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
Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .................................................................................................................. III

1 Einleitung ................................................................................................................................... 1

1.1 Gedächtnis ............................................................................................................................. 1
  1.1.1 Einteilung der Gedächtnissformen .................................................................................. 1
  1.1.2 Anatomische Strukturen der Gedächtnisbildung ......................................................... 2

1.2 Hippocampus ........................................................................................................................ 3
  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

1.3 Neuronale Plastizität ............................................................................................................ 12
  1.3.1 Funktionelle Plastizität ................................................................................................. 13
  1.3.2 Strukturelle Plastizität .................................................................................................. 14
  1.3.3 Plastizität GABAerger Interneurone ........................................................................... 18

1.4 Genetische Werkzeuge ......................................................................................................... 19
  1.4.1 Adeno-assoziierte Viren (AAV) ................................................................................... 19
  1.4.2 Cre/loxP-System ........................................................................................................... 20

1.5 Zielsetzung der Arbeit ............................................................................................................ 21

2 Material und Methoden .......................................................................................................... 22

2.1 Reagenzien und Lösungen .................................................................................................... 22

2.2 Tierversuche .......................................................................................................................... 22

2.3 Generierung der Adeno-assoziierten Viren (AAV) ............................................................. 23

2.4 Stereotaktische Injektion ...................................................................................................... 24

2.5 Gewebssentnahme und Immunhistologie .......................................................................... 25

2.6 Bildgebung ............................................................................................................................ 26

2.7 Software Analyse .................................................................................................................. 27

2.8 Statistische Auswertung ....................................................................................................... 29

3 Ergebnisse ............................................................................................................................... 30

3.1 Spezifität des genetischen Werkzeugs ................................................................................ 30

3.2 Dichte der Dornenfortsätze .................................................................................................. 32

3.3 Verteilung der Dornenfortsatz-Morphologie .................................................................... 37

3.4 Synaptische Verbindungen .................................................................................................. 39
<table>
<thead>
<tr>
<th>3.5 Verteilung der synaptischen Verbindungen auf den Dornenfortsätzen</th>
<th>41</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>4 Diskussion...........................................................................</td>
<td>44</td>
</tr>
<tr>
<td>4.1 Dornenfortsätze der parvalbumin-positiven Interneurone</td>
<td>44</td>
</tr>
<tr>
<td>4.2 Dornenfortsatz-Morphologie...........................................</td>
<td>46</td>
</tr>
<tr>
<td>4.3 Synaptische Verbindungen................................................</td>
<td>47</td>
</tr>
<tr>
<td>4.4 Ausblick............................................................................</td>
<td>50</td>
</tr>
<tr>
<td>5 Zusammenfassung.....................................................................</td>
<td>52</td>
</tr>
<tr>
<td>6 Literaturverzeichnis.............................................................</td>
<td>54</td>
</tr>
<tr>
<td>7 Danksagung...........................................................................</td>
<td>61</td>
</tr>
<tr>
<td>8 Anhang...................................................................................</td>
<td>62</td>
</tr>
<tr>
<td>8.1 Abstract zur Postervorstellung.........................................</td>
<td>62</td>
</tr>
<tr>
<td>8.2 Poster................................................................................</td>
<td>63</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Abkürzungsverzeichnis

<table>
<thead>
<tr>
<th>Abkürzung</th>
<th>Bedeutung</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>AAV</td>
<td>Adeno-assozierte Viren</td>
</tr>
<tr>
<td>AMPA</td>
<td>Aminomethylphosphonsäure</td>
</tr>
<tr>
<td>AP</td>
<td>Anterior-Posterior</td>
</tr>
<tr>
<td>AU</td>
<td>Airy Units</td>
</tr>
<tr>
<td>BNPI</td>
<td>Brain-specific Na+-dependent inorganic phosphate contranporter</td>
</tr>
<tr>
<td>CA</td>
<td>Cornu Ammonis</td>
</tr>
<tr>
<td>CMV</td>
<td>Humane Cytomegalieviren</td>
</tr>
<tr>
<td>DV</td>
<td>Dorsal-Ventral</td>
</tr>
<tr>
<td>EE</td>
<td>Einrichehd Environment</td>
</tr>
<tr>
<td>EPSP</td>
<td>Exzitatorisch postsynaptisches Potential</td>
</tr>
<tr>
<td>GFP</td>
<td>Grün fluoreszierendes Protein</td>
</tr>
<tr>
<td>HIPPP</td>
<td>Hilar perforant path-associated cell</td>
</tr>
<tr>
<td>HCl</td>
<td>Salzsäure</td>
</tr>
<tr>
<td>HK/HC</td>
<td>Haltungskäfig</td>
</tr>
<tr>
<td>ITRs</td>
<td>Invertierte terminale Sequenzwiederholungen</td>
</tr>
<tr>
<td>KCl</td>
<td>Kaliumchlorid</td>
</tr>
<tr>
<td>KH2PO4</td>
<td>Kaliumdihydrogenphosphat</td>
</tr>
<tr>
<td>LTD</td>
<td>Langzeit-Depression</td>
</tr>
<tr>
<td>LTP</td>
<td>Langzeitpotenzierung</td>
</tr>
<tr>
<td>mGlur5</td>
<td>Metabotrope Glutamatrezeptor</td>
</tr>
<tr>
<td>Na2HPO4</td>
<td>Dinatriumhydrogenphosphat</td>
</tr>
<tr>
<td>NaCl</td>
<td>Natriumchlorid</td>
</tr>
<tr>
<td>NaOH</td>
<td>Natriumhydroxid</td>
</tr>
<tr>
<td>NGS</td>
<td>Normales Ziegenserum</td>
</tr>
<tr>
<td>NMDA</td>
<td>N-Methyl-D-Aspartat</td>
</tr>
<tr>
<td>PBS</td>
<td>Phosphatgepufferte Salzlösung</td>
</tr>
<tr>
<td>PING</td>
<td>Petilla Interneuron Nomenclature Group</td>
</tr>
<tr>
<td>PFA</td>
<td>Paraformaldehyd</td>
</tr>
<tr>
<td>PSD</td>
<td>Postsynaptic Density</td>
</tr>
<tr>
<td>PVIs</td>
<td>Parvalbumin-positive Interneurone</td>
</tr>
<tr>
<td>REM</td>
<td>Rapid Eye Movement Schlafphase</td>
</tr>
<tr>
<td>RT</td>
<td>Raumtemperatur</td>
</tr>
<tr>
<td>Abbreviation</td>
<td>Full Form</td>
</tr>
<tr>
<td>--------------</td>
<td>-----------</td>
</tr>
<tr>
<td>STDP</td>
<td>Spike-Timing-Dependent Plasticity</td>
</tr>
<tr>
<td>Tris</td>
<td>Tromethamin</td>
</tr>
<tr>
<td>VGAT</td>
<td>Vesicular inhibitory amino acid transporter</td>
</tr>
<tr>
<td>VGLUT</td>
<td>Vesicular glutamate transporter</td>
</tr>
</tbody>
</table>
1 Einleitung

1.1 Gedächtnis


1.1.1 Einteilung der Gedächtnisformen


Deklaratives Gedächtnis

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).


Non-deklaratives Gedächtnis

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).


1.1.2 Anatomische Strukturen der Gedächtnissbildung
Medialer Temporallappen – Hippocampus


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

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.

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 Zytobezirktektor, 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

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.
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...

Abbildung 3: Schematische Darstellung des hippocampalen Netzwerks


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-Kollateralen

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

Im Hilus befindet sich eine Gruppe von Interneuronen mit größeren Somata (25-35µm) 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.


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 oben erwähnte Neuroneogenese hat eine Mitwirkung an dieser Funktion (Vivar und Van Praag, 2013). Tatsächlich sind hippocampus-abhängige Lernaufgaben, Exploration und physi sche 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


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


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 (Cholecystokinin, Enkephalin, Neuropeptid Y, Somatostatin, vasoaktives intestinales Peptid) (Freund, 2003; Yuste, 2005).


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.


Als Eingangsstruktur des Hippocampus erhält der Gyrus dentatus eine gro{\ae} 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).

Eine besonders prominente Rolle nehmen die sogenannten parvalbumin-positiven Interneurone (PVIs) 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-positive Interneurone morphologisch als Korb- oder axo-axonische Zellen vor. Interessanterweise innervieren sie jeweils spezifische subzellulare Bereiche der nachgeschalteten Zelle (Klausberger und Somogyi, 2008).


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-expri mierende 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).

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 beitragt, 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).
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


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).


### 1.3.2 Strukturelle Plastizität


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

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

**Dornenfortsätze**


Der Kopf hat in der Regel einen Durchmesser von 0,5µm bis 1,5µm und ist über einen 0,35µm bis 3,80µm langen Hals mit dem Dendriten-Ast verbunden. Dieser fungiert als Diffusionsbarriere für organische Moleküle und Ionen und kann eine Dicke von 0,1µm bis 0,5µm 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

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


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 GABAerger 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 GABAerger 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

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


1.4.1 Adeno-assoziierte Viren (AAV)

1.4.2 Cre/loxP-System


Abbildung 6: Cre/loxP-System


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


2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Lösungen

PBS (10x)
1.37 M NaCl, 26.8 mM KCl, 14.7 mM KH₂PO₄, 81 mM Na₂HPO₄ bei einem pH-Wert von 7.4 mit 0.1 M NaOH. 1x verdünnt angewendet.

PFA 4%
40g Paraformaldehyd wurden 1L dest. H₂O 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 H₂O 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,
rote 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 wurden 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 täg- lich versetzt oder ausgetauscht wurden.

2.3 Generierung der Adeno-assozierten Viren (AAV)

TTACACGTTCTTCTGCCTCAGGGCGCCCTCCTGGCGAACCT; 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-expri-
mierende 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 O2 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 (1x10^7 infektiöse Partikel pro ml). Jeweils 1µl wurde bilateral in den Gyrus dentatus mit folgenden Koordinaten abgegeben (in mm): AP -1.9, lateral ±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 Gewebsentnahme 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 Gewebsfixierung 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 Ziegenserum (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:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Antikörper</th>
<th>Bezugsquelle</th>
<th>Ursprung</th>
<th>Verdünnung</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Monoklonal anti-GFP</td>
<td>Invitrogen, Carlsbad, CA, USA</td>
<td>Maus</td>
<td>1:1000</td>
</tr>
<tr>
<td>Polyklonal anti-GFP</td>
<td>Invitrogen, Carlsbad, CA, USA</td>
<td>Kaninchen</td>
<td>1:1000</td>
</tr>
<tr>
<td>Polyklonal anti-PV</td>
<td>Swant, Marly, Schweiz</td>
<td>Kaninchen</td>
<td>1:2000</td>
</tr>
<tr>
<td>Polyklonal anti-PSD95</td>
<td>Abcam, Cambridge, UK</td>
<td>Kaninchen</td>
<td>1:2000</td>
</tr>
<tr>
<td>Polyklonal anti-VGLUT1</td>
<td>Merck, Darmstadt, Deutschland</td>
<td>Meerschweinchen</td>
<td>1:5000</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Die Schnitte wurden anschließend 3 Mal für jeweils 10 Minuten in PBS mit 1% NGS bei Raum-temperatur gewaschen und mit den sekundären Antikörpern sowie 1.5% NGS für 3 Stunden inkubiert. Folgende sekundäre Antikörper wurden verwendet:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Antikörper</th>
<th>Bezugsquelle</th>
<th>Ursprung</th>
<th>Verdünnung</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Alexa-Flour 488 anti-mouse</td>
<td>Invitrogen, Carlsbad, CA, USA</td>
<td>Ziege</td>
<td>1:1000</td>
</tr>
<tr>
<td>Alexa-Flour 488 anti-rabbit</td>
<td>Invitrogen, Carlsbad, CA, USA</td>
<td>Ziege</td>
<td>1:1000</td>
</tr>
<tr>
<td>Cy3 anti-rabbit</td>
<td>Jackson Immuno-Research, Cambridgeshire, UK</td>
<td>Ziege</td>
<td>1:1000</td>
</tr>
<tr>
<td>Cy5 anti-guinea pig</td>
<td>Jackson Immuno-Research, Cambridgeshire, UK</td>
<td>Ziege</td>
<td>1:500</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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) eingedeckt.

### 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-Immersions-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-Immersions-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


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 Voxel. Anschließend wurde die durchschnittliche Anzahl an Dornenfortsätzen pro
Mikrometer entlang der longitudinalen Achse der Dendriten als Dornenfortsatz-Dichte ausge-rechnet.
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 µm 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 µm 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 bein- haltete 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 0.5µm und für VGLUT1 auf 0.6µm 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 darauffol- gend alle Cy3- und Cy5-Signale dargestellt, welche eine maximale Entfernung von 1µm zuei- nander hatten. Diese Entfernung liegt innerhalb der Begrenzung (0.7-2.5µm), 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 Substratbindingsstelle 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. *Corpus callosum* 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 parvalbuminerger 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

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 eingedeckt worden.


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

Abbildung 12: Beispiel der Dornenfortsatz-Detektion mit NeuronStudio

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 Schwellewert 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

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%) Dornenfortsätze bei den Gruppen aus dem enriched environment, wohingegen der Anteil von den thin (19% » 45%; 26% » 53%) Dornenfortsätze 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


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 0.5µm und für VGLUT1 auf 0.6µm 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 1µm 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 2 µm.


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 Dendritten parvalbuminerger 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

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

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
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-positive 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 (Hainmüller 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 (80 µm) eine optimale Permeabilisierung während der Immunhistologie verhindert haben könnte.


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 Exprimierung der PKC nicht blockiert wurde (siehe Abb. 3.4). Daraus kann geschlussfolgert 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.


**4.2 Dornenfortsatz-Morphologie**

auch die Annahme hervor, dass es sich hierbei um eine stabiler 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 Protein-kinase 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 neugebildeten 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...

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\(_A\)-Rezeptor-Bindung und -Phosphorylierung wirkt (Kullmann et al., 2012). Möglicherweise hat die Inhibition der PKC die Bindung von GABA\(_A\)-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 GABA-ergen Synapsen untersuchen und somit diese These überprüfen. Dies könnte durch eine zusätzliche Immunhistologie für inhibitorische Synapsen mit anti-VGAT und anti-GABA\(_A\) 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 (Hainmuller 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.


### 4.4 Ausblick


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).

5 Zusammenfassung


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


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 Themen-
gebiet 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-Univer-
sität 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 ex-
perimentelle 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 Amehyst 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 Ehtesl, Angelica Foggetti, Peer Wulff
Institute of Physiology, Kiel

1 Abstract

It has been recently shown in Prof. Wulff’s 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

a A Cre-recombinase–dependent Adeno associated virus (AAV) expressing green fluorescence protein (GFP) as reporter, with or without PKC inhibitor (PKCI), was injected in the dentate gyrus of two groups of PV Cre mice, respectively. In some cases, only PV IAs were infected and detectable.

b The enzyme Cre recombinase DNA is necessary. It can mediate excision of parallel loc sites or inversion of antiparallel loc sites.

3 Acquisition and Software Reconstruction

a Acquisition of immunohistochemistry fluorescent Neurons with the microscope in ZEN-format. Only intact Neurons were used.
b Images were converted from ZEN to 8 bit TIFF format for semi-automated filament tracing and spine analysis with NeuronStudio software. The scaling per pixel (5 μm/0.5 μm/0.2 μm) represented in ZEN has been reproduced in Neuron studio, so that measurements could be consistent. Manual editing of automated reconstruction was required.

4 Enriched Environment and spine density

a Two cohorts have been kept in an enriched environment to explore the possibility that dendritic spines of PV-positive neurons maybe subject to structural plasticity.
b The results show a significant lower density of spines for the PKC-inhibited cohorts. However the two cohorts of the enriched environment do not show a significant increase in comparisons, a strong trend was noticeable towards less spines for the enrichment.

5 Synapses

a High magnification of a dendritic segment of a GFP-positive neuron. Stained with anti-V-GLUT2, anti-PSD95 and anti-GFP antibodies, a, Image taken with ZEN software.
b Image from the same dendrite as in a processed with the software IMARIS. V-GLUT2–positive (purple) and PSD95–positive (orange) signals have been selected. White arrows indicate some spines.
c Density of synaptic inputs onto the apical dendrites was higher in the presence of PKC3. Both control and PKC1 groups show a reduction of synaptic inputs after exposure to enriched environment.

6 Spine morphologies

a Example of mushroom, thin and stubby spines on a dendrite.
b The ratio of stubby spines was higher after the inhibition of PKC. The cohorts of the enriched environment show a higher ratio of mushroom and stubby spines.

7 Conclusions

The presence of a PKC led to a significant lower density of spines, both in home cage and enriched conditions. The expression of PKC also resulted in a change of spine morphologies, towards a lower percentage of mushroom type, the most stable one. The synapse density was interestingly higher in the presence of PKC1, we assume due to an indiscriminate contact formation after the impairment of plasticity in these cells. Both control and PKC groups show 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 PKC.