environmental enrichment: Effects on stereotyped behavior and dendritic morphology. *Dev. Psychobiol.* 43, 20–27.

Vivar, C., and Van Praag, H. (2013). Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus. *Front. Neural Circuits* 7.

Wang, J.Q., Arora, A., Yang, L., Parelkar, N.K., Zhang, G., Liu, X., Choe, E.S., and Mao, L. (2005). Phosphorylation of AMPA receptors. *Mol. Neurobiol.* 32, 237–249.

Wearne, S.L., Rodriguez, A., Ehlenberger, D.B., Rocher, A.B., Henderson, S.C., and Hof, P.R. (2005). New techniques for imaging, digitization and analysis of three-dimensional neural morphology on multiple scales. *Neuroscience* 136, 661–680.

Witter Menno P., Wouterlood Floris G., Naber Pieterke A., and Van Haefen Theo (2006). Anatomical Organization of the Parahippocampal-Hippocampal Network. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 911, 1–24.

Yuste, R. (2005). Origin and Classification of Neocortical Interneurons. *Neuron* 48, 524–527.

Yuste, R. (2010). *Dendritic Spines* (MIT Press).

Zola-Morgan, S. (1996). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *Neurocase* 2, 259aw–25298.

## 7 Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung von folgenden Menschen nicht möglich gewesen und daher möchte ich mich bei ihnen herzlichst bedanken.

**Prof. Dr. Peer Wulff** danke ich für die Vergabe des Promotionsthemas, der Unterstützung beim Stipendium und seiner stets positiven Persönlichkeit. Seine Begeisterung für das Themengebiet der Neurobiologie sowie seine motivierende Art waren eine große Hilfe für mich.

**Prof. Dr. Markus Bleich** als Geschäftsführenden Vorstand danke ich für die Ermöglichung der wissenschaftlichen Arbeit an dem Physiologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

**Dr. Angelica Foggetti** stand mir mit Rat und Tat zur Seite und hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen. Ihre exzellente Betreuung war eine große Hilfe für mich und deswegen bedanke ich mich bei ihr inständig.

Der **AG Wulff** danke ich für eine kollegiale und freundliche Atmosphäre, welche mir das experimentelle Arbeiten sehr angenehm gemacht hat.

Ich bedanke mich zudem bei der **Christian-Albrechts-Universität zu Kiel** für die Vergabe des Landesgraduiertenstipendiums und dem mir entgegengebrachtem Vertrauen.

*Für Liebe, Rückhalt und bedingungsloser Unterstützung danke ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben: Meinen Eltern Kati und Said, meiner Schwester Amehtyst und meiner großen Liebe Paulina.*

## **8 Anhang**

### **8.1 Abstract zur Poster-Vorstellung**

Studierendentagung zu den Kiel Life Science 2018

Amir Ali Ehtiati

“Structural plasticity of parvalbumin-positive interneurons in the  
dentate gyrus”

Institute of Physiology CAU Kiel, Neurobiology, Prof. Dr. Peer Wulff

Inaugural dissertation to obtain the doctor of dentistry

#### *Abstract*

My work examines functional aspects of the structural plasticity of parvalbumin-positive interneurons in the mouse dentate gyrus. It has been recently shown in Prof. Wulff lab that this type of interneurons carry a considerable number of dendritic spines. Here I describe how the inhibition of protein kinase C, enzyme of a signaling cascade activated during neural plasticity, affects dendritic spine and synapsis density.

## 8.2 Poster

### Structural Plasticity of parvalbumin-positive interneurons in the dentate gyrus

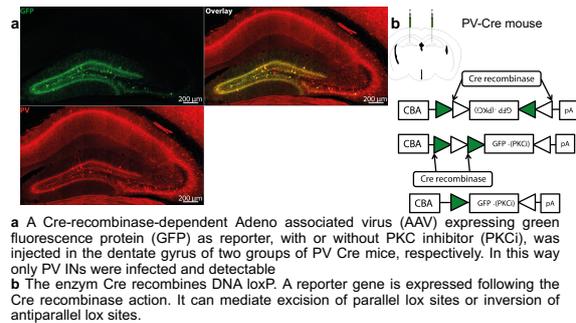
Amir Ehtiati, Angelica Foggetti, Peer Wulff  
Institute of Physiology, Kiel



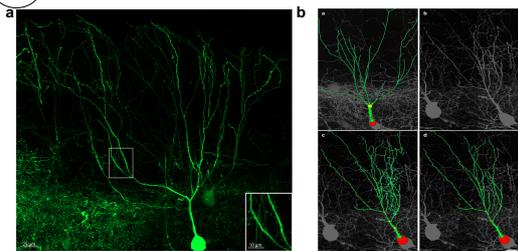
#### 1 Abstract

It has been recently shown in Prof. Wulff lab that parvalbumin-positive interneurons carry a considerable number of dendritic spines. This work examines functional aspects of the structural plasticity of parvalbumin-positive interneurons in the mouse dentate gyrus. Here we describe how the inhibition of protein kinase C, enzyme of a signaling cascade activated during neural plasticity, affects dendritic spine and synapsis density.

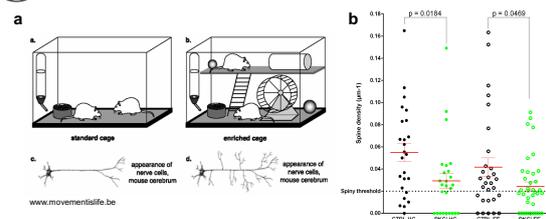
#### 2 Molecular labelling and genetic tool



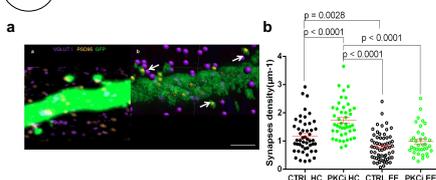
#### 3 Acquisition and Software Reconstruction



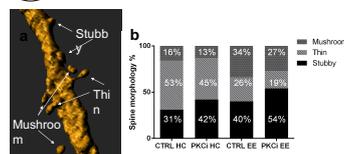
#### 4 Enriched Environment and spine density



#### 5 Synapses



#### 6 Spine morphologies



#### 7 Conclusions

The presence of a PKCi led to a significant lower density of spines, both in home cage and enriched conditions. The expression of PKCi also resulted in a change of spine morphologies, towards a lower percentage of mushroom type, the most stable one. The synapses density was interestingly higher in the presence of PKCi, we assume due to an indiscriminate contact formation after the impairment of plasticity in these cells. Both control and PKCi groups show instead a reduction of synaptic inputs after exposure to enriched environment, as previously observed in control mice in Prof. Wulff's lab. This would mean that there is still pruning of irrelevant and consolidation of important synapses following this kind of behavioural experience, implying that the related type of plasticity is not affected by the PKCi.