



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Analyse von dendritischen Spines in Neuroserpin-Knockout Mäusen

Bachelorarbeit

im Studiengang
Biotechnologie

vorgelegt von

Rebecca Reumann
2001729

Hamburg-Bergedorf

am 21. März 2014

Gutachter: Prof. Dr. Oliver Ullrich (HAW Hamburg)

Gutachter: Prof. Dr. Markus Glatzel (UKE)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor der Neuropathologie des Campus
Forschung am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
in Zusammenarbeit mit der HAW Hamburg

Danksagung

Diese Bachelorarbeit wurde seitens der Hochschule für Angewandte Wissenschaften (HAW) Hamburg von Herrn Prof. Dr. Ullrich betreut. Für seine Bereitschaft dazu und die freundliche Betreuung bedanke ich mich sehr.

Die Erstellung dieser Arbeit erfolgte in der Neuropathologie des Campus Forschung am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter der Betreuung von Prof. Dr. Markus Glatzel. Ihm und Dr. rer. nat. Giovanna Galliciotti, Leiterin der Arbeitsgruppe um Neuroserpin, bin ich sehr dankbar für das Thema und die Möglichkeit diese Arbeit umzusetzen sowie für ihre Unterstützung und ihre stets wegweisenden Ratschläge.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich auch an Dr. Michaela Schweizer vom Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) richten, für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Versuche sowie ihrer Bereitschaft zum Korrekturlesen.

Vielen Dank auch an Dr. Antonio Virgilio Failla und Dr. Bernd Zobiak von der UKE Microscopy Imaging Facility (umif) für ihre Hilfe bei der mikroskopischen Analyse und der anschließenden Auswertung.

Bei allen Mitgliedern der Neuropathologie möchte ich mich sehr für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Anteilnahme am Verlauf meiner Bachelorarbeit bedanken.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt meiner Schwester Stephanie für ihre Hilfe und Unterstützung während dieser Arbeit und meines Studiums.

Lieben Dank an meine gesamte Familie!

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Vorwort.....	6
1.2 Aufgabenstellung.....	8
2 Grundlagen	9
2.1 Das Gehirn.....	9
2.2 Amygdala.....	11
2.2.1 Lage.....	11
2.2.2 Aufbau.....	11
2.2.3 Funktion.....	12
2.3 Der Hippocampus.....	14
2.3.1 Aufbau.....	14
2.3.2 Funktion.....	14
2.4 Spines.....	15
2.4.1 Klassifizierung.....	17
2.4.2 Warum ist die Morphologie der Spines so wichtig?.....	18
2.4.3 Aufbau.....	19
2.4.4 Das Aktinzytoskelett.....	21
2.4.5 LTP.....	22
2.4.6 Auswirkung der LTP auf die synaptische Plastizität von Spines.....	25
2.5 Neuroserpin.....	26
2.5.1 Expression.....	27
2.5.2 Funktionen.....	27
2.5.3 Pathologie.....	29
2.6 Spines in den Hirnregionen des Amygdala und des Hippocampus.....	30
3 Material und Methoden	31
3.1 Versuchstiere.....	31
3.2 Präparation der Versuchstiere.....	32
3.3 Gewebepräparation.....	32
3.4 Färbung des Gewebes mit DiI-Fluoreszenzmolekül.....	33
3.5 Konfokales Mikroskopieren und Bildanalyse.....	35
3.6 Analyse mit der Software Imaris.....	36
3.7 Statistische Analyse der Daten.....	41

4 Ergebnisse.....	42
4.1 Mikroskopische Analyse der Hirnregionen	42
4.2 Analyse der Spineanzahl.....	48
4.2.1 Anzahl der Spines im Hippocampus.....	49
4.2.2 Anzahl der Spines im Amygdala.....	50
4.3 Analyse der Spinemorphologie im Hippocampus.....	51
4.3.1 Spinelänge.....	54
4.3.2 Kopfbreite.....	55
4.3.3 Halslänge.....	59
4.3.4 Halsbreite.....	60
4.4 Analyse der Spinemorphologie in der Amygdala.....	62
4.4.1 Spinedichte.....	64
4.4.2 Kopfbreite.....	65
5 Diskussion.....	67
5.1 Vergleich der Spineanzahl im Hippocampus und Amygdala.....	67
5.2 Vergleich der morphologischen Eigenschaften dendritischer Spines.....	69
5.2.1 Hippocampus: Kopfbreite.....	69
5.2.2 Hippocampus: Halsbreite.....	70
5.2.3 Hippocampus: Halslänge.....	70
5.2.4 Veränderungen der Spinemorphologie im Hippocampus.....	70
5.2.5 Amygdala: Kopfbreite.....	71
5.2.6 Amygdala: Spinedichte.....	72
5.2.7 Veränderung der Spinemorphologie im Amygdala.....	72
5.3 Etablierung der Methode im Hippocampus und Amygdala.....	73
5.4 Ursachen für eine geringere Ausbeute an signifikanten Daten im Amygdala.....	74
5.4.1 Kein signifikanter Unterschied zwischen WT und KO.....	74
5.4.2 Hirnregion.....	74
5.4.3 Auswahl der Hirnschnitte.....	75
5.4.4 Zelldichte.....	76
5.5 Ausblick.....	77
6 Zusammenfassung.....	78
7 Abkürzungen.....	80
8 Fachbegriffe.....	81

9	Abbildungsverzeichnis.....	84
10	Literaturverzeichnis.....	86

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Dendritische Spines sind kleine Ausstülpungen, die aus dem Schaft eines neuronalen Dendriten hervortreten. Es handelt sich dabei um sehr dynamische Strukturen, die häufig den postsynaptischen Teil einer Synapse darstellen [1]. Sie werden auch als die „dynamischen Bausteine des Gedächtnisses“ bezeichnet [2]. Spines empfangen die exzitatorischen Signale der präsynaptischen Seite und erstellen eine dazu passende postsynaptische Antwort.

Sie sind sehr heterogen in Bezug auf Größe und Gestalt [1] und ändern ihre Morphologie in Abhängigkeit mit der Aktivität „ihrer“ Synapse im neuronalen Netzwerk [2].

Dendritische Spines zeigen damit ein hohes Maß an Plastizität. Sie sind in der postnatalen Entwicklung sehr dynamisch in Bezug auf ihre Gestalt, werden aber mit zunehmenden Alter stabiler.

Veränderungen in der Morphologie sind dann nur noch durch Lernprozesse, in die sie involviert sind, oder auf pathologische Gegebenheiten zurückzuführen [3].

Es wurde herausgefunden, dass in zahlreichen psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie, Depressionen sowie Angstzuständen ihre Morphologie und Dichte abnormal verändert ist [4][3] [5].

Neuroserpin (Ns) ist ein Serin Protease Inhibitor und ein Mitglied der Protein Superfamilie der Serpine. Es wird hauptsächlich von Neuronen im sich entwickelnden und adulten Nervensystem exprimiert. Bei Neuroserpin handelt es sich um ein Glykoprotein, welches im Hippocampus, Amygdala und anderen Hirnregionen sekretiert wird [6].

Die Expression von Neuroserpin während der Entwicklung und im adulten Gehirn deutet daraufhin, dass das Protein eine wichtige Rolle in der Bildung von Neuriten und Synapsen spielt, also während der synaptischen Plastizität [7]. Mit Hilfe von Studien zu dem bisher noch recht unbekanntem Protein, konnte zum Einen festgestellt werden, dass eine Überexpression von Ns eine Veränderung in der Morphologie und der Dichte von dendritischen Spines bewirkt. Dafür wurden primäre hippocampale Neuronen mit Ns transfektiert, um zu prüfen, ob eine höhere Neuroserpinexpression einen Effekt auf diese Neuronen hat [7].

Zum anderen wurde nachgewiesen, dass Neuroserpin einen Einfluss bei psychiatrischen Erkrankungen, wie der Schizophrenie, zu haben scheint [8] [9] [10]. Die genaue Wirkung des Proteins auf diese Krankheit ist bisher noch nicht ermittelt worden.

Des Weiteren konnte Neuroserpin auch ein Einfluss auf das emotionale Verhalten nachgewiesen werden. Man hat in Studien herausgefunden, bei denen Neuroserpin deletierte Mäusen bezüglich ihrer Bewegungsfähigkeit und ihres Verhaltens in einer Reihe von Tests analysiert wurden, dass eben jene Knockout Tiere einen veränderten und sehr ängstlichen Phänotyp entwickeln [11].

Es handelt sich bei Neuroserpin also um ein Protein des Nervensystems, welches noch nicht ausreichend erforscht wurde, um die Hintergründe für seine unterschiedlichen Funktionen, wie auch Auswirkungen auf die Morphologie von Spines, auf die Synaptogenese sowie das abnormale Verhalten bei der Gen-Überexpression oder dem Knockout erklären zu können.

Um den Stand der Forschung zu erweitern und mehr über Neuroserpin herauszufinden, ist das Ziel dieser Bachelorarbeit eine morphologische Analyse von dendritischen Spines bei Neuroserpin-Knockout Mäusen, in den Hirnregionen des Hippocampus und der Amygdala. Auf diese Weise erhofft man sich mehr Information über die Verbindung zwischen den Veränderungen an den

Spines und den abnormalen Verhalten dieser Mäuse in Erfahrung bringen zu können, denn die Analyse von Spines in Neuroserpin-Knockout Mäusen wurde in dieser Art und Weise noch nicht durchgeführt. Bisher ist nur bekannt, welche Auswirkung die Überexpression von Neuroserpin auf die dendritischen Spines hat [7], nicht jedoch die Veränderungen als Folge eines Gen-Knockouts von Neuroserpin.

1.2 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit ist es eine morphologische Untersuchung von dendritischen Spines in Neuroserpin-Knockout Mäusen (NsKO) durchzuführen. Auf diese Weise soll festgestellt werden, ob Neuroserpin eine Wirkung auf die Gestalt von Neuronen im Gehirn hat.

Dazu werden die Daten der Analyse von Ns-KO Mäuse mit denen des Wildtyps verglichen. Die Analyse wird in verschiedenen Hirnregionen, Hippocampus und Amygdala, durchgeführt, in denen bereits eine hohe Neuroserpinexpression nachgewiesen werden konnte [6].

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit sollen daher unterschiedliche Parameter bezüglich der dendritischen Spines gemessen und analysiert werden.

Es wird getestet, welchen Einfluss Neuroserpin auf die Anzahl und auf die Dichte an Spines pro μm Dendrit in der jeweiligen Hirnregion hat.

Um die Auswirkungen auf die Morphologie zu ermitteln, werden zudem bestimmte Schlüsselparameter, die charakteristisch für Spines sind, ausgemessen.

Diese beinhalten die absolute Länge, die charakteristische Kopfbreite sowie die Halslänge und -breite von jedem Spine auf dem Zieldendriten.

Um diese Analysen an den Spines durchführen zu können, werden drei Wochen alte Mäuse zunächst perfundiert, die Gehirne entnommen, fixiert und koronal in einzelne Segmente geschnitten. Die Gewebeschnitte werden anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Unter dem konfokalen Mikroskop werden Bilder vom Dendriten aufgenommen, die dann anschließend mit einer Analysesoftware ausgewertet werden können.

Die Ergebnisse der Arbeit dienen der Erforschung, ob Neuroserpin einen Einfluss auf die Morphologie dendritischer Spines ausübt.

Sollten die Resultate darauf hindeuten, dass es zu Veränderungen kommt, kann man daraus womöglich Rückschlüsse auf den ängstlichen Phänotyp von Neuroserpin-Knockout Mäusen ziehen und daraus schließen, inwiefern die beiden unterschiedlichen Hirnregionen daran beteiligt sein könnten.

2 Grundlagen

2.1 Das Gehirn

Das Gehirn (Abbildung 1) stellt die Zentrale des Nervensystems dar und steuert alle lebensnotwendigen Körperfunktionen [12]. Über das Gehirn wird es dem Menschen ermöglicht Gedanken, Hoffnungen, Träume, Wünsche und Emotionen zu besitzen, was schließlich auch seine Persönlichkeit ausmacht [13]. Wahrnehmung und Reaktionen auf Sinneseindrücke sowie die Koordination von Bewegungen sind alles Resultate des Nervensystems [12].

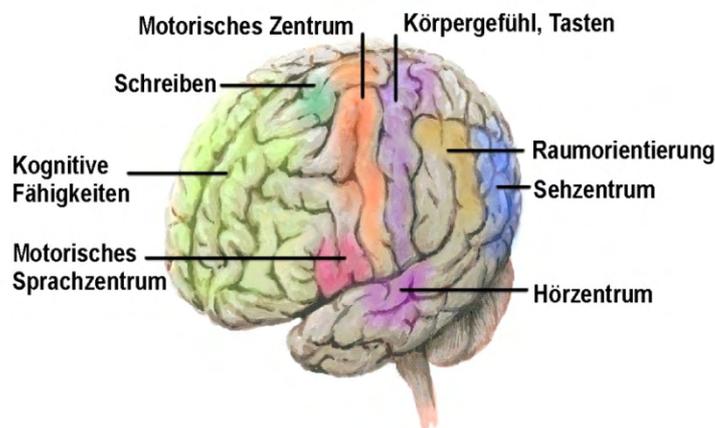


Abbildung 1: **Überblick über das menschliche Gehirn und seine Funktionen.** Es ist zu erkennen, dass es viele Bereiche im Gehirn gibt, die jeweils für unterschiedliche Funktionen verantwortlich und für den Organismus selbst sehr wichtig sind [51].

Die sogenannte Basiseinheit des Nervensystems [14], aus welcher auch das Gehirn zum größten Teil besteht [12], stellt die Nervenzelle, das Neuron, dar. Über Neuronen können elektrische Impulse weitergeleitet werden. Die Übermittlung dieser Impulse erfolgt über chemische Reaktionen [14]. Verbindungen zwischen verschiedenen Nervenzellen können sehr komplex sein und gerade diese Komplexität ist im Gehirn von besonders großem Ausmaß: bis zu 10.000 oder mehr Verbindungen können Nervenzellen dort mit anderen Neuronen eingehen [12].

Ein typisches Neuron besteht aus einem Zellkörper, dem Soma, welches den Zellkern enthält, und aus Fortsätzen, die vom Soma abzweigen, den sogenannten Dendriten. Es gibt einen besonders langen und ausgeprägten Fortsatz, das Axon. Über die Dendriten werden elektrische Impulse von Nachbarneuronen aufgenommen und zum Soma weitergeleitet. Das Axon wiederum führt diese Erregungen vom Soma weg und überträgt sie auf die Dendriten benachbarter Neuronen [15].

Es gibt verschiedene Arten von Neuronen (Abbildung 2). Je nach Form, Größe des Somas, Länge sowie Art des Verzweigungsmusters und anderen Kriterien lassen sich Nervenzellen in unterschiedliche Typen unterscheiden. Die Pyramidenzellen (in Abbildung 2 als c1 dargestellt) sind sogenannte Projektionsneurone, die als Neurotransmitter neben Glutamat auch GABA enthalten. Ihre Somaform ähnelt der einer Pyramide. Die Spitze ist zur Hirnoberfläche ausgerichtet. An dieser Spitze befindet sich der Hauptfortsatz der Zelle, der apikale Dendrit,

welcher orthogonal zur Hirnoberfläche wächst und sich in zahlreiche Dendriten verzweigt. Weitere Dendriten gehen vom Soma des Neurons ab, die als basale Dendriten bezeichnet werden.

An allen Dendriten befinden sich kleine Ausstülpungen, die auch Spines genannt werden. Das Axon dieses Zelltyps entspringt direkt am Zellsoma oder auch an einem Stamm der Basaldendriten [16].

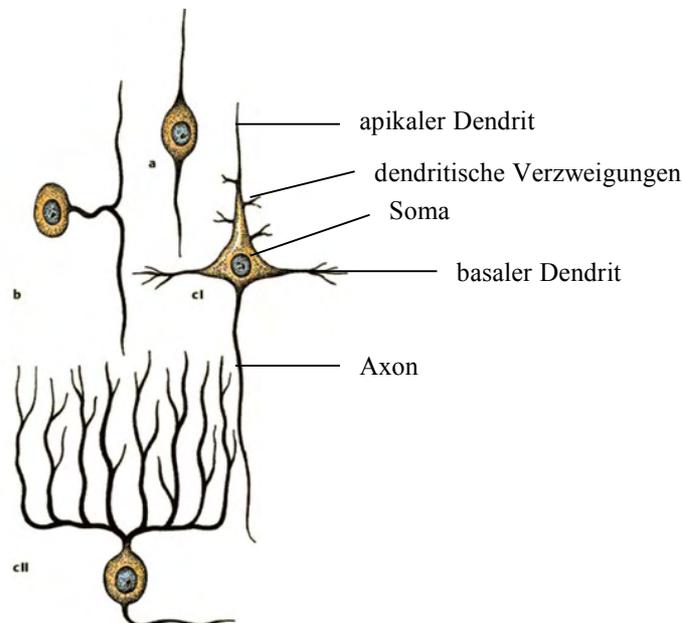


Abbildung 2: **Verschiedene Typen von Neuronen.** Bild a zeigt ein bipolares Neuron mit nur einem Dendriten und einem Axon. In b) ist ein sogenanntes pseudounipolares und in c) sind multipolare Neuronen dargestellt: I) zeigt eine Pyramidenzelle und II) den Purkinjezelltyp. Anhand der Pyramidenzelle ist der Aufbau eines solchen Typs beschrieben. Vom Zellkörper, dem Soma, zweigen ein einzelnes Axon, ein apikaler Dendrit, der orthogonal zur Hirnoberfläche ausgerichtet ist und zahlreiche basale Dendriten ab. Abbildung bearbeitet [16].

Das Gehirn ist in verschiedene Regionen eingeteilt.

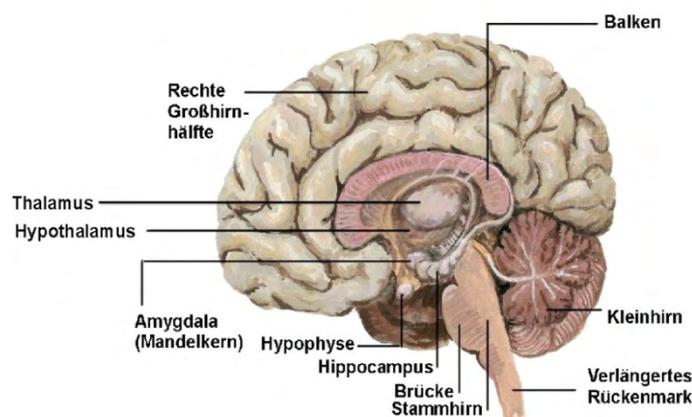


Abbildung 3: **Querschnitt durch das menschliche Gehirn.** Auf diesem Bild sind die einzelnen Hirnregionen und ihre jeweilige Lage veranschaulicht. In dieser Arbeit werden die Hirnregionen des Hippocampus und der Amygdala untersucht [51].

Jede dieser Regionen hat unterschiedliche Einflüsse auf den Organismus und ist in verschiedene Funktionen des Körpers involviert (Abbildung 1) [17]. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Bereiche des Hippocampus und der Amygdala genauer betrachtet.

2.2 Amygdala

2.2.1 Lage

Die Amygdala ist ein Teilbereich des limbischen Systems [18], befindet sich im medialen Teil des Temporallappens (siehe Abbildung 4) und weist eine mandelförmige Struktur auf, die ihr auch den deutschen Namen „Mandelkern“ [17] verleiht.

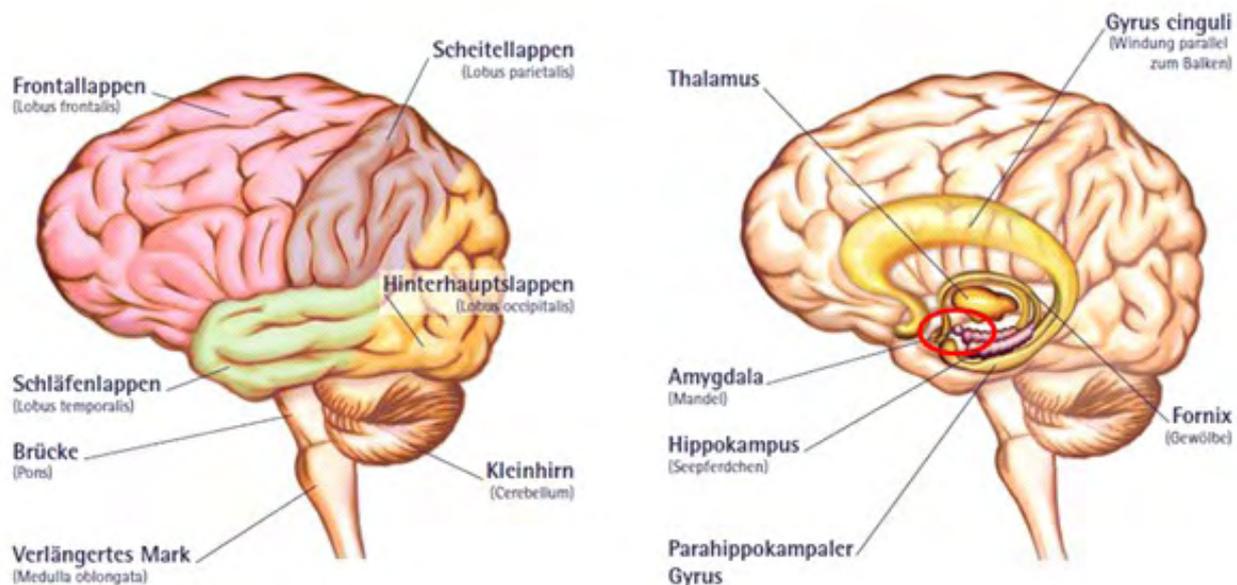


Abbildung 4: **Aufbau des menschlichen Gehirns und Lage von Amygdala und Hippocampus.** Links ist die Einteilung des Gehirns in einzelne Bereiche und Lappen dargestellt. Rechts sind durch einen Längsschnitt die einzelnen Hirnregionen abgebildet. Zu erkennen ist rechts die Lage der Amygdala im medialen Temporallappen. Der Bereich ist rot hervorgehoben. Abbildung bearbeitet [52].

2.2.2 Aufbau

Der Aufbau der Amygdala ist sehr komplex durch die große Vielfalt an Kernen, die das Amygdala bilden. Der sogenannte amygdaloide Komplex, die gesamte Amygdala, beinhaltet 13 verschiedene Nuklei. Im Wesentlichen kann die Amygdala jedoch in 3 Kerngebiete klassifiziert werden: die zentromediale Kerngruppe, der tiefe oder auch basolaterale Komplex und die kortikale oder auch oberflächliche Kerngruppe, die alle jeweils aus einer unterschiedlichen Anzahl an Kernen bestehen [19].

Man kann die Amygdala in zwei funktionelle Untereinheiten differenzieren: dem basolateralen Komplex (BLA) und den zentralen Kern der Amygdala (CeA) [18]. Beide sind in der Abbildung 5, im rechten Bild, dargestellt. Der basolaterale Komplex beinhaltet, auf dieser bearbeiteten Hellfeldmikroskopie eines mit Nissl-gefärbten koronalen Schnittes eines Rattengehirns, die laterale

[21] sowie mit Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht werden. Anhand des Klüver-Bucy-Syndroms, bei dem Teile des Temporallappens mit Uncus, die Amygdala und Bereiche des Hippocampus bei Rhesusaffen entfernt wurden, ist herausgefunden worden, dass diese Tiere neben einer emotionalen Blindheit, auch einen Mangel an Angst [17] und ein abnormes emotionales Verhalten aufwiesen [18].

Der basolaterale Komplex spielt eine wichtige Rolle im Prozess der Angstkonditionierung, welcher durch visuelle und auditorisch konditionierte Stimuli eingeleitet wird. Die Projektionen, die im basolateralen Komplex entstehen, werden an das zentrale Amygdala weitergeleitet. Die angstbedingten Reaktionen werden durch Projektionen zum lateralen Hypothalamus und zum periaquäduktären Grau, welches Angst- und Fluchtreflexe koordiniert, generiert. Aus diesem Grund eignet sich die Amygdala ideal, um sensorische Informationen zu integrieren und zu assoziieren, sowie motorische Vorgänge während des Prozesses der Angstkonditionierung auszulösen [17].

Man hat herausgefunden, dass die Amygdala eine starke reziproke, wechselseitige Verbindung zum Cortex und zum Hippocampus aufweist [17] und dass der Hippocampus auch zu allen Regionen des BLA-Komplexes projiziert [20]. In Abbildung 6 ist die Verbindung der unterschiedlichen Hirnregionen abgebildet, wie sie unter Stresseinwirkung miteinander wechselwirken. Eine direkte Verbindung besteht zwischen der CA1-Region des Hippocampus und dem lateralen Kern des basolateralen Komplexes der Amygdala [17]. Die Neuronen jener Hirnregionen unterliegen der sogenannten strukturellen Modifikation, welche in Folge der Expression von Stress und angstbezogenem Verhalten involviert sind [5]. Man konnte herausfinden, dass LTP gerade der synaptische Mechanismus ist [20], welcher der Angstkonditionierung unterliegt und für derartige Modifikationen in Neuronen verantwortlich ist [5].

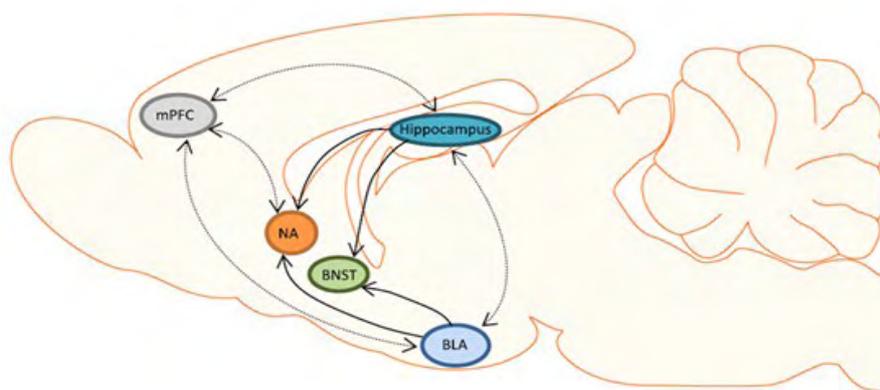


Abbildung 6: **Das neuronale Netzwerk unter Stresseinwirkung.** Dieser sagittale Schnitt zeigt die direkten Verknüpfungen zwischen den Hirnregionen des Hippocampus, dem medialen präfrontalen Cortex (mPFC), dem basolateralen Komplex der Amygdala, dem Bettkern der stria terminalis (BNST) und dem Nucleus accumbens (NA). Die Neuronen dieser Regionen unterliegen strukturellen Modifikationen, die als Antwort auf stressreiche Erfahrungen erfolgen. Diese Modifikationen scheinen bei der Expression von stress- und angst-bezogenen Verhalten mitzuwirken [5].

Die Amygdala ist also mit vielen verschiedenen Strecken und Verbindungen ausgestattet, über welche Angstinformationen bearbeitet und auf unbestimmte Zeit gespeichert werden können [18]. Durch die Komplexität ihrer Funktionen im neuronalen Netzwerk können Störungen der Struktur verheerende klinische Folgen mit sich ziehen [17].

2.3 Der Hippocampus

2.3.1 Aufbau

Der Hippocampus ist, wie auch die Amygdala, ein Teil des limbischen Systems [22] (siehe Abbildung 4). Er liegt im medialen Bereich des Temporallappens und man kann ihn in einem Frontalschnitt an seiner charakteristischen Erscheinung eines eingerollten Bandes, dem sogenannten Ammonshorn, Cornu ammonis (CA), welches eine Vorwölbung in die Seitenventrikel zeigt, erkennen [23]. Die hippocampale Struktur setzt sich aus dem Hippocampus und dem Subiculum, mit welchem es verbunden ist, zusammen [24].

Der Hippocampus besteht aus verschiedenen Bereichen, dem Gyrus dentatus (Fascia dentata), dem Cornu ammonis (Regionen CA1-CA4) sowie dem Subiculum (Subikularkomplex, SB) [22]. Der Aufbau ist in Abbildung 7 dargestellt.

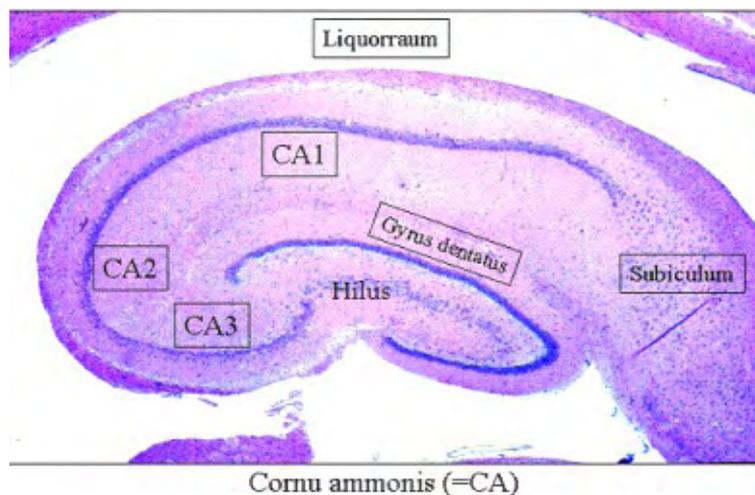


Abbildung 7: **Aufbau des Hippocampus.** Dargestellt ist ein Frontalschnitt, auf dem man das Ammonshorn, Cornu Ammonis (CA), die charakteristische Krümmung des Hippocampus, erkennen kann. Es stellt die sogenannte Rindenstruktur des Hippocampus dar und ist in vier Abschnitte gegliedert: Die Region um CA1 und CA2, der CA3-Bereich sowie der Hilus und das Körnerzellband des Gyrus dentatus. Als Subiculum wird das Übergangsgebiet zwischen dem Ammonshorn und der entorhinalen Rinde bezeichnet. Abbildung bearbeitet [23].

Das Cornu ammonis bildet die sogenannte Rindenstruktur des Hippocampus und kann in 4 verschiedene Abschnitte gegliedert werden. Bei den Neuronen in den Regionen CA1 und CA2 handelt es sich um sehr dicht gepackte Pyramidenzellen. In der CA3-Region und dem sogenannten Hilus ist die Packstruktur dieser Neuronen etwas aufgelockert. Die Hilusregion wird durch die Körnerzellen des Gyrus dentatus umgeben. Das Subiculum liegt zwischen dem Cornu ammonis und der entorhinalen Rinde im Übergangsgebiet [23].

2.3.2 Funktion

Der Hippocampus ist durch die Verknüpfungen mit dem Hypothalamus, den Septumkernen und Gyrus cinguli an endokrinen, viszeralen sowie emotionalen Abläufen beteiligt. Des Weiteren

vermittelt er auch die Bildung von Langzeiterinnerungen [24]. Seine Kernaufgabe jedoch besteht in der Involvierung von Lern- und Gedächtnisprozessen [23]. Verletzungen und Störungen des Hippocampus bewirken eine anterograde Amnesie. Die Patienten sind dann nicht mehr in der Lage neue Erinnerungen zu bilden, können aber alte Erinnerungen bewahren. Der Hippocampus speichert die Erinnerungen temporär durch die sogenannte langzeitige synaptische Plastizität ab und überliefert diese Erinnerungen selber zum Neocortex, indem er eine Wiedergabe von Aktivitätsmustern, die durch entsprechende Ereignisse ausgelöst wurden, in den parietal, temporal und frontal assoziierten Cortex einleitet. Diese kortikalen Einheiten bilden schließlich ihre eigenen gespeicherten Repräsentationen jener Ereignisse [24].

Der Hippocampus empfängt multimodale, sensorische und räumliche/dreidimensionale Informationen [25] über die sogenannten afferenten Fasern [23] vom nahegelegenen entorhinalen Cortex. Der größte Output des Hippocampus erfolgt über die Pyramidenzellen der CA1-Region, welche die Signale zurück zum entorhinalen Cortex und zum Subiculum projizieren. Die CA1-Neuronen sind scheinbar für den Lernprozess und die Gedächtnisbildung im Hippocampus sehr wichtig, denn man konnte einen schwerwiegenden Verlust an Erinnerungen bei Patienten beobachten, die in eben jener Region Läsionen aufweisen [25].

2.4 Spines

Dendritische Spines wurden Ende des neunzehnten Jahrhunderts das erste Mal von Cajal entdeckt. Aktuelle Studien lassen vermuten, dass die Struktur von Spines erst die Regulation von individuellen synaptischen Kontakten möglich macht. Spines scheinen die elementare Einheit des Gedächtnisses zu repräsentieren und sind von enormer Wichtigkeit für die Plastizität des menschlichen Gehirns [2].

Bei dendritischen Spines handelt es sich um kleine Protrusionen, Ausstülpungen, die aus dem Schaft von Dendriten der meisten Neuronen eines Säugetiergehirns hervortreten [26]. Sie repräsentieren den postsynaptischen Teil der meisten exzitatorischen Synapsen. In der Abbildung 8 ist ein solcher Spine, grün umrandet, dargestellt [27].

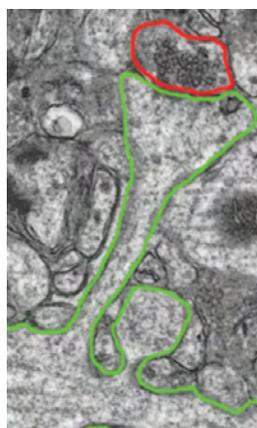


Abbildung 8: **Aufbau einer Synapse aus Spine und Axon.** Dargestellt ist Struktur von einem dendritischen Spine einer Pyramidenzelle des Hippocampus. Ein „mushroomspine“ (grün umrandet) bildet mit einem einzelnen präsynaptischen Terminus, Axon (rot umrandet), eine Synapse im stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus einer organischen Schnittkultur (organic slice culture) [21].

Dabei reflektiert die Anzahl der Spines die Anzahl der Synapsen und ist damit ein Maß für die Konnektivität. Die Kopfgröße hingegen spiegelt die Stärke der synaptischen Übertragung eben jener Verbindung wieder [28]. Die Struktur eines Spines korreliert somit mit dem „Gewicht“, die seine Synapse im neuronalen Netz einnimmt [2]. Eine Veränderung der Spineanzahl und des Kopfdurchmessers impliziert also eine funktionell wichtige neuronale Plastizität [28].

Dendritische Spines besitzen verschiedene Funktionen. Sie empfangen die exzitatorischen Signale, die von der präsynaptischen Seite anderer Neuronen stammen, [29] und teilen sie in postsynaptische Antworten auf [1]. Sie stellen damit den Hauptsitz für den synaptischen Input von den Neuronen des Nervensystems dar [4]. Ihre wichtigste Funktion ist die Regulierung des Ausmaßes der exzitatorischen Neurotransmission [5], indem sie die Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat vom präsynaptischen Terminus steuern [30]. Eine weitere wichtige Funktion ist die Gliederung und Koordination der lokalen postsynaptischen Signalwege und die Begrenzung der Diffusion von postsynaptischen Molekülen [31].

Dendritische Spines haben keine feste bzw. starre Struktur, sondern ändern ihre Gestalt in Abhängigkeit der neuronalen Aktivität und auf diese Weise auch ihren Beitrag zur synaptischen Signalübertragung [2]. Sie zeigen also eine hohe Plastizität, ganz besonders während der postnatalen Entwicklung, wenn eine enorme Anzahl synaptischer Verbindungen innerhalb kürzester Zeit entsteht. Abbildung 9 zeigt die Veränderungen in der Gestalt von dendritischen Spines, die aus einer sich veränderten synaptischen Plastizität resultiert. Es kommt innerhalb weniger Tage sehr schnell zu einer Spinebildung (4,6,7) und zu dem Verlust von Spines (8+10). Spines ändern damit ihre Morphologie sehr dynamisch [32].

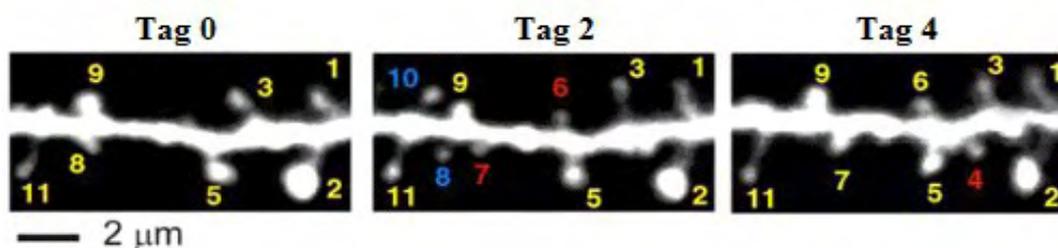


Abbildung 9: Strukturelle Dynamik von dendritischen Spines. Schnelle und langsame Veränderungen in Spinegestalt und -größe resultieren in schnellen und langsamen synaptischen Plastizitäten. Die Bilder von gezüchteten Hippocampus-Gewebeschnitten wurden mit einem 2-Photonen-Laser-Scan-Mikroskop aufgenommen. Langsame intrinsische Fluktuationen in der Spinegröße treten in Gegenwart eines NMDA-Rezeptor Inhibitors über mehrere Tage hinweg auf. Die Spines zeigen relativ langsame Veränderungen in der Größe. Die Struktur der Spines bleibt damit über diesen Zeitraum recht stabil. Die Spinebildung (Spine 4, 6, 7) und die Auslöschung (8 und 10) geschehen sehr schnell. Das Volumen der Spines wächst und schrumpft damit sehr dynamisch [32].

Wenn die Tiere erwachsen werden, scheinen die Spines etwas an ihrer hochdynamischen Art zu verlieren. Die Spines wirken dann auffallend stabil. Viele von ihnen behalten ihre Struktur ihr Leben lang bei. Aus diesem Grund sind Veränderungen der Morphologie und der Anzahl nur durch Lernprozesse oder aufgrund von pathologischen Gegebenheiten zu erklären [3]. Kleine Spines können ihre Form sehr schnell ändern, entweder sie entwickeln sich zu großen Spines, wenn eine hohe neuronale Aktivität vorliegt, oder sie bilden sich zurück und verschwinden. Neue Spines entwickeln sich demnach oder werden bedingt durch die Intensität der neuronalen Aktivität, die mit der Einleitung der LTP, Langzeit-Potenzierung, einhergeht, ausgelöscht. Veränderungen in der Spinemorphologie können also mit dem Prozess des Lernens und des Erinnerns assoziiert werden

[30]. Möchte man sich beispielsweise eine Telefonnummer merken, dann bildet sich aufgrund dieser Aktivität ein neuer Spines bzw. eine neue Synapse für das Erinnern an diese Nummer aus. Ruft man die Telefonnummer immer wieder ab, bleibt die synaptische Übertragung, aufgrund der stabilen neuronalen Aktivität, vorhanden. Wird die Telefonnummer jedoch nicht mehr benötigt, lässt die Intensität dieser neuronalen Verknüpfung mit der Zeit immer mehr nach und der Spine bildet sich zurück. Irgendwann ist der Spine, somit die synaptische Übertragung, ausgelöscht und aufgrund dessen die Telefonnummer vergessen. Sieht man sich diese Nummer nach einer langen Zeit wieder an, erkennt man sie nicht mehr und man muss sie erst wieder neu „lernen“, also eine neue Verknüpfung ausbilden.

In zahlreichen Studien konnte herausgefunden werden, dass die Morphologie und die Dichte von Spines in vielen psychiatrischen Erkrankungen abnormal verändert sind. Beispiele dafür sind Schizophrenie, Depression und Angstzustände [4][3][5].

2.4.1 Klassifizierung

Dendritische Spines einer einzelnen Nervenzelle sind höchst heterogen in Bezug auf ihre Größe und ihre Gestalt [33]. Trotzdem kann man sie, aufgrund ihrer unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften, in einzelne Klassen differenzieren.

Dadurch, dass die Übergänge zwischen den einzelnen Formen manchmal aber auch fließend sein können, gestaltet sich die Zuweisung der jeweiligen Klasse in diesen Fällen als sehr schwierig.

Die drei typischen Klassen bezüglich der Spinemorphologie sind in der folgenden Abbildung 10 dargestellt [2].

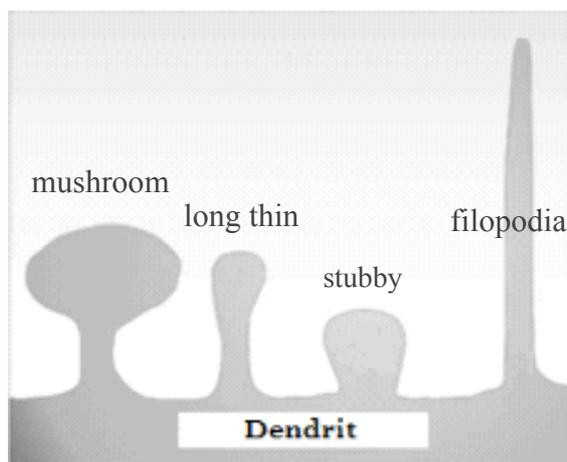


Abbildung 10: **Klassifizierung der unterschiedlichen Spinearten.** Je nach ihrer Gestalt können Spines in verschiedene Kategorien eingeteilt werden. „mushrooms“ haben einen großen pilzförmigen Kopf und einen schmalen, recht kurzen Hals. „thins“, oder auch „long thins“ genannt, weisen einen langen dünnen Hals und einen kleinen knollenartigen Kopf auf. Die „stubbys“ besitzen weder einen eindeutigen Kopf noch einen Hals, sie sind eher stummelförmig. Die „filopodia“ werden als die Vorläufer der Spines angesehen und sind sehr lang und dünn ohne einen ersichtlichen Kopf. Abbildung bearbeitet [4].

Eine Klasse ist die der „stubbys“, kleine stummelförmige Spines, die keinen Kopf besitzen [33]. Man vermutet, dass es sich dabei um Spines handelt, die keinen präsynaptischen Partner besitzen. Entweder versuchen sie gerade einen Kontakt aufzubauen oder sie ziehen sich nach Verlust eines Partner gerade in ihrer Form zurück [2]. Eine weitere Klasse ist die der dünnen, „thin“, Spines, die am meisten vertreten sind. Sie weisen einen langen dünnen Hals und einen kleinen, knollenartigen Kopf auf. Die pilzartigen „mushroom“ Spines bilden die letzte Gruppe. Sie besitzen einen großen pilzförmigen [33] und sehr voluminösen Kopf und sind in großer Anzahl im adulten Gehirn vorzufinden. Es gibt auch noch eine Gruppe von besonders langgestreckten dendritischen Protrusionen, die sogenannten „filopodia“. Sie besitzen keinen ausgeprägten Kopf. Damit fehlen ihnen die typischen Spine-Merkmale und aus diesem Grund werden sie auch nicht als Spines klassifiziert [2]. Filopodia können eine Länge von bis zu 5µm aufweisen und sind aufgrund ihres langen und dünnen Halses sehr beweglich. Dieser erleichtert ihnen die Suche nach einem präsynaptischen Partner während der Synaptogenese. Da die filopodia hauptsächlich im sich entwickelnden Gehirn, im frühen, postnatalen Stadium, vorzufinden sind und im adulten Gehirn schrumpfen, hat man heute die Vermutung, dass sie als Vorläufer von dendritischen Spines, während der Bildung der Synapsen, fungieren [33].

2.4.2 Warum ist die Morphologie der Spines so wichtig?

Die Morphologie ist von großer Bedeutung, weil sie ein Zeichen für die synaptische Plastizität und die Stärke von synaptischen Verbindungen ist. Es gibt eine starke Korrelation zwischen der Größe des Spinekopfes und der Stärke einer Synapse. Dies liegt wahrscheinlich darin begründet, dass reife, große Spines auch eine größere Anzahl von AMPA-Rezeptoren (Aminomethylphosphonsäure-Rezeptoren), den verbreitetsten Neurotransmitter-Rezeptoren des Zentralnervensystems, besitzen, die ein Zeichen für hohe synaptische Aktivität sind. Die kleineren, schwächeren und sehr dynamischen Spines sind bevorzugt der Langzeit-Potenzierung ausgesetzt und repräsentieren die sogenannten „plasticity spines“, die im Lernprozess involviert sind. Die großen, reifen Spines sind sehr stabil, zeigen weniger Plastizität, stellen mit ihren voluminösen, ausgeprägten Köpfen aber ein Zeichen für eine starke, stabile synaptische Verknüpfung dar, wie sie bei der Speicherung von Erinnerungen erforderlich ist. Aus diesem Grund werden sie auch als „memory spines“ bezeichnet. Aber nicht nur die Größe und die Gestalt der Spines sind wichtig im Zusammenhang mit Plastizität, sondern auch die Anzahl. Es konnte in Studien herausgefunden werden, dass ein räumliches Training von adulten Ratten zu einem Anstieg der Lernfähigkeiten führt und ein signifikanter Anstieg in der Spinedichte in hippocampalen Neuronen zu verzeichnen ist. Diese Dichte scheint damit den Anstieg der Dichte des exzitatorischen Inputs an eben jenen Neuronen zu reflektieren. Man kann also sagen, dass bestimmte Formen des Lernprozesses wie LTP, dem Hauptmechanismus, der Lernen und Erinnern unterliegt, zu einem Anstieg der Dichte von Spines führen kann [27].

2.4.3 Aufbau

Eine Synapse besteht aus einer präsynaptischen Seite, meistens dem Axon, dem postsynaptischen Bereich, welchen in vielen Synapsen die Spines darstellen, und den sich dazwischen befindenden und gut-definierten synaptischen Spalt [34].

Ein Spine selbst besteht aus drei Grundbausteinen: der deltaförmigen Basis, der Verbindung des Spines mit dem dendritischen Schaft, einem schmalen Hals und einem knollenartigen Kopf (s. Abbildung 11).

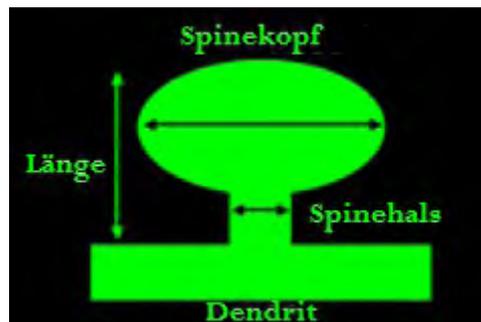


Abbildung 11: **Aufbau eines Spines.** Dieses Cartoon zeigt die geometrischen Dimensionen, die in jedem individuellen Spine gemessen werden, um ihn zu kategorisieren. Abgebildet sind der Spinekopf, der Spinehals und der Dendrit, aus welchem der Spine hervorgeht. Abbildung bearbeitet [21].

Die Länge der Spines kann zwischen 0,2 und 2 μm variieren [31]. In Ausnahmen beträgt diese auch bis zu 3 μm [2]. Das Volumen der Spines schwankt zwischen 0,001 und 1 μm^3 [31]. Das sehr kleine Volumen der Spines lässt darauf schließen, dass das Neuron versucht den synaptischen Empfänger möglichst kompakt zu halten, damit auf der einen Seite die Anzahl möglicher präsynaptischer Partner relativ hoch ist und auf der anderen Seite das entstehende postsynaptische Signal höchst effizient verarbeitet werden kann. Der Begriff „Nanoreaktor“ beschreibt einen Spine sehr gut, denn schon kleinste Mengen Substrat scheinen auszureichen, um eine chemische Reaktion im Inneren des Reaktors stattfinden zu lassen [2].

Ein dendritischer Spine beinhaltet die komplette postsynaptische Maschinerie (Abbildung 12). Dazu gehören die Glutamatrezeptoren, die sogenannte PSD-Region, das Aktinzytoskelett, viele membrangebundene Organellen, wie das SER, Mitochondrien und Endosomen sowie die endozytotische Zone (EZ) [31].

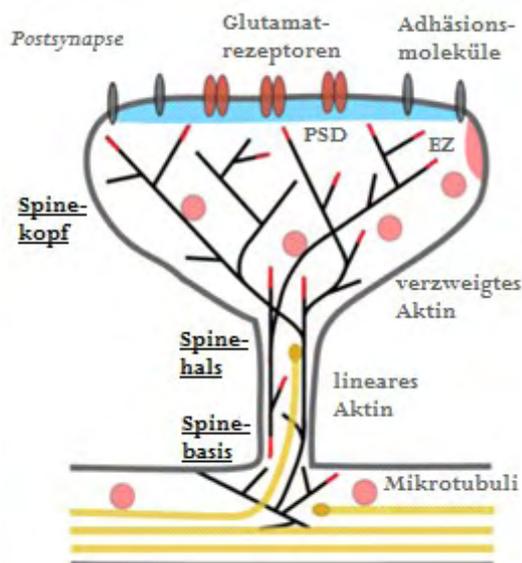


Abbildung 12: **Schema eines reifen "mushroom" Spines.** Abgebildet sind die postsynaptische Membran mit der postsynaptic density, der PSD-Region (blau), die Adhäsionsmoleküle (grau), sowie die Glutamatrezeptoren (rotbraun), das Aktinzytoskelett (schwarze Linien), das Mikrotubuliskelett (gelb) und andere Organellen. Die endozytotische Zone (EZ) befindet sich seitlich, neben der PSD-Region, in dem sogenannten extrasynaptischen Bereich des Spines. Die recycelnden Endosomen (rot) befinden sich im Schaft des Dendriten und im Spine. Die dendritischen Spines besitzen ein kontinuierliches Netzwerk aus geraden und verzweigten Aktinfilamenten (schwarze Linien). Es breitet sich von der Spinebasis her aus, verengt sich im Spinehals, beginnt sich im Hals-Kopf-Übergang stark zu verzweigen und liegt dann höchst verzweigt im Kopf vor. Die roten Enden des Aktins stellen die wachsenden „barbed ends“ der Filamente dar. Das Mikrotubuliskelett (gelb) befindet sich hauptsächlich im Dendriten, kann aber durch seine Dynamik in reifen Spines in den Spine selbst eindringen. Die positiven wachsenden Enden sind durch einen gelben Kreis zu erkennen. Abbildung bearbeitet [31].

Die Kontaktstelle zwischen einem Spine und dem präsynaptischen Terminal bezeichnet man als die PSD-Region. PSD steht dabei für „postsynaptic density“. Es handelt sich dabei um einen Bereich in der postsynaptischen Membran mit einer hohen Dichte unter dem Elektronenmikroskop. Sie beinhaltet eine charakteristische Ansammlung von Proteinen, die in die postsynaptische Signalverarbeitung involviert sind [2] und die synaptische Transmission mit den Komponenten des Zytoskeletts verlinkt [29]. Sie agiert als eine Art Organisationsstruktur und bildet eine Ansammlung von Adhäsionsproteinen, Rezeptoren und Kanälen sowie zahlreichen Signalmolekülen [31].

Gerade die PSD-Region symbolisiert, wie stark die synaptische Verknüpfung eines Spines ist. Ihre Größe steht sowohl mit der Gesamtanzahl der präsynaptischen Vesikel in Beziehung als auch mit der Menge an freisetzbaren Vesikeln im präsynaptischen Bouton. Das heißt, dass eine Synapse mit einem größeren Spine eine höhere Wahrscheinlichkeit hat, Neurotransmitter freizusetzen. Des Weiteren hat ein großer Spinekopf auch eine große PSD-Region und dem zur Folge auch eine größere Anzahl an Glutamatrezeptoren (AMPA-Rezeptoren), weshalb größere Ströme im Spine selbst entstehen [2].

Angrenzend an die PSD-Region befindet sich die endozytotische Zone, eine Art stabiler Membran-„Hotspot“ für die Endozytose von postsynaptischen Rezeptoren. Sie ist von großer Bedeutung beim Einfangen und Recyceln von mobilen AMPA-Rezeptoren für die synaptische Potenzierung [31]. Das SER, smooth endoplasmatic reticulum, ist wichtig für die Speicherung des Calciums, welches für die Signalverarbeitung benötigt wird. Die Mitochondrien sind hauptsächlich im

dendritischen Schaft aufzufinden. Das ATP, welches sie produzieren, gelangt über Diffusion in den Spine und liefert dort die Energie, welche für die Signaltransduktion benötigt wird [4].

Durch eine Analyse der PSD-Region wurden große Mengen von aktin-bindenden und aktin-vernetzenden Proteinen entdeckt. Zu jenen Proteinen gehören die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II β (CaMKII β), Cortaktin, Drebrin A und Neurabin I. Die Downregulation dieser Proteine führt zu einer Reduktion in der Formation und Reifung von dendritischen Spines. Gerade dieser Effekt macht sie sehr bedeutend für die synaptische Plastizität und die Bildung von Erinnerungen [31].

2.4.4 Das Aktinzytoskelett

Um den Mechanismus zu verstehen, welcher der Morphologie der Spines unterliegt, ist es wichtig die Dynamik des Aktins in den dendritischen Spines in verschiedenen Entwicklungsstufen zu verstehen [35].

Veränderungen in der Gestalt und der Größe von Spines korrelieren mit der Stärke der exzitatorischen, synaptischen Verbindung und weist eine starke Abhängigkeit von der Neugestaltung des Aktinzytoskeletts auf. Da Aktin in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert ist, die beispielsweise die Dynamik der postsynaptischen Membran betreffen oder die Zellmobilität und –morphogenese, ist es nicht überraschend, dass die Spineformation und ihre Dynamik durch das Aktinzytoskelett bestimmt wird. Durch zahlreiche Studien konnte bestätigt werden, dass das Aktin eine entscheidende Rolle in der Bildung und Eliminierung, der Mobilität und Stabilität, sowie bei der morphologischen Plastizität, wie Gestalt, Größe und Anzahl der Spines spielt. Die Regulierung des Aktinzytoskeletts steuert die morphologischen Veränderungen in Spines, die mit der Veränderung der Stärke einer Synapse assoziiert werden [31].

Aktin ist die Hauptkomponente des Zytoskeletts in dendritischen Spines. Es handelt sich dabei um ein Netzwerk von lang und kurz verzweigten Filamenten im Hals des Spines und hauptsächlich kurz verzweigten Filamenten im Kopf des Spines, direkt unterhalb der PSD-Region. Die Hauptaufgabe des Aktins in reifen, mushroom, Spines ist es, die postsynaptischen Proteine zu stabilisieren und die Kopfstruktur der Spines, als Antwort auf die postsynaptischen Signale, zu regulieren.

Es gibt zwei Formen von Aktin, die beide in den Spines vertreten sind: die monomere Form, das sogenannte G-Aktin, und die filamentartigen Polymere, das F-Aktin. Das Maß an Aktinpolymerisation, somit das Verhältnis von G-Aktin zu F-Aktin, beeinflusst viele verschiedene Aspekte in der Morphologie der dendritischen Spines (Abbildung 13).

Die Aktinfilamente an sich sind polare Strukturen, bei denen ein Ende schneller wächst (Plus-Ende oder auch „barbed end“ genannt) als das andere (Minus-Ende, oder auch „pointed end“). In wachsenden Zellen drückt das Plus-Ende die Plasmamembran nach außen und verursacht auf diese Weise eine Veränderung der Zellgestalt in Form einer Expansion, was in der Abbildung 13 dargestellt ist [31].

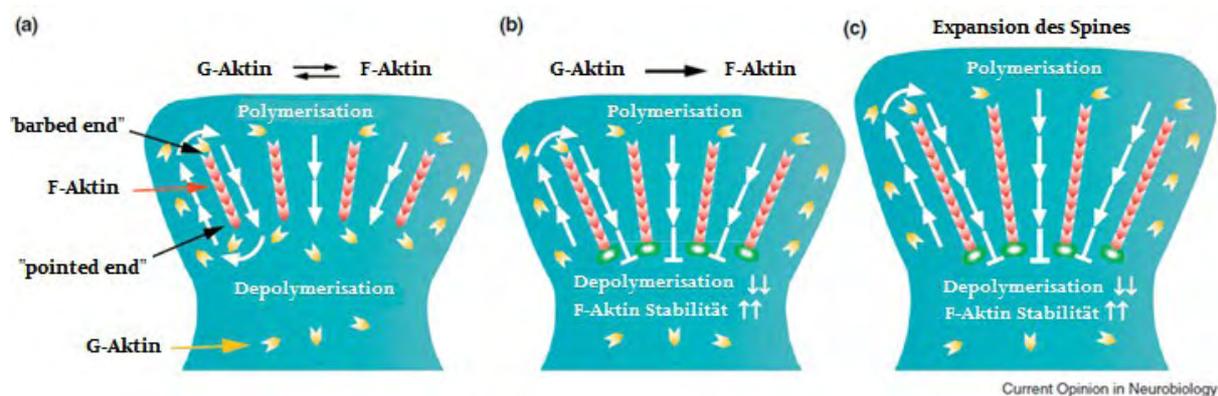


Abbildung 13: **Aktinzytoskelett: Mechanismus der Expansion eines Spines.** a) In einem natürlichen Spine gibt es ein konstantes „Treadmilling“ des Aktins von der Peripherie zum Zentrum des dendritischen Spines, welches durch ein ausgeglichenes Verhältnis der F-Aktinpolymerisation/-depolymerisation gesteuert wird. b) Eine LTP-Induktion stabilisiert die Aktinfilamente und verlangsamt die Depolymerisation am „pointed end“ (nicht wachsendes Ende) des F-Aktins, welches im Kern des Spines vorliegt. c) Die Polymerisation setzt sich in der Peripherie des Spines fort und generiert dabei die treibende Kraft, welche für die Expansion des Spines benötigt wird. Abbildung bearbeitet [36].

Auf der Abbildung sind drei Szenarien dargestellt und wie sich dabei das Aktinzytoskelett verändert. a) zeigt einen natürlich vorkommenden Spine und den Aufbau der Filamente. In b) sind die Veränderungen veranschaulicht, die im Spinekopf geschehen, wenn durch einen LTP-Stimulus das Verhältnis von G-Aktin zu F-Aktin verschoben wird. Der Bildbereich c) zeigt die Expansion eines Spines. Die Aktinfilamente sind nicht stabil. Es kommt ständig zu einem sogenannten „Treadmilling“, bei dem die Filamente an einem Ende verlängert und gleichzeitig am anderen Ende abgebaut werden [36]. Da alle Proteine, die in diesem Prozess involviert sind, eine hohe Abhängigkeit vom Calcium aufweisen, ist es verständlich, warum eine starke Aktivierung einer Synapse zu einer Expansion des Spines führt [2]. Es wurde herausgefunden, dass die regulierte Polymerisation/Depolymerisation von Aktin für die Mobilität, das Wachstum und die Gestalt der Spines verantwortlich ist [31].

2.4.5 LTP

Die Langzeitpotenzierung, kurz LTP, ist eine andauernde Erhöhung der synaptischen Transmission und es wird weitestgehend angenommen, dass es sich dabei um das zelluläre Modell von Lernprozessen und der Erinnerung handelt [5]. LTP kann innerhalb des Hippocampus über eine tetanische Stimulation, einer sogenannten „theta-burst“-Stimulierung, induziert werden [4]. In aktuellen Studien wurde herausgefunden, dass eine Induktion von LTP mit dem Wachstum und der Bildung von neuen Spines assoziiert werden kann. Dadurch sind einige Spines zu reifen synaptischen Kontakten geworden [5]. Die durch LTP induzierte Aktivität kann zu langanhaltenden Veränderungen im synaptischen Netzwerk des Hippocampus führen [4].

Es gibt zwei Phasen der LTP, die frühe und späte Phase. Die frühe Phase ist sehr kurzlebig und unabhängig von RNA- und Proteinsynthese (Abbildung 15, Schema B). Sie dauert nicht mehr als eine Stunde an. Die späte Phase, auch als LTP-Expression bezeichnet (Abbildung 15, Schema C), ist sehr langlebig und kann bis zu mehrere Tage andauern. Diese Phase ist abhängig von der RNA- und Proteinsynthese. Sie ist also transkriptions- und translationsabhängig. Bei der späten Phase

handelt es sich um die LTP-Aufrechterhaltung. Veränderungen in der Größe und der Gestalt der Spines scheinen die molekularen Reaktionswege zu erfordern, die auch in LTP involviert sind [4].

In Abbildung 15 werden zum Vergleich die Abläufe einer normalen niederfrequenten und einer durch einen Tetanusstimulus ausgelösten hochfrequenten synaptischen Übertragung gezeigt. Diese Übertragung findet zwischen dem Axon eines CA3-Neurons und dem Spine eines CA1-Neurons in der Schaffer-Kollateralen statt (Abbildung 14).

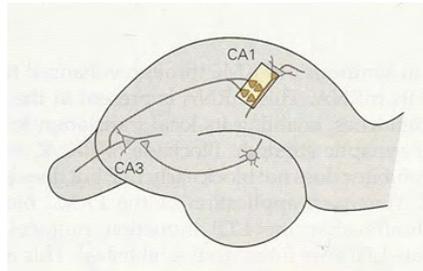


Abbildung 14: **Darstellung des Ortes der synaptischen Übertragung** zwischen dem Axon eines CA3-Neurons und dem Spine eines CA1-Neurons im Schaffer-Kollateral-Pfad [25].

Die tetanische Stimulation der Neurone (siehe Abbildung 15, Schema B) resultiert in der präsynaptischen Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat, welcher an AMPA- und NMDA-Rezeptoren, N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR), an der postsynaptischen Membran bindet und beide aktiviert. Bis zum Erreichen des Depolarisationsschwellenwertes der postsynaptischen Membran sind allerdings nur die AMPARs aktiviert, denn die NMDARs sind durch die Bindung von Magnesium blockiert. Um den Kanal dieser Rezeptoren zu öffnen, muss zuerst Glutamat binden und anschließend die postsynaptische Membran depolarisiert werden, um das gebundene Magnesium auszustoßen, welches die Pore des Kanals blockiert. Ist der Schwellenwert erreicht, dann wird das Magnesium durch eine elektrostatische Abstoßung freigesetzt und es kommt zum Calciumeinstrom in den Spine. Der Einstrom von Calcium führt zu einer Reihe von Veränderungen in der Postsynapse, welche als Ganzes betrachtet, einen Anstieg der synaptischen Wirksamkeit bewirkt.

Calcium bindet beispielsweise an Proteine im Neuron, die eine große Anzahl von molekularen Reaktionskaskaden aktivieren (z.B. CaMKII β , Proteinkinase C und Tyrosinkinasen).

Dies führt zu Veränderungen, welche die Antwort der postsynaptischen Zelle fördert und einen Anstieg der Neurotransmitterfreisetzung vom Axon bewirkt (Abbildung 15, Schema C). In der Expression der LTP haben die Enzymkaskaden einen besonderen Effekt. Sie bewirken eine Phosphorylierung der Proteinkinase C, welches den Strom durch die AMPA-Rezeptoren erhöht und damit die Einbringung zahlreicher neuer AMPARs in die postsynaptische Zellmembran des Spines herbeiführt (Abbildung 15, Schema C). Mit zunehmender Wiederholung des tetanischen Stimulus kommt es zur Aktivierung der Transkription von Zielproteinen, die ein Wachstum neuer synaptischer Verknüpfungen zur Folge hat (späte Phase der LTP) und somit eine postsynaptische Modifikation bewirkt [25][18].

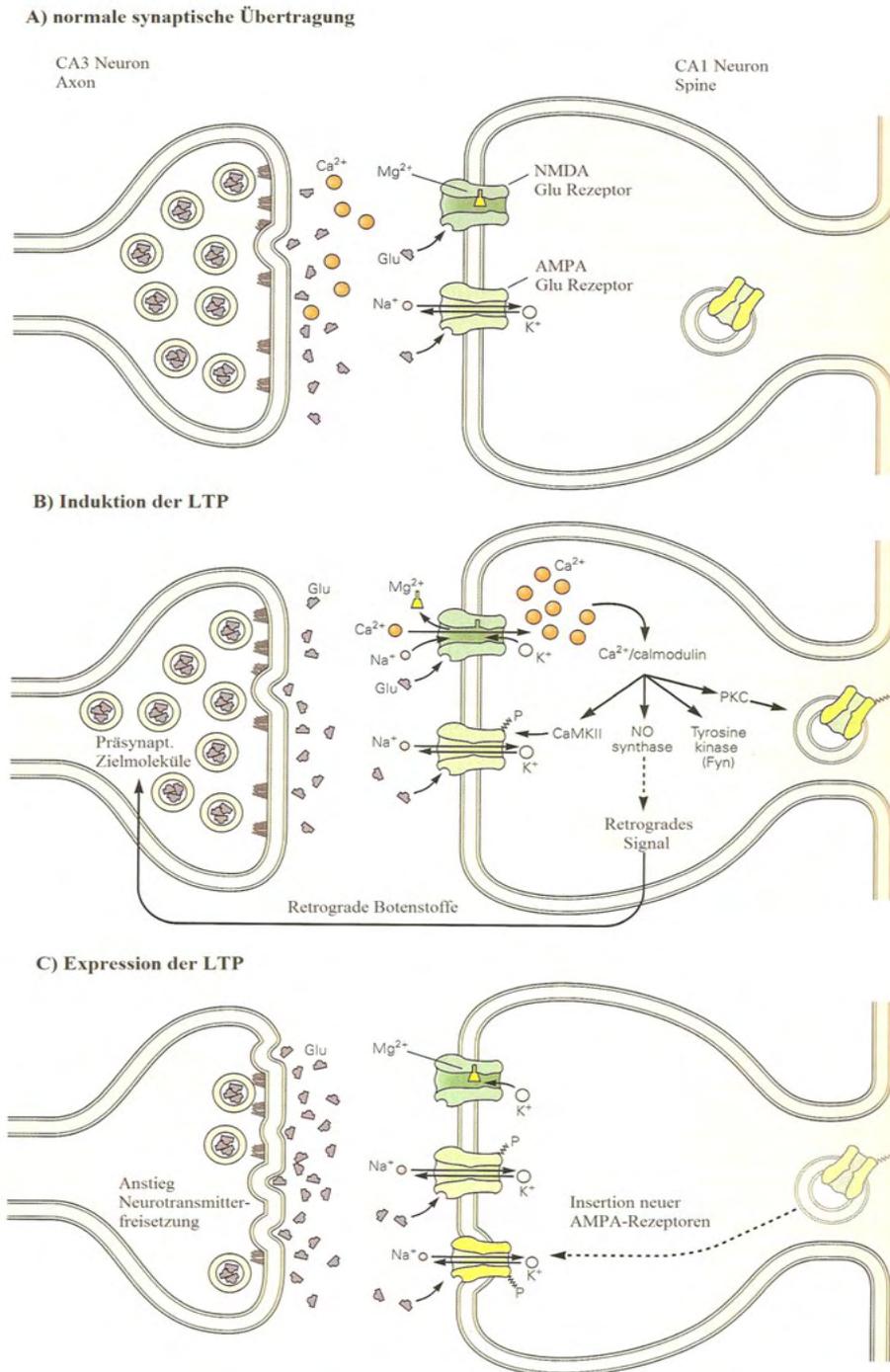


Abbildung 15: **LTP-Induktion/Expression einer Synapse** des Schaffer-Kollateral-Pfades. A) zeigt eine normale, niedrig-frequente synaptische Übertragung. Glutamat wird vom präsynaptischen Terminus eines CA3 Schaffer-Kollateral Axons freigesetzt und bindet an die NMDA- und AMPA-Rezeptoren der postsynaptischen Membran des Spines eines CA1-Neurons. Natrium und Kalium fließen durch den AMPA-Rezeptor, nicht jedoch durch den NMDA-Rezeptor, da dieser bei negativen Membranpotential durch Magnesium blockiert ist. B) Während der hochfrequenten Tetanusstimulation sorgt die hohe Depolarisation der postsynaptischen Membran zur Auflösung der Magnesiumblockade. Calcium, Kalium und Natrium fließen nun auch durch diese Rezeptoren. Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration aktiviert die Ca^{2+} -abhängige Kinase, Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMKII) und damit eine Reihe von zahlreichen Enzymkaskaden, die auf diese Weise die LTP induzieren. C) In der Expression der LTP haben die Enzymkaskaden einen besonderen Effekt. Sie bewirken eine Phosphorylierung der Proteinkinase C, welches den Strom durch die AMPA-Rezeptoren erhöht und damit die Einbringung zahlreicher neuer AMPARs in die postsynaptische Zellmembran des Spines herbeiführt. Des Weiteren setzt die postsynaptische Zelle auf einen noch unbekanntem Weg sogenannte retrograde Botenstoffe frei, die im präsynaptischen Terminal einen Anstieg der Transmitterfreisetzung auslösen. Abbildung bearbeitet [25].

Es gibt eine Reihe von Ereignissen, die nach der LTP-Induktion auftreten können. Sie reichen von funktionellen Veränderungen, wie der Modifikation der postsynaptischen Rezeptoren (Minuten nach der Induktion, frühe Phase der LTP) über morphologische Veränderungen, z.B. einer langsamen Vergrößerung des Spinekopfes oder der synaptischen Oberfläche (ca. 30 Minuten nach Induktion), bis hin zur Bildung komplett neuer Strukturen (späte Phase der LTP). Es müssen nicht alle Schritte auftreten bzw. ersichtlich sein, aber morphologische Veränderungen eines geringeren Umfangs sind durchaus das Resultat einer synaptischen Potenzierung [37].

2.4.6 Auswirkung der LTP auf die synaptische Plastizität von Spines

Die LTP-induzierende Stimulation bewirkt einen Anstieg der Aktinpolymerisation in den Spines und es kommt zu einer Vergrößerung des Spinekopfes, sowie zur Erweiterung und Verkürzung des Spinehalses (Abbildung 16). Bei der LTD, auf der anderen Seite, handelt es sich um eine langanhaltende Reduktion der synaptischen Transmission, welche durch einen niederfrequenten Stimulus ausgelöst wird. Sie verringert die Spinedichte und wird mit dem Schrumpfen der Spines im Hippocampus assoziiert (Abbildung 16). Dieses Schrumpfen scheint dazu beizusteuern, dass es zu einer aktivitätsabhängigen Auslöschung von vorhandenen, synaptischen Verbindungen und zu einem Verlust der synaptischen Konnektivität kommt [27].

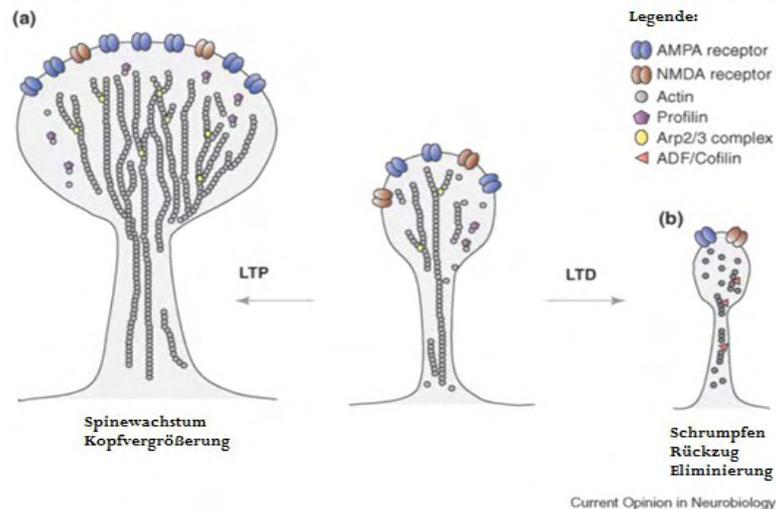


Abbildung 16: **Auswirkung von LTP und LTD auf die Spinemorphologie.** a) LTP wird mit der Verlagerung des Aktungleichgewichtes in Richtung F-Aktin (dargestellt als lineare Ketten des monomeren G-Aktins) in Spines assoziiert. Sie verursacht die Vergrößerung des Spinekopfes und die Insertion weiterer AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran. Profilin fördert den Zusammenbau der Aktinfilamente gezielt durch einen Anstieg der Verfügbarkeit von Aktin-ATP, welches für die Polymerisation benötigt wird. Der Arp2/3-Komplex stimuliert die Bildung neuer Aktinfilamente und die Formation von Verzweigungen. b) Die LTD-Stimulation hingegen verlagert das Gleichgewicht in Richtung des G-Aktins und leitet damit die Depolymerisation ein. Dies bewirkt ein Schrumpfen oder sogar den kompletten Verlust des Spines. Das aktintrennende Protein ADF/Cofilin ist scheinbar ebenfalls in das Schrumpfen des Spines involviert. Abbildung bearbeitet [27].

Es steht fest, dass eine synaptische Stimulation das Gleichgewicht zwischen F-Aktin und G-Aktin innerhalb kürzester Zeit verändert. In Abbildung 16 ist dargestellt, wie sich der Spine nach LTP und LTD verändert. Eine LTP-Induktion zum Beispiel verschiebt das Gleichgewicht zwischen beiden Formen in Richtung des F-Aktins (Abbildung 13). Dies bewirkt einen Anstieg der Aktinfilamente im Spine und auf diese Weise eine Vergrößerung des Spinevolumens. Durch die durch LTP verursachte Insertion von weiteren AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran vergrößert sich auch der Spinekopf, was ebenfalls zur Volumenzunahme führt. Die LTD, Langzeitdepression, verschiebt hingegen das Gleichgewicht auf die Seite des G-Aktins und verursacht somit eine Reduktion der Aktinfilamente und das Schrumpfen der Spines [31].

Durch eine Potenzierung aufgrund von synaptischer Aktivität besitzen Spines danach also eine größere PSD-Region und wesentlich mehr AMPA-Rezeptoren in ihrer Zellmembran. Die Ursprungsgröße von Spines ist scheinbar kennzeichnend dafür, in welchem Ausmaß die Stärke der bestehenden Synapse verändert werden kann. Kommt es zur Potenzierung von großen Spines, so besteht die Volumenvergrößerung nur für kurze Zeit, scheint also nicht sehr wirksam zu sein. Im Vergleich dazu können kleinere Spines ihre Volumenänderung bewahren und sind somit in der Lage, langfristig potenziert zu bleiben. Dadurch, dass große Spines sehr langlebig sind (ein Mäuseleben), ist es wahrscheinlich, dass Spines der elementare Kern des Gedächtnisses sein könnten. Da kleine Spines sehr instabil und dynamisch sind, schrumpfen und verschwinden sie, wenn sie keine Potenzierung erhalten. Jedoch wird, durch ihre zahlreiche Vertretung, dem Neuron ermöglicht, möglichst viele synaptische Verbindungen einzugehen und einen großen synaptischen Input aufzunehmen. Kommt es zur gleichen Zeit zu einer starken Aktivität einer Synapse und zur Depolarisation der postsynaptischen Seite, dann wird die Synapse potenziert und das Ereignis wird im Spine abgespeichert [2].

Es hat somit eine wichtige Auswirkung, wenn große Spines aufgrund ihrer Stabilität länger erhalten bleiben. Man kann demnach sagen, dass das Volumen eines Spines seine Lebensgeschichte darstellt. Es handelt sich bei Spines also nicht nur um Gegenstände, die an der Speicherung von Erinnerungen involviert sind, sondern um Elemente, die gespeicherten Erinnerungen gewichten. Große Spines scheinen sich vor dem zufälligen Abbau ihrer Synapse schützen zu können und sorgen somit dafür, dass das neuronale Netzwerk, von dem sie ein Teil sind, sehr langlebig ist [2].

2.5 Neuroserpin

Neuroserpin (Ns) ist ein Mitglied der Serpine, einer Superfamilie von Proteinen, deren primäre Funktion es ist, als Serin Protease Inhibitoren zu agieren. Es gibt aber auch einige Serpine, die eine nicht-inhibitorische Funktion aufweisen. Serpine repräsentieren die große Familie der Protease Inhibitoren, welche in allen Organismen zu finden ist. Mit eingeschlossen sind Viren, Eukaryoten und Prokaryoten.

Neuroserpin ist ein solcher Serin Protease Inhibitor, der hauptsächlich von den Neuronen des peripheren und zentralen Nervensystems sekretiert wird, beginnend im späten Stadium der neuronalen Entwicklung bis hin zum Erwachsenenalter [6]. Es ist als ein Glykoprotein [38] identifiziert worden und weist eine Größe von 54-60 kDa auf [6].

2.5.1 Expression

Während der embryonalen Entwicklung, also circa ab E15 bei Mäusen, werden hohe Expressionslevel von Neuroserpin unter anderem im Neocortex, Hippocampus und Amygdala nachgewiesen (Abbildung 17). Auch im Erwachsenenalter wird es hauptsächlich in diesen Regionen exprimiert [38] und konnte in fast allen Bereichen des Neurons nachgewiesen werden, auch in den Dendriten und Axonen, besonders angereichert im axonalen Terminus [7].

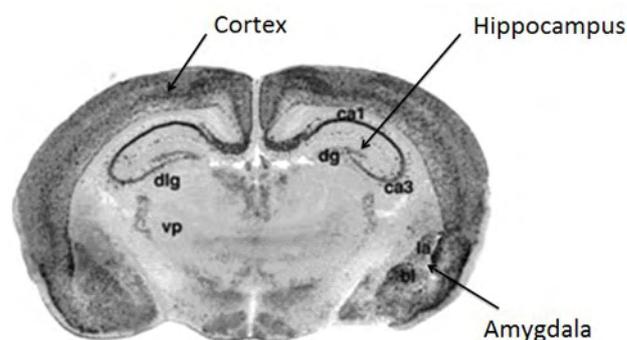


Abbildung 17: **Neuroserpinexpression im Gehirn einer adulten Maus.** Abgebildet ist eine *in situ* Hybridisierung eines koronalen Gehirnschnittes mit einer Antisense Riboprobe, welches von der cDNA des Mausneuroserpins transkribiert wurde. Eingezeichnet sind die Hirnregionen, in denen Neuroserpin stark exprimiert wird. ca1+ca3 sind Bereich des Hippocampus, dlg= dorsal lateral genikulater Nukleus, dg= dentate gyrus, vp= ventroposterior thalam. Nukleus, bla steht für den basolateralen Kern und la für den lateralen Kern der Amygdala. Der Maßstabsbalken zeigt eine Größe von 500µm an [38].

Die Neuroserpinexpression im sich entwickelnden und erwachsenen Gehirn deutet daraufhin, dass es eine wichtige Rolle in der Synaptogenese und der synaptischen Plastizität spielt [7].

2.5.2 Funktionen

Neben seiner Rolle als Inhibitor der amidolytischen Aktivität von tPA, dem tissue plasminogen activator, und Serinproteasen wie Trypsin und Plasmin, weist Neuroserpin eine wichtige Funktion in der Synaptogenese auf. Ns ist von großer Bedeutung bei der Bildung von Neuriten und Synapsen. Es wurde herausgefunden, dass bei einer Neuroserpin Überexpression ein Anstieg der Dichte von dendritischen Spines, sowie eine Veränderung von Spineproportionen und deren Gestalt zu verzeichnen ist (Abbildung 18), wie zum Beispiel die Reduktion der Größe des Spinekopfes. Um dies herauszufinden, wurden primäre hippocampale Neuronen von Ratten am 10. DIV mit hrGFP als Kontrolle transfektiert und mit hrGFP und Neuroserpin cotransfektiert. GFP-Fluoreszenzbilder am Mikroskop wurden am 21 DIV aufgenommen [7].

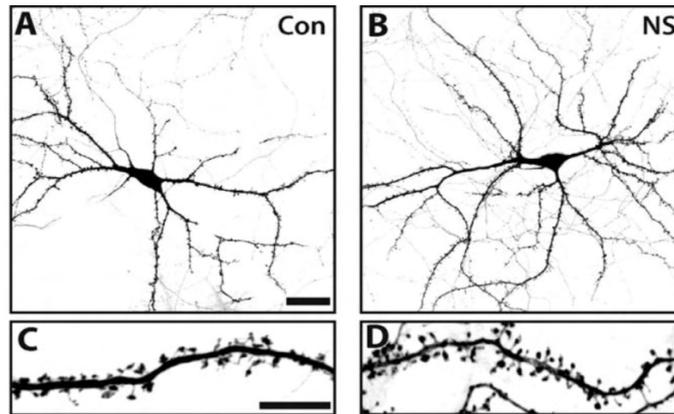


Abbildung 18: **Auswirkung einer Neuroserpinüberexpression.** Die Überexpression von Neuroserpin verursacht einen Anstieg in der Dichte von dendritischen Protrusionen. Verwendet wurden primäre hippocampale Neurone von Ratten, die am 10. DIV mit hrGFP als Kontrolle (Con) transfektiert und mit hrGFP und Ns cotransfektiert worden sind. Bilder A und B zeigen den direkten Vergleich der Neurone und wurden am 21. DIV aufgenommen. Bei B (Neuroserpinüberexpression) kann man wesentlich mehr Dendriten erkennen als bei den Kontrollmäusen in A. In C und D wird sich auf die Spineausbildung konzentriert. Es sind stark vergrößerte Dendriten dargestellt. Man kann in D, den Dendriten von Ns-überexprimierten Mäusen, wesentlich mehr Dendritenprotrusionen, Spines, erkennen als in denen der Kontrollmäuse, mit normaler Ns-Expression, C (4). Die Maßstabsbalken: in A (gilt auch für B) beträgt die Länge 30µm; in C (gilt auch für D) 10µm [7].

In der Abbildung 19 sind die Spinedichten pro µm Neuron der einzelnen Klassen aufgeführt. Es wird dabei zwischen den Kontrollneuronen und Neuroserpin-überexprimierenden Neuronen unterschieden. Die Überexpression von Neuroserpin bewirkt einen 52%-igen Anstieg der unreifen, „thin“ Spines, und eine Reduktion von rund 34% der reifen, sogenannten „mushroom“ Spines (siehe Abbildung 19). Durch die Überexpression wird also die Dichte der Spines reguliert und die Morphologie der Spines zum eher unreifen Phänotyp verschoben [7].

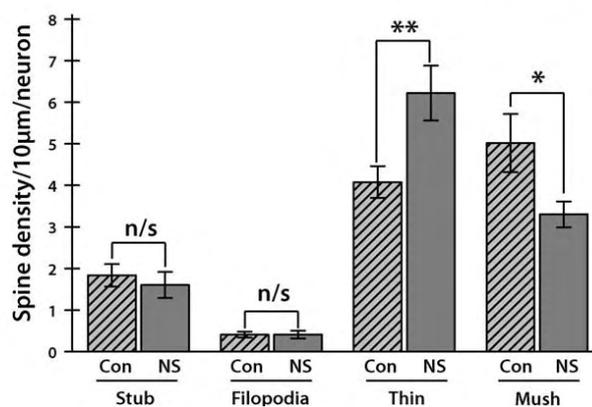


Abbildung 19: **Neuroserpinüberexpression: Veränderte Spinegestalt.** Auf dieser Abbildung wird die Spinedichte pro µm pro Neuron gezeigt. Auf der X-Achse sind die Spines in vier verschiedene Klassen unterteilt, in stubbys (Stub), filopodia, long thins (Thins) und die mushrooms (mush). Pro Klasse wird zwischen den Kontrollen, transfektiert mit hrGFP und Ns, cotransfektiert mit hrGFP und Neuroserpin. Es sind signifikante Unterschiede in den Dichten der thin Spines und der mushrooms zwischen den Kontrollen und Neuronen mit Neuroserpinüberexpression zu verzeichnen. Demnach gibt es mehr thin Spines und weniger mushrooms bei einer Neuroserpinüberexpression [7].

Anhand der Veränderungen, die durch eine Überexpression von Neuroserpin auftreten, wird bestätigt, dass es einen Einfluss auf die Spinemorphologie ausübt. Da Neuroserpin ein zu sekretierendes Protein ist und meist vom präsynaptischen Terminal freigesetzt wird, kann es sein, dass es die Plastizität und damit die Morphologie der postsynaptischen Spines stimuliert. Mit welchem Mechanismus Neuroserpin, als ein molekularer Kandidat für Spinewachstum und Reifung, die Veränderungen der Morphologie auslöst, ist noch unklar. Damit steht fest, dass Neuroserpin eine wichtige Rolle in der Synaptogenese und synaptischen Plastizität spielt [7].

2.5.3 Pathologie

Neuroserpin spielt bei einigen neurologischen bis psychiatrischen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Zum Einen in der sogenannten FENIB-Erkrankung. Durch eine Mutation in Ns kommt es dabei zu einer Neuroserpinpolymerisation: Es bilden sich Akkumulationen aus geordneten Polymeren von Neuroserpin im Endoplasmatischen Retikulum. Das hat eine Anreicherung von mutiertem Neuroserpin zur Folge. Diese Polymerisation verursacht eine Form von Demenz, die als familiäre Enzephalopathie mit Neuroserpin Inclusion Bodies (FENIB) bekannt ist [39]. Diese Krankheit führt zum Tod [6].

Neuroserpin scheint zudem auch eine Rolle in der Entstehung von psychiatrischen Krankheiten zu spielen. In Schizophrenie-Patienten beispielsweise wurde eine Dysregulation von Neuroserpin beobachtet. Die genaue Wirkung, die Neuroserpin auf diese Krankheit hat, ist noch unbekannt und muss noch etabliert werden [8].

Es wurde herausgefunden, dass Neuroserpin ebenfalls einen Einfluss auf das emotionale Verhalten hat. Tests zeigten, dass NsKO Mäuse einen veränderten und angst ähnlichen Phänotyp aufweisen. Dasselbe wurde bei transgenen Mäusen festgestellt, bei denen das Gen, welches Neuroserpin kodiert, überexprimiert vorliegt. Auch sie zeigen ein abnormes emotionales Verhalten.

In der gleichen Studie hat man herausgefunden, dass beides eine Reduktion in der Aktivität des Bewegungsapparates in einer neuen Umgebung und eine der Neophobie ähnlichen Reaktion auf neue Objekte verursachen. In Abbildung 20 ist eine solche Verhaltensstudie abgebildet, bei der die Mäuse einem neuen Käfig mit einem neuen Objekt in der Mitte ausgesetzt wurden. Es sind eindeutige Verhaltensunterschiede zwischen den NsKO(Ns-/-) Mäusen und den Wildtyp Mäusen zu erkennen. NsKO Mäuse bewegen sich deutlich weniger und meiden aus Angst das neue Objekt, wohingegen die Wildtyp Mäuse ein großes Interesse und ein weniger ängstliches Verhalten zeigen [11].

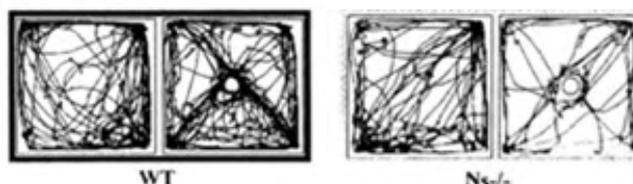


Abbildung 20: **Verhaltensstudie von NsKO und WT.** Auf dieser Abbildung sind die Reaktionen von NsKO Mäusen und Wildtyp Mäusen auf neue Objekte abgebildet. Es zeigt den Käfig und in der Mitte das neue Objekt. Die schwarzen Linien zeigen die Laufwege der Mäuse. Es ist deutlich zu erkennen, dass die NsKO(Ns-/-) sich weniger bewegen und das neue Objekt eher scheuen, als es zu erkunden und zu beschnuppern, wie es die Wildtyp Mäuse tun. Abbildung bearbeitet [11].

2.6 Spines in den Hirnregionen des Amygdala und des Hippocampus

Bei dendritischen Spines handelt es sich um anatomische Substrate, die sehr wichtig für normale kognitive Prozesse sind. Veränderungen eben jener Spines könnten zu den für Erkrankungen des Gehirns charakteristischen Fehlfunktionen beisteuern [40].

Eine abnorme Spinemorphologie ist in einer Vielzahl von Hirnerkrankungen wie in Angstzuständen, Alzheimer, und mentaler Retardation (z.B. Fragil-X- und dem Down-Syndrom) nachgewiesen worden [40]. Eine Reduktion der Spinedichte um 70 Prozent konnte in den apikalen Dendriten im Erregungsleitungssystem des Hippocampus von schizophrenen Patienten und in anderen Hirnregionen herausgefunden werden [41]. Auch bei Depressionen und Epilepsie fand man eine geringere Anzahl von dendritischen Spines [4].

Der typische Phänotyp bei Neuroserpin-Knockout und Ns-überexprimierenden Mäusen, im Vergleich zum Wildtyp, zeigt ein stark ausgeprägtes Angstverhalten. Des Weiteren reagieren sie auf neue Objekte mit einer Art Neophobie [7].

Bis auf das stark veränderte, abnorme Verhalten und die Tatsache, dass Neuroserpin auch bei psychiatrischen Krankheiten, wie Schizophrenie, eine wichtige Rolle zu spielen scheint [8], ist über Neuroserpin und seine Auswirkungen auf die Krankheiten und die Morphologie von Spines noch nicht viel bekannt. Das macht eine Untersuchung der Spinemorphologie bei Neuroserpin-Knockout Mäusen zu einer interessanten Analyse. Auf diese Weise können Auswirkungen, die Neuroserpin auf das wichtigste Element des Gehirnes hat, falls vorhanden, aufgedeckt und eingehender betrachtet werden.

Die Analyse der Hirnregionen Hippocampus und Amygdala sind für diesen Phänotyp von großer Bedeutung und auch am sinnvollsten. Die Neuroserpinexpression ist sowohl im sich entwickelnden als auch im adulten Gehirn in beiden Hirnregionen sehr hoch [6], weshalb man dort auch die größte Veränderung in der Spinemorphologie erwartet. Die Amygdala, speziell der basolaterale Komplex (BLA), könnte mit ihrer zentralen Funktion in der Angstkonditionierung das Kernelement darstellen, das diesen Phänotyp bedingt. Durch die Verknüpfung mit der CA1-Region des Hippocampus [17] und der Tatsache, dass beide Regionen sich gegenseitig durch direkte oder indirekte neuronale Aktivität beeinflussen, scheint der Effekt von Neuroserpin auf beide Regionen sehr naheliegend zu sein. Es ist bekannt, dass Veränderungen in den Dendriten und der synaptischen Struktur im Hippocampus und Amygdala beim Prozess der Angst involviert sind [5]. Auch die Formation von Erinnerungen an Angst bewirken synaptische Veränderungen in den Neuronen beider Regionen. Aus eben diesen Gründen, dem Neuroserpin-Phänotyp, der Veränderungen der Spines in neuronalen Erkrankungen und die Funktionsstörungen, sowie die Verknüpfung und Einflüsse zwischen Amygdala und Hippocampus, entstand die Kernidee einer Analyse der Spines von Neuroserpin-Knockout Mäusen in diesen Regionen.

3 Material und Methoden

Ziel dieser Arbeit ist es, eine morphologische Analyse dendritischer Spines – von DiI-gefärbten Neuronen - in Neuroserpin-Knockout Mäusen in den Hirnregionen Amygdala und Hippocampus durchzuführen, die Analysedaten mit denen von Wildtyp Mäusen zu vergleichen und festzustellen, ob Unterschiede in der Anzahl und Gestalt der Spines zwischen beiden Mausgruppen nachgewiesen werden können.

Tabelle 1: Ablauf einer morphologischen Analyse von dendritischen Spines. Die Tätigkeiten im Rahmen der Analyse werden pro Tag angegeben. Diese Übersicht verdeutlicht, dass für jedes der sechs Tiere mindestens sieben Tage benötigt werden, um eine derartige Analyse mit allen Vorbereitungen durchführen zu können.

Tage	Tätigkeit
1.	Perfusion der Maus Gehirnentnahme und Fixierung über Nacht
2.	Anfertigung der Gehirnschnitte mit dem Vibratom Färben der Hirnregionen
3. - 6.	Fixieren der gefärbten Schnitte auf Objektträgern Konfokale Mikroskopie der Schnitte
≥ 7.	Auswertung der Mikroskopaufnahmen mit Software, Statistik

Dieser Tätigkeitsablauf wurde für alle Wildtyp und Knockout Mäuse verwendet.

3.1 Versuchstiere

Für diese Arbeit wurden männliche und weibliche Mäuse verwendet. Sie waren alle im gleichen Alter von etwa drei Wochen. Es wurden jeweils drei Tiere von Neuroserpin-Knockout Mäusen (-/-) und deren Wildtyp-Wurfgeschwister für die Analyse verwendet. Bei den Versuchstieren war es wichtig, dass es sich um Geschwister handelt, damit gleiche genetische und erzieherische Bedingungen vorliegen, um sie später auch vergleichen zu können.

Die Neuroserpin-defizienten Mäuse (NsKO) wurden durch die Insertion einer *Neokassette* im 2. kodierenden Exon generiert. Sie sind mindestens zehnmal in die Mauslinie C56BL/6J rückgekreuzt [11] worden.

Es handelte sich um gesunde, fertile Mäuse, die keine groben anatomischen und neurologischen Störungen aufwiesen.

3.2 Präparation der Versuchstiere

Die Präparation der Versuchstiere wird von für diese Arbeit geschulten Personal durchgeführt.

Die Gehirne der Versuchstiere werden durch Perfusion mit 4% PFA (4% Paraformaldehyd in 0.1M PBS) und anschließende Lagerungen in 4% PFA über Nacht fixiert. Für die Perfusionslösung wird ein Infusionsbeutel mit 4%igen PFA und 100µl EDTA (0.5M; pH 8,0; 0,23g/ml) gefüllt, entlüftet und mit einer Injektionsnadel (Sterican, Gr 1, 0.9x 40mm, B.Braun) zur Behandlung bereitgestellt, um eine Gerinnung des Blutes bei der Perfusion zu verhindern. Die Versuchstiere werden vor der Perfusion mit dem Narkosegas Halothan (2-Brom-2Chlor-1,1,1-Trifluorethan;Sigma, ≥99%; Lot#SLBD2414V; 1.872g/ml) betäubt und getötet. Die Perfusion wird unmittelbar nach dem Tod der Maus durchgeführt, damit das Perfundat frei durch den Körper zirkulieren kann. Nach dem Tod der Maus, wird diese in Rückenlage auf saugfähige Tücher gelegt und mit vier Nadeln (Sterican, Gr.18 0.45x25mm, B.Braun) fixiert. Eine Nadel je für die oberen beiden Extremitäten und zwei Nadeln zur Fixierung des Torsos auf Hüfthöhe. Das Sternum wird mit einer Gewebeschere geöffnet und das Herz freigelegt. Als nächstes wird die Injektionsnadel in die linke Herzkammer eingeführt, und in die rechte Herzkammer ein Schnitt gesetzt. Durch diese Arbeitsweise ist nur der Körperkreislauf involviert, wenn nun das PFA das Blut verdrängt. Die Perfusion wird bei mittlerer Geschwindigkeit (5ml/min) durchgeführt. Anschließend wird das Gehirn der Maus freigelegt, entnommen und in dem noch vorhandenen Rest des 4%igen PFAs in einem 15ml Falkontube im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.3 Gewebepreparation

Die Gewebe werden nach einer Fixierung von mindestens 12 Stunden mit dem Vibratom (Leica VT 1000s) geschnitten. Für die Lagerung der Gehirnschnitte werden 24-Well-Platten genutzt und die Wells mit frischen 4% PFA gefüllt. So ist es möglich die Schnitte auch nach dem Schneiden länger im Kühlschrank aufzubewahren, falls nicht alle sofort bearbeitet werden sollen. Die Wanne des Vibratoms, in der man die Gehirne schneidet, wird mit 1%igen PBS (Gibco LifeTechnologies; Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X; Lot 1437686) gefüllt. Anschließend wird das in PFA fixierte Gehirn für das Schneiden vorbereitet. Der Bereich des Cerebellums wird mit einer Rasierklinge vom Rest des Gehirnes koronal (frontal) abgetrennt, da es für die Analyse nicht benötigt wird. Auf diese Weise ergibt sich eine geeignete, ebene Fläche, auf der man das Gehirn mit Sekundenkleber auf dem Vibratomteller befestigen kann. Nach dem Trocknen des Klebers kann der Teller mit dem Gehirn in der Wanne festgeschraubt und das Vibratom eingestellt werden. Der Teller wird so platziert, dass die Gehirnunterseite zur Klinge des Vibratoms zeigt. So kann aufgrund der größeren Auflagefläche das Gehirn durch den Schneidedruck nicht seine Form verlieren, und die Schnitte werden gerade. Das Gewebe wird bei einer geringen Geschwindigkeit, auf einer Skala von 1-10 eine 2-3, und einer hohen Vibrationsfrequenz von (8-9) koronal mit einer Dicke von 200µm geschnitten. Das gesamte Gehirn wird auf diese Weise geschnitten.

Die Schnitte werden mit zwei feinen Haarpinseln aufgefangen und einzeln in die 24-Wellplatte gegeben. Die Wellplatten mit den Schnitten können dann mit Alufolie abgedunkelt und vorerst im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

3.4 Färbung des Gewebes mit DiI-Fluoreszenzmolekül

Als Färbemethode für diese Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff DiI gewählt.

DiI steht für 1,1-Dioctadecyl-3,3,3,3-Tetramethylindocarbocyanin Perchlorat und gehört zu den lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen, die sich besonders gut zum Einfärben von Zellmembranen und anderen lipophilen Bereichen eignen. Durch das Binden des Fluoreszenzfarbstoffes an das Biomolekül, in diesem Projekt die Zellmembran der Neurone, steigt das Fluoreszenzsignal stark an. Auf diese Weise kann man die Zellmembran der Neurone, sowie die Dendritenverzweigungen und Spines sichtbar machen [42].

Die Methode eignet sich besonders gut für diese Bachelorarbeit, da kaum Komplikationen zu erwarten sind, denn der Neuronentyp der Pyramidenzellen, der in dieser Arbeit untersucht wird, besitzt eine Zellwand, an welche die DiI-Kristalle binden können. Da sowohl im Amygdala als auch im Hippocampus jeweils die Pyramidenzellen gefärbt wurden, liegen sogar gleiche Bedingungen vor, die eine Anwendung erleichtern. Zudem ist auch kein großer apparativer oder Kosten schwerer Aufbau für die Färbung nötig und die Durchführung somit nicht sehr zeitintensiv bzw. kompliziert.

Mit Hilfe der DiI-Färbung konnten die Neuronen unter dem Mikroskop sichtbar zum Fluoreszieren gebracht werden, so dass eine Analyse der Dendriten und ihrer kleinen Ausstülpungen, den Spines, möglich wurde.

Als Vorlage für dieses Projekt und zum Orientieren bei der neuen Methode dient die Publikation von Shen et al aus dem Jahr 2008. Sie verwendeten zum Einbringen der DiI-Fluoreszenzkristalle in das Gewebe eine Helios Gene Gun, eine Gewebekanone. In einer anderen Arbeitsgruppe, Kim et al aus dem Jahr 2007, benutzten sie eine Glasmikropipette aus Borsilicat um die DiI-Kristalle, durch leichtes Ankratzen des Gewebes, an der Oberfläche anzuheften. Da beide Geräte nicht zur Verfügung standen, wurde eine Technik entwickelt, die der der Glaspipette sehr ähnlich ist. Die Fluoreszenzkristalle werden dabei mit Hilfe einer sehr feinen Nadel, einer sogenannten Insektennadel, an der Oberfläche des Gehirngewebes befestigt. Da die Insektennadel sehr klein und kurz ist, wurde sie mit Hilfe eines Zahnstochers verlängert, um sie besser beim Lädieren des Gewebes halten zu können (Abbildung 21).



Abbildung 21: **Speer aus Insektennadel und Zahnstocher.** Um die DiI-Kristalle an dem Gehirngewebe zu befestigen, wurde aus einer kleinen Insektennadel und einem Zahnstocher eine Art Injektionsbesteck, Speer, gebildet. Dazu musste der Zahnstocher an der Spitze gespalten und die Insektennadel in diesen Spalt platziert werden. Die Verbindung ist dann mit Sekundenkleber fixiert worden. Mit diesem Instrument kann nun das DiI, durch leichtes Verletzen des Gewebes, an der Oberfläche des Schnittes haften bleiben und in die Zellmembran der Neuronen diffundieren.

Aus den verschiedenen Schnitten in den Wells werden diejenigen ausgewählt, auf denen sich die Zielbereiche des Gehirns für die anschließende Analyse befinden. In Abbildung 22 ist der Gehirnschnitt einer Maus dargestellt, auf dem beide Hirnregionen, die für die Analyse relevant sind, die CA1-Region des Hippocampus und der basolaterale Komplex des Amygdalas, gekennzeichnet sind.

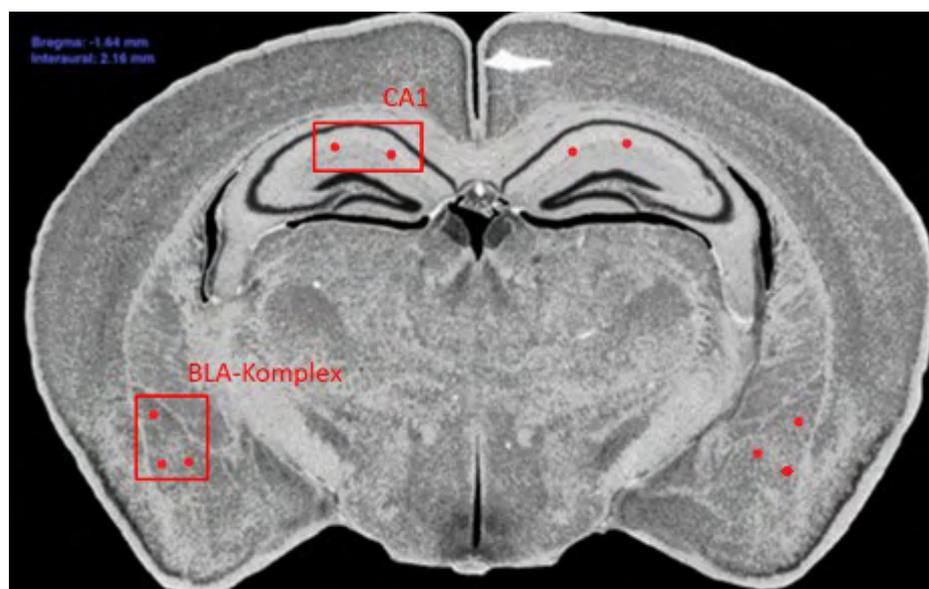


Abbildung 22: Koronaler Schnitt auf Ebene des Hippocampus und der Amygdala. Auf diesem Schnitt einer Maus sind beide Zielregionen dieses Projektes gekennzeichnet. Die CA1-Region des Hippocampus ist beidseitig in der oberen Hälfte wiederzufinden und die Region des basolateralen Amygdalas (BLA) ebenfalls beidseitig in der unteren Hälfte. Beide Zielregionen befinden sich damit auf demselben Schnitt und können parallel ausgewertet werden. Die Punkte kennzeichnen in welchem Bereich die DiI-Kristalle an das Gewebe adhärirt werden. Abbildung bearbeitet [53].

Die Schnitte werden mit Hilfe eines Haarpinsels aus den Wells entnommen und auf eine umgekehrte Petrischale unter dem Lichtmikroskop platziert (Nikon ECLIPSIS TS100; 10x Vergrößerung). In dem nun freien Well wird das 4%PFA gegen 1%iges PBS ausgetauscht, da das PBS aufgrund seiner Puffereigenschaft die Diffusion des DiI erleichtert. Die Schnitte werden unter dem Mikroskop markiert. Dieser Schritt ist für das Fixieren auf dem Objektträger sehr wichtig, um prüfen zu können, ob die Schnitte richtig herum, mit der DiI-gefärbten Seite nach oben, platziert wurden. Mit der eingefärbten Seite nach unten könnte man unter dem Mikroskop nur unscharfe Bilder erkennen und nicht fokussieren, da sich die Glasschicht des Objektträgers zwischen Linse und Gewebe befindet.

Nach dem Markieren der Gehirnschnitte beginnt das Einfärben. Dazu punktiert man mit der Insektennadel den DiI-Kristall (Molecular Probes; Katalog Nr. D-282; DiI-Kristalle Nr. D3911) und nimmt auf diese Weise kleine Partikel des Fluoreszenzfarbstoffes auf. Dabei ist darauf zu achten, dass man nicht zu viele Partikel aufnimmt und ins Gewebe einbringt, da sich sonst DiI-Klumpen im Gewebe bilden und später unter dem konfokalen Mikroskop so stark fluoreszieren, dass man die Strukturen der Neurone nicht mehr wahrnehmen kann, weil der Hintergrund zu stark gefärbt ist. Die DiI-Partikel werden nun durch leichtes Lädieren der Zielregion an das Gewebe angehaftet. Das DiI diffundiert direkt nach der Anbringung in das Gewebe die neuronale Zellmembran entlang und füllt die Dendriten, Axone und Spines in vollem Umfang aus.

Die Zielregionen werden jeweils mindestens zweifach pro Hirnseite punktiert, wie in der Abbildung 22 zu erkennen ist. Die Punktionen sollten jedoch nicht sehr nahe beieinander platziert werden, da man in dem Fall den gleichen Effekt herbeiführen würde, wie wenn man einen DiI-Klumpen ins Gewebe einbringt. Die angefärbten Schnitte werden mit einem Pinsel in die mit PBS gefüllten Wells gegeben. Die Wellplatte wird im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Die ungefärbten Schnitte können auf unbestimmte Zeit in PFA aufbewahrt werden und auch nach Wochen noch mit DiI eingefärbt oder anderweitig genutzt werden.

Die DiI-gefärbten Schnitte jedoch sollten nicht lange in PBS gehalten werden. Die Diffusion des DiI-Farbstoffes kann nicht gestoppt werden, aus diesem Grund sollten nach spätestens 16 Stunden die Schnitte auf einem Objektträger fixiert werden. So werden das Austrocknen der Neuronen sowie das Ausbleichen des DiIs durch das Licht vermieden. Sollte man die Gehirnschnitte zu lange in PBS lagern, so hat man unter dem Mikroskop eine zu starke Färbung und kann die Dendriten nicht mehr von dem immer stärker rot gefärbten Hintergrund differenzieren.

Die DiI-Färbung ist nicht reversibel, dadurch eignen sich die Schnitte, aufgrund der geringen Bildqualität, nicht mehr für die Spine-Analyse. Nach der Fixierung auf dem Objektträger hat man ca. drei Tage Zeit um alle Bilder aufzunehmen, dann wird der Hintergrund zu stark.

Zum Eindeckeln nach 16 Stunden werden die Schnitte aus dem mit PBS-gefüllten Wells entnommen und jeweils ein Schnitt auf einem Objektträger (Hecht-Assistent, SuperFrost/Plus; 75x25mm; No. 2409/1) gelagert. Es sollte immer nur ein Gehirnschnitt zurzeit behandelt werden, da sie sonst zu schnell austrocknen. Der Schnitt auf dem Objektträger muss nun unter dem Lichtmikroskop überprüft werden, ob er in der richtigen Position liegt und ob das Merkmal auf der richtigen Seite wiederzufinden ist. So wird sichergestellt, dass die DiI-Schnitte auch richtig eingedeckelt werden. Das überschüssige PBS wird mit einem Filterpapier abgesaugt. Auch von der Oberfläche des Gewebes wird vorsichtig das überschüssige PBS abgetupft. Die Schnitte sollten dabei aber nicht zu stark austrocknen, da sonst beim Eindeckeln Luftblasen mit eingeschlossen werden, die beim Mikroskopieren sehr störend sein können. Anschließend werden 100µl Fluoromount (SouthernBiotech; Fluoromount-G; Lot F3413-SA23) kreisförmig auf und um den Schnitt herum verteilt. Das Deckgläschen (Leica; Surgipath Premier Cover Glass; 24x50 #1) wird vorsichtig auf dem Objektträger luftblasenfrei platziert. Damit sich das Fluoromount gut auf dem Objektträger verteilt, wird dieser solange schräg gehalten, bis das Deckgläschen komplett unterlaufen ist. Anschließend werden die Schnitte in waagerechter Position und abgedunkelt zum Trocknen gelagert. Nach vier bis fünf Stunden können die Deckgläser nun mit handelsüblichem Klarlack auf dem Objektträger fixiert werden. So wird verhindert, dass der Objektträger Luft zieht und sich somit nachträglich Luftblasen bilden oder es zur Austrocknung der Schnitte kommt. Nach kurzem Antrocknen des Lackes können Bilder unter dem Mikroskop aufgenommen werden.

3.5 Konfokales Mikroskopieren und Bildanalyse

Um von den DiI-gefärbten Schnitten Bilder aufzunehmen, wurde das Leica TCS SP2 konfokale Mikroskop verwendet, mit dem die Confocal Laser Scanning Microscopy kurz CLSM durchgeführt werden kann. Um das vom DiI emittierte Fluoreszenzsignal zu visualisieren, wurde ein 543nm Helium/Neon-Laser verwendet und die Bilder mit einem Plan-APOCHROMAT 63-fachen Öl-Immersion Objektiv (NA: 1.4-0.6; WD (mm): 0.1; DIC Obj. Prism: E) aufgenommen. Es wurde ein Bildformat von 512 x 512 Pixeln gewählt, welches eine Bildfläche von 116,3 x

116,3µm generiert. Die Bilder sind teilweise mit einem vierfachen optischen Zoom aufgenommen worden. Das entsprechende Neuron ist in einer Intervallgröße zwischen 0,3 und 0,4µm entlang der Z-Achse gescannt worden. Die Aufnahmen wurden in sogenannten „stacks“ gesammelt und dann zusammen projiziert, um ein dreidimensionales Bild des Neurons/Dendriten rekonstruieren zu können. Die „stacks“ waren unterschiedlich groß und bestanden teilweise aus 50-60 Bildern.

Für die Analyse der dendritischen Spines wurde sich auf die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus und die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen des basolateralen Komplexes der Amygdala konzentriert. Diese sind durch ihre eindeutige Lage am Neuron unter dem Mikroskop gut zu erkennen und von den Axonen gut unterscheidbar, da sie mehr Spines besitzen – Axone besitzen nur wenige - und im Durchmesser des Fortsatzes schmaler sind. Sie sind zur Hirnoberfläche hin ausgerichtet und können auf diese Weise leicht identifiziert und nicht mit den basalen Dendriten vertauscht werden.

Pro Tier wurden im Hippocampus 30 und im Amygdala 20 Dendriten ausgewertet. Es konnte nicht die gleiche Anzahl für beide Bereiche gewählt werden, da die Pyramidenzellen im Amygdala einzeln vorliegen und nicht wie im Hippocampus in Clustern bzw. in Reihen gestaffelt.

Für die Analyse der Spines wurde ein Bereich auf dem Dendriten gewählt, der ungefähr 100µm distal zum Soma des Neurons und nach dem ersten sogenannten „Branching-Point“ lokalisiert ist. Die Mindestlänge, auf welcher die Spineanalyse auf dem Zieldendriten durchgeführt worden ist, betrug ungefähr 50µm.

3.6 Analyse mit der Software Imaris

Die Analyse der Spines, im Hinblick auf die Quantifizierung und Differenzierung der unterschiedlichen Klassen von Spines, wurde mit der Analysesoftware Imaris von Bitplane (Version 7.6.5) durchgeführt. Es wurden nur Bilder für die Analyse ausgewählt, bei denen sich der Dendrit deutlich vom Hintergrund und anderen Dendriten differenzieren ließ. Es gab verschiedene Parameter, welche in dem Projekt untersucht werden sollten. Zum Einen wurde die Anzahl der auf diesen Dendriten vorliegenden Spines ermittelt und die Spines hinsichtlich der unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften in vier verschiedene Kategorien klassifiziert: stubby, mushroom, long thin und filopodia. Des Weiteren sollten unterschiedliche Messungen am Dendriten hinsichtlich der Spines durchgeführt werden. Es wurde die Spinedichte pro µm Dendrit ermittelt und die Spinelänge, die Kopfweite, sowie die Halsbreite und –Länge der Spines von der Software ausgemessen.

Die „stacks“ der Neuronen wurden in Imaris aufgerufen und zu einer 3D-Rekonstruktion des Neuronen zusammengesetzt, wie man in Abbildung 23 erkennen kann.

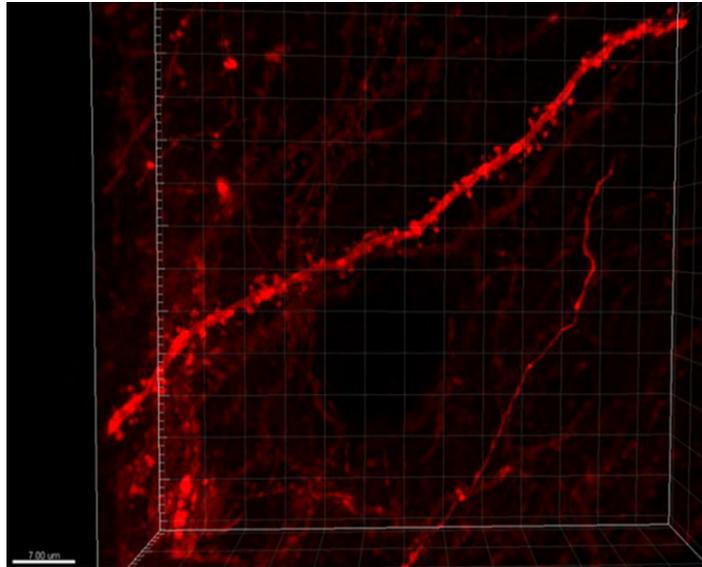


Abbildung 23: Imaris: Darstellung der 3D-Rekonstruktion des unter dem konfokalen Mikroskop aufgenommenen "stacks" des Dendriten im Bearbeitungsfeld. Das Raster dient als Hilfe bei der Erstellung einer exakten 3D-Kopie des Dendriten und bei der späteren Analyse. Der Maßstabsbalken zeigt eine Länge von 7 µm.

Um eine solche Analyse der Dendriten beginnen zu können, musste zuerst eine exakte 3D-Kopie des Dendriten erstellt werden. Dies geschieht, indem der komplette Dendrit in verschiedenen Schritten nachgebildet und die Spines durch Markierungen in der XY-Ebene bestimmt werden.

Eine derartige Kopie ist in der Abbildung 24 dargestellt. Der Dendrit wurde mit einer roten Färbung abgebildet. Es ist zu erkennen, dass die Spines schon in diesem Schritt unterschiedliche Farbgestaltungen aufweisen, die der jeweiligen morphologische Eigenschaften entsprechend vergeben wurden.

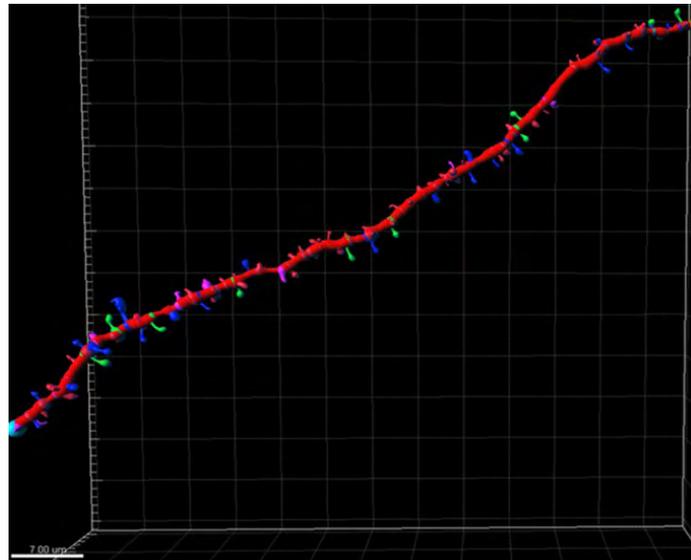


Abbildung 24: Imaris: Exakte 3D-Kopie des Originaldendriten. Mit Hilfe dieser Rekonstruktion kann die Analyse der Spines auf dem Dendriten durchgeführt werden. Es ist zu erkennen, dass die Spines unterschiedliche Farben aufweisen. Imaris hat sie aufgrund ihrer morphologischen Besonderheiten schon farblich einander zugeordnet und damit die Grundlage der Analyse gebildet. Der Maßstabsbalken zeigt eine Länge von 7 μ m.

Anhand dieser akkuraten 3D-Rekonstruktion des Originaldendriten kann nun die Analyse und Klassifizierung durchgeführt werden.

In Abbildung 25 ist dargestellt, nach welchen Parametern eine derartige Klassifizierung durchgeführt wird.

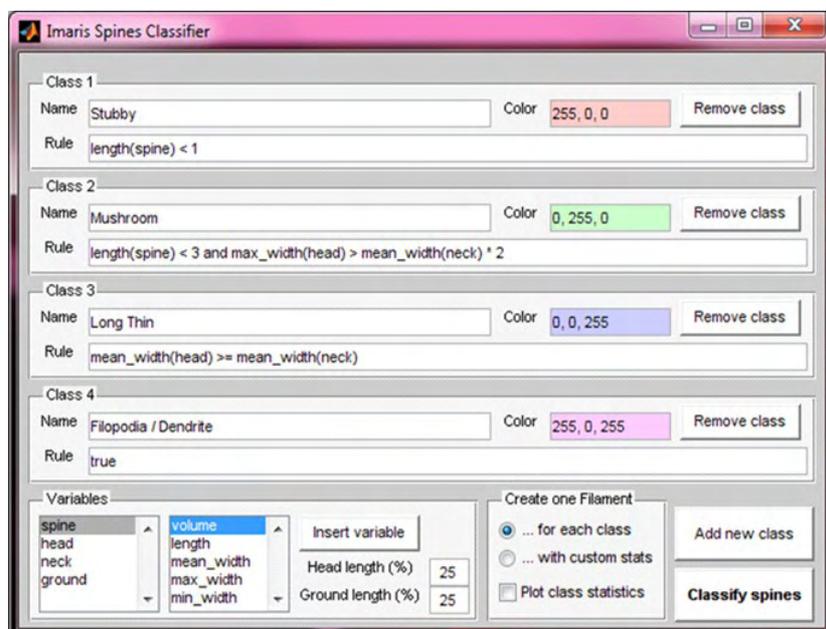


Abbildung 25: *Imaris: "Spines Classifier"*. Mit dieser Unterfunktion von Imaris lassen sich die Spines in die abgebildeten vier verschiedenen Klassen differenzieren. Jede Klasse wird durch den Namen, einer Regel („Rule“), und die Farbgebung beschrieben. Man kann sowohl Klassen hinzufügen als auch entfernen und die Eigenschaften manuell ändern. Die Regeln werden von Imaris selbst festgelegt und beruhen auf den realen Parametern der derzeitigen Forschung.

Jede Klasse wird durch Namen, Klassifikationsregeln („Rule“) und Farben beschrieben. Man kann sowohl die Klassen entfernen, als auch die Liste um neue Klassen erweitern. Die Parameter bzw. Klassenregeln, die einer Eigenschaft der Spines entsprechen, sind vorgegeben und richten sich nach logischen Angaben aus der Matlab-Software. Diese orientieren sich an den realen Eigenschaften der derzeitigen Forschung bezüglich der unterschiedlichen Klassen. Die Regeln geben die Reihenfolge der Spineklassifizierung vor.

Die Ergebnisse werden in Form eines Balkendiagrammes dargestellt (Abbildung 26). Auf der Y-Achse wird dazu die Anzahl und auf der X-Achse die Spine-Klasse dargestellt. Die jeweiligen Werte können sich auch durch Anklicken der Säule anzeigen lassen.

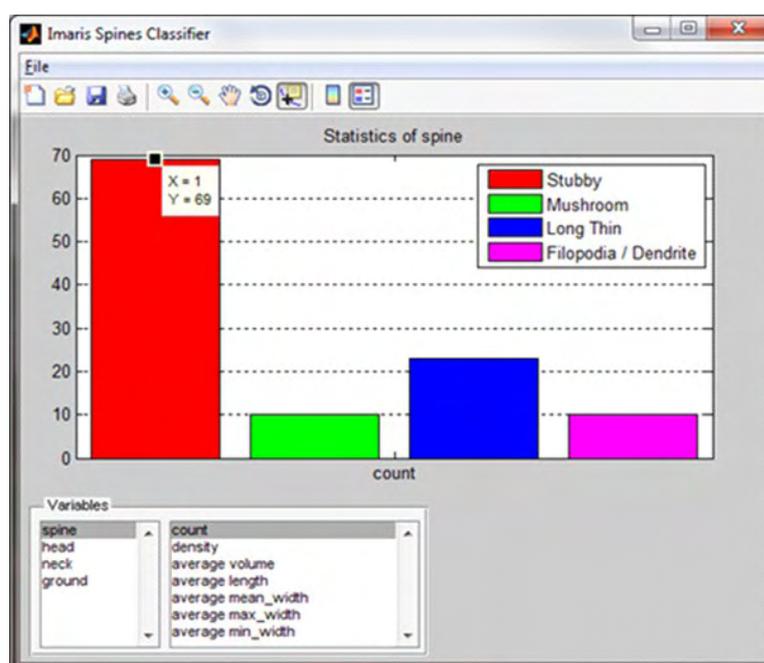


Abbildung 26: **Imaris: Datendarstellung im Balkendiagramm.** Wiedergabe der Analysedaten in Form eines Balkendiagrammes mit Hilfe einer Softwareverknüpfung mit Matlab. Es können unterschiedliche Variablen ausgesucht werden, zu denen Messwerte wiedergegeben werden sollen. Auf dieser Abbildung ist die Spineanzahl der vier unterschiedlichen Klassen dargestellt. Die Y-Achse gibt die Anzahl und die X-Achse die Klassen wieder, die hier durch vier verschiedene Farben gekennzeichnet sind. Das X, erhält man durch Anklicken der Säule, steht für die Klasse, in diesem Fall 1=stubbys, und das Y gibt den Wert auf der Y-Achse, also die Anzahl, wieder.

Die Daten können nicht übernommen werden und müssen manuell in Excel eingetragen werden. Dieser Prozess zusammen mit der 3D-Rekonstruktion macht die Analyse der Dendriten mit ihren Spines zu einem sehr zeitaufwendigem Verfahren.

3.7 Statistische Analyse der Daten

Die statistische Analyse der Messwerte des Projektes wurde in drei verschiedenen Abschnitten durchgeführt. Zu Beginn, nach dem manuellen Exportieren der Messwerte aus Imaris in Excel, wurde die deskriptive Statistik angewendet. Dazu gehört die Ermittlung der Mittelwerte und der Standardabweichung. Diese wurde in den Diagrammen als Fehlerbalken dargestellt, um die Streuung der Messwerte um den Mittelwert zu demonstrieren. Um die beiden Messgruppen Neuroserpin-Wildtyp und –Knockout vergleichen zu können und um zu ermitteln, ob eine signifikante Differenz (p-Wert $<0,05$) zwischen beiden Wertepaaren bezüglich der Messdaten zu verzeichnen ist, wurde der ungepaarte Student's T-Test angewendet. Die signifikanten Unterschiede sind in den Diagrammen durch kleine „*“ gekennzeichnet worden. Dabei muss der Signifikanzwert unter 0,05 liegen, also unter 5 Prozent. Im zweiten Schritt wurde die Statistiksoftware SPSS verwendet, um auch hier einen T-Test durchzuführen und mit den Ergebnissen von Excel zu vergleichen. Es bestand keine Änderungen zu den bereits in Excel ermittelten Werten. Des Weiteren wurden die Messwerte hinsichtlich ihrer Normalverteilung mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test überprüft. Waren die Messwerte nicht normalverteilt, so wurde mit dem Mann-Whitney-Test die Signifikanz geprüft. Im dritten Abschnitt wurde eine Varianzanalyse mit dem Levene-Test durchgeführt. Einige Messwerte zeigten eine ungleiche Varianz. In diesem Fall ist in SPSS der sogenannte Welch-Test angewendet worden, um den Signifikanzwert der Daten mit ungleichen Varianzen zu ermitteln. Diese Daten sind in den Diagrammen mit „**“ als Zeichen für einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout nach Durchführung der Welch-Modifikation gekennzeichnet worden.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist es, die Morphologie dendritischer Spines in Neuroserpin-Knockout Mäusen zu analysieren. Dazu werden nach der Färbung der Neuronen mit DiI diese unter dem Mikroskop analysiert und Bilder von Dendriten in den Hirnregionen Hippocampus und Amygdala aufgenommen. Anschließend können die Aufnahmen mit Hilfe der Analysesoftware Imaris im Hinblick auf die unterschiedlichen Aspekte in der Spinemorphologie untersucht und die Ergebnisse statistisch ausgewertet werden.

4.1 *Mikroskopische Analyse der Hirnregionen*

Für beide Hirnregionen wurde derselben Zelltyp, Pyramidenzellen, von Neuronen für die Analyse herangezogen. Es sind jeweils die apikalen Dendriten dieses Zelltyps für die Analyse ausgewählt worden.

Die Abbildungen 27 und 28 zeigen Aufnahmen des konfokalen Mikroskops von Ansammlungen der Pyramidenzellen in der CA1-Region des Hippocampus und veranschaulichen das Färbeprinzip des DiI anhand der Neurone.

Die Neuronen wurden mit roten DiI-Fluoreszenzkristallen unter dem Mikroskop visualisiert. In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass die Zellmembran und die Zellfortsätze der Neuronen gefärbt sind und die Somata hingegen schwarz vorliegen, da DiI sich nur über Diffusion entlang der lipophilen und hydrophoben Zellmembran ausbreiten kann [42]. Die apikalen Dendriten verlaufen, ausgehend von den Somata der Neuronen, welche eine dreieckige Form aufweisen, senkrecht zum oberen Bildrahmen.

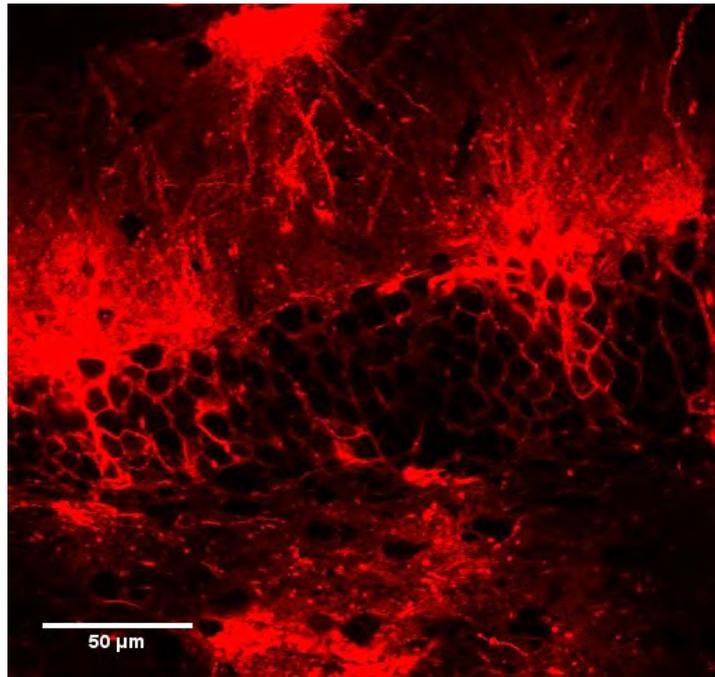


Abbildung 27: Mikroskopaufnahme: Pyramidenzellen im Hippocampus. Die Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus wurden durch eine Färbung mit DiI-Fluoreszenzkristallen sichtbar gemacht. Auf dem Bild sind die Reihenbildung und Cluster der Pyramidenzellen sowie das Färbeprinzip des DiI sehr gut zu erkennen. Die Zellmembranen fluoreszieren rot, genauso wie die Dendriten. Das Soma der Neuronen bleibt hingegen schwarz, da sich DiI nur über Diffusion entlang der lipophilen und hydrophoben Zellmembran ausbreiten kann [42]. Die apikalen Dendriten sind zum oberen Bildende – orthogonal zur Hirnoberfläche - gerichtet. Basale Dendriten sind nicht zu erkennen. Für die Analyse wurden Bereiche auf dem Dendriten gewählt, die ungefähr 100µm vom Soma entfernt liegen. Der Maßstabsbalken in der unteren linken Ecke zeigt eine Länge von 50µm.

In der Abbildung 28 ist eine andere Aufnahme dargestellt, bei welcher die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen in Richtung der unteren linken Ecke ausgerichtet sind. Ihre eindeutige klare, rote Färbung ist optimal für eine Analyse geeignet. Auch hier ist das Prinzip der DiI-Färbung wieder gut symbolisiert. Die Zellmembranen leuchten rot und das Volumen der Somata liegt schwarz vor. Es fluoresziert nur ein Teilbereich des Bildes, in dem der Kristall in das Gewebe eingebracht wurde. Die Diffusion hat die obere linke Ecke des Bildes noch nicht erreicht.

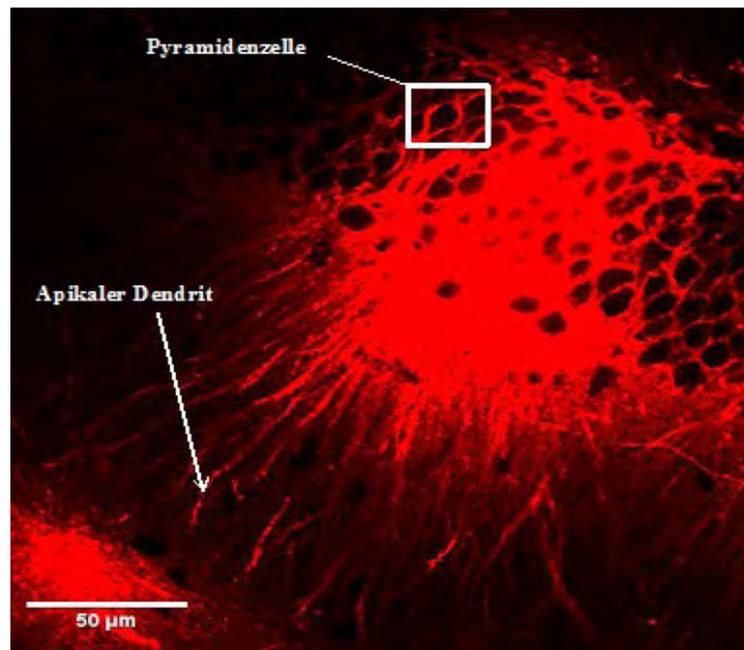


Abbildung 28: Mikroskopaufnahme: Lage apikaler Dendrit im Hippocampus. Die Pyramidenzellen (weiß umrahmt) der CA1-Region des Hippocampus wurden durch eine Färbung mit DiI-Fluoreszenzkristallen sichtbar gemacht. Auf dieser Abbildung sind die Pyramidenzellen eines anderen Hippocampusschnittes zu erkennen. Die apikalen Dendriten, hier sehr gut zu erkennen durch die Färbung, sind in diesem Fall zur unteren linken Bildecke gerichtet, da diese Aufnahme nicht gedreht wurde und sich der Hirnschnitt auf dem Kopf liegend unter dem Objektiv befand.

Es wurden für die Analyse zunächst immer erst Aufnahmen ohne optischen Zoom von den Pyramidenzellen angefertigt, um die nötige Entfernung vom Soma mit Hilfe des Maßstabsbalkens abschätzen zu können, einen Bereich auf dem Dendriten für die Analyse auszuwählen und diesen anschließend zu vergrößern.

In Abbildung 29 ist ein einzelner apikaler Dendrit unter vierfachem optischen Zoom abgebildet.

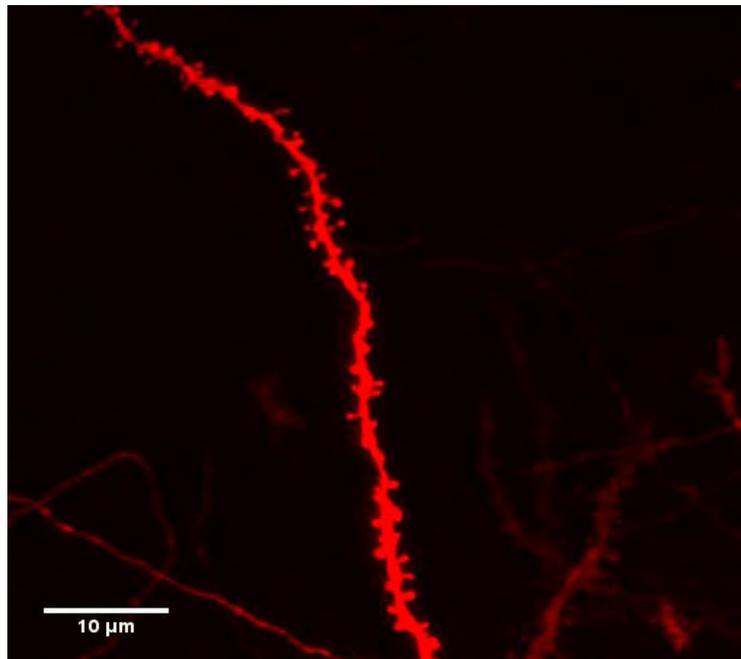


Abbildung 29: Mikroskopaufnahme: Einzelner DiI-gefärbter Dendriten im Hippocampus. Die Dendriten der Neurone in der CA1-Region des Hippocampus wurden durch eine Färbung mit DiI-Fluoreszenzkristallen sichtbar gemacht. Der komplette Dendrit ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff ausgefüllt und leuchtet rot. Die dendritischen Protrusionen, die Spines, sind auf diese Weise deutlich zu erkennen. Man kann die einzelnen für die Spines charakteristischen Bestandteile, wie Kopf und Hals erkennen und die Spines hinsichtlich ihrer Formen morphologisch unterscheiden. Der Maßstabsbalken in der unteren linken Ecke weist eine Länge von 10μm auf.

Durch die Färbung der Neurone mit DiI sind die einzelnen dendritischen Protrusionen, die Spines, klar zu erkennen, auch ihre charakteristischen Merkmale, wie Kopf und Hals sind nachweisbar. Untereinander sind die Spines durch ihre unterschiedlichen Formen und Charakteristika in verschiedene Klassen differenzierbar. Im Hintergrund sind durch eine leichte Rotfärbung noch weitere Dendriten zu identifizieren.

In Abbildung 30 ist ein Ausschnitt eines weiteren Dendriten dargestellt.

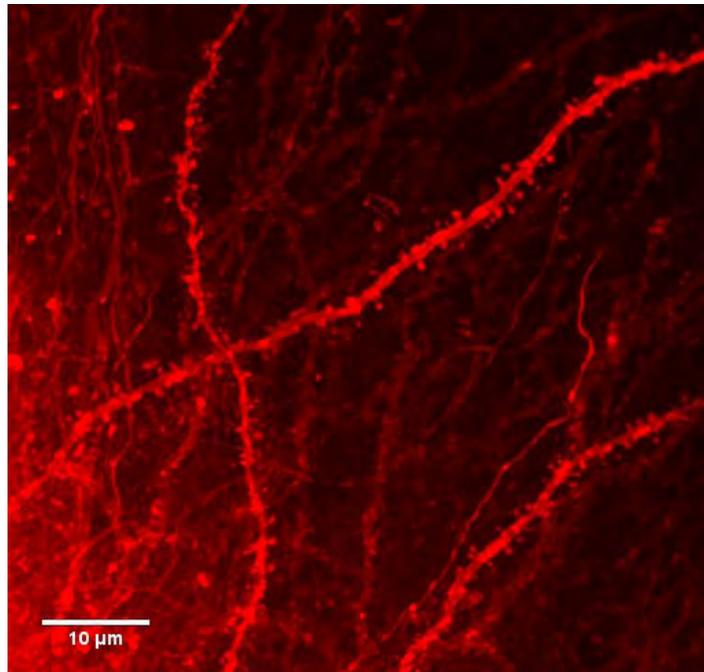


Abbildung 30: Mikroskopaufnahme: Mehrere DiI-gefärbte Dendriten im Hippocampus. Die Dendriten der Neurone in der CA1-Region des Hippocampus wurden durch eine Färbung mit DiI-Fluoreszenzkristallen sichtbar gemacht. Die kompletten Dendriten sind durch Diffusion des DiI mit dem Fluoreszenzfarbstoff ausgefüllt und leuchten rot. Auf diesem Bild sind neben dem vertikalen Dendriten in der Mitte des Bildes noch weitere Dendriten sichtbar. Die Spines untereinander sind in hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Morphologie deutlich zu differenzieren. Des Weiteren sind die einzelnen Komponenten der Spines, wie Kopf und Hals, klar erkennbar. Der Hintergrund weist eine stärkere rote Färbung auf. Der Maßstabsbalken beträgt 10µm.

In diesem Bild (Abbildung 30) ist eine größere Dichte an Spines zu erkennen als in Abbildung 29. Im Hintergrund wurden noch mehr Dendriten gefärbt, wohingegen in Abbildung 29 der apikale Dendrit isoliert vorliegt.

Neben dem Hippocampus wurde auch die Region der Amygdala, der basolaterale Komplex, untersucht. Wie beim Hippocampus wurden auch hier zuerst die Bilder von den Zellen aufgenommen und dann der Bereich auf dem Dendrit, der für die Analyse gewählt wird, vergrößert.

In Abbildung 31 sind die Pyramidenzellen im Amygdala dargestellt. Die einzelnen Zellen und ein apikaler Dendrit sind durch die DiI-Färbung deutlich sichtbar.

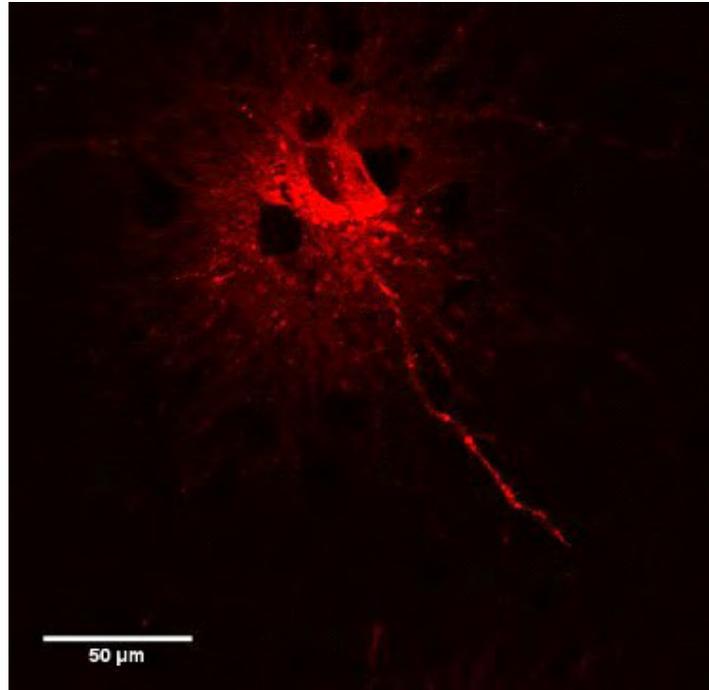


Abbildung 31: Mikroskopaufnahme: Pyramidenzelle im Amygdala. Die Neurone des in 4 % PFA fixiertem Hirngewebes wurden durch eine Färbung mit DiI-Fluoreszenzstoff sichtbar gemacht. Der rote Farbstoff diffundiert die Zellmembran der Neurone entlang und bringt sie somit zum Fluoreszieren. Die einzelne Pyramidenzelle des basolateralen Komplexes der Amygdala und ihr apikaler Dendrit sind deutlich sichtbar. Die Zellen liegen einzeln vor und es sind wenig gefärbte Dendriten nachzuweisen. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 50μm.

Vergleicht man die Abbildungen 28 und 31, so erkennt man, dass in der Abbildung 31 wesentlich weniger Pyramidenzellen vorliegen und diese auch nicht in Reihen übereinander, sondern eher als einzelne Zellen, vorzufinden sind.

Ebenso ist die Anzahl der vorhandenen und gefärbten Dendriten reduziert. Die charakteristische dreieckige Form der Pyramidenzelle ist jedoch deutlich zu erkennen.

In Abbildung 32 ist ein Dendritenausschnitt einer Pyramidenzelle des basolateralen Komplex der Amygdala dargestellt. Die Spines sind eindeutig zu erkennen und untereinander in ihrer Form differenzierbar. Sowohl der Hals als auch der Kopf sind erkennbar, je nach Klasse des Spines.

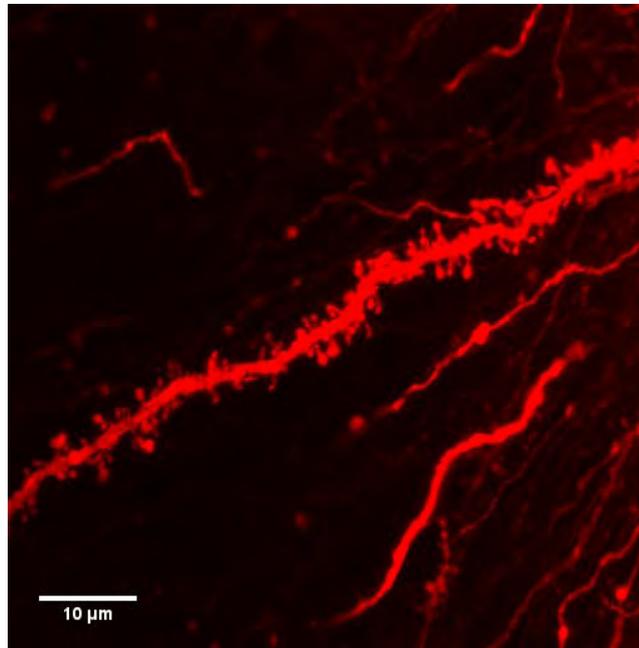


Abbildung 32: Mikroskopaufnahme: Einzelner DiI-gefärbter Dendriten im Amygdala. Der Dendrit wurde durch eine Färbung mit DiI-Fluoreszenzkristallen sichtbar gemacht. Der Farbstoff ist über die Zellmembran der Neurone entlang in die Fortsätze und Spines diffundiert. Abgebildet ist ein Dendrit in der Region der Amygdala. Die dendritischen Spines können klar von einander differenziert werden. Die Komponenten der Struktur eines einzelnen Spines, wie Kopf und Hals, sind deutlich sichtbar. Die Länge des Maßstabsbalken beträgt 10μm.

Vergleicht man den Dendriten der Amygdala (siehe Abbildung 32) und die des Hippocampus (siehe Abbildungen 29 und 30), dann ist kein großer Unterschied zwischen den Färbungen und den Dendriten erkennbar.

Anhand der einzelnen Dendritenausschnitte der Pyramidenzellen des Hippocampus und der Amygdala wurde die morphologische Analyse der Spines mit Hilfe der Imaris Software von Bitplane, wie in den Methoden beschrieben, durchgeführt.

4.2 Analyse der Spineanzahl

Es wurden insgesamt 180 Dendriten der CA1-Region des Hippocampus und 120 Dendriten des basolateralen Komplexes der Amygdala analysiert. Bei der Ermittlung der Spineanzahl wurden alle vorhandenen Spines gezählt, unabhängig von den Klassen.

4.2.1 Anzahl der Spines im Hippocampus

Es konnte eine totale Anzahl der dendritische Spines von $11265 \pm 34,4$ bei den Neuroserpin-Knockout Mäusen im Hippocampus ermittelt werden. Die Anzahl der Wildtyp Mäuse betrug hingegen nur $10471 \pm 27,2$ Spines. Damit ist kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachweisbar (vgl. Abbildung 33). Die Signifikanz der Messwerte wurde mit Hilfe des ungepaarten Student's T-Test überprüft. Anschließend wurde die Varianz der Messwerte getestet. Da bei der Spineanzahl eine ungleiche Varianz festgestellt wurde, ist der sogenannte Welch-Test in SPSS durchgeführt worden, um auf diese Weise die Signifikanz festzustellen (**). Es ergab sich allerdings keine große Änderung in der Signifikanz (P-Wert vorher '*' 0,058; nach Welch-Test '**' 0,059).

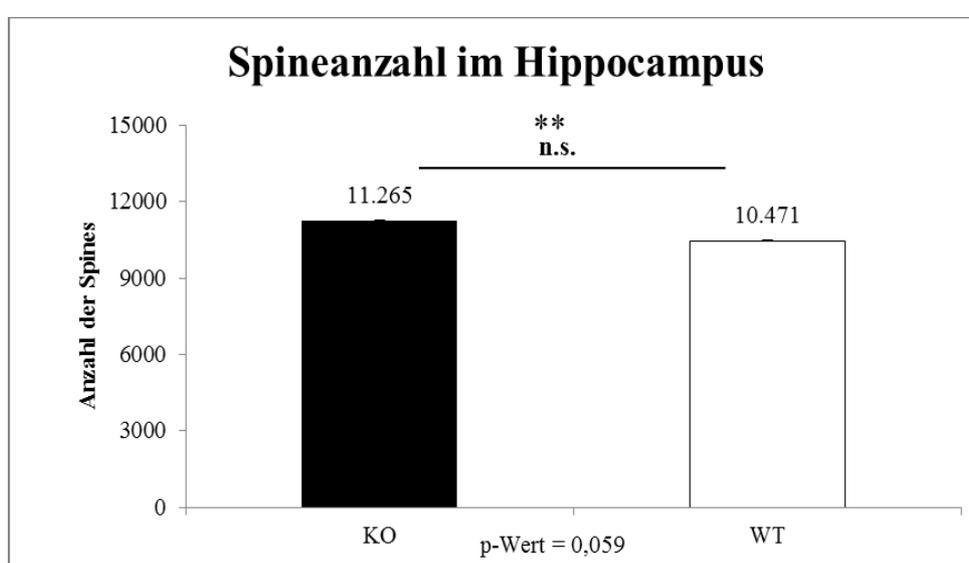


Abbildung 33: **Spineanzahl im Hippocampus.** Dieses Diagramm veranschaulicht den Vergleich der Anzahl an dendritischen Spines zwischen Neuroserpin-Knockout Mäusen (KO) und den Wildtyp Mäusen (WT). Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen zu verzeichnen ($P\text{-Wert} > 0,05 \rightarrow n.s.$). Die KOs weisen mit $11265 \pm 34,4$ Spines im Hippocampus eine wesentlich größere Anzahl auf, als der WT mit $10471 \pm 27,2$. Diese Werte sind aber nicht signifikant und damit nicht unbedingt aussagekräftig. Die Signifikanz wurde mit dem ungepaarten Student's T-Test getestet ($P\text{-Wert} = 0,059$) und wegen ungleicher Varianz mit dem Welch-Test in SPSS überprüft (**).

Neben der totalen Anzahl der Spines wurde auch ermittelt, mit welchem Prozentsatz jede der vier Spineklassen dabei vertreten ist. Tabelle 2 veranschaulicht die prozentuale Vertretung der unterschiedlichen Klassen an der Gesamtanzahl. Ungefähr 52% der gesamten Spines im Hippocampus sind demnach die stummelförmigen Spines, stubbys. Bezüglich dieses Wertes unterscheiden sich die Wildtyp Mäuse auch nicht stark von den Neuroserpin-Knockout Mäusen. Mit ca. 6% sind nur die als reife Spine angesehenen mushrooms [27] vertreten.

Die long thins sind mit ungefähr 19%, also knapp einem Fünftel an der Gesamtanzahl, nach den filopodia mit ca. 23% die dritthäufigste vorkommende Klasse von Spines in diesem Versuch. Zwischen den Gruppen sind bezüglich der prozentualen Anteile keine gravierenden Unterschiede zu verzeichnen.

Die größte Differenz mit 0,42% (siehe Tabelle 2) tritt in der Klasse der long thins auf. Die Wildtyp Mäuse haben mit 19,04% 0,42% mehr long thins als die Neuroserpin-Knockout Mäuse.

Tabelle 2: Prozentuale Vertretung der einzelnen Klassen an der Gesamtanzahl der dendritischen Spines im Hippocampus. Am meisten sind die stubbys in beiden Gruppen mit ungefähr 52% vertreten. Den geringsten Prozentsatz nehmen die reifen mushrooms mit ca. 6% ein. Die long thins sind mit ungefähr 19% und die filopodia mit ca. 23% vertreten. Der größte Unterschied im Prozentsatz unterscheiden sich KO und WT bei der Klasse der long thins mit 0,42%.

	KO	WT	Differenz
stubby	52,00%	51,87%	0,13%
mushroom	05,83%	06,17%	0,34%
long thin	18,62%	19,04%	0,42%
filopodia	22,80%	22,91%	0,11%

4.2.2 Anzahl der Spines im Amygdala

Im Amygdala (Abbildung 34) ist ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mäusegruppen hinsichtlich der totalen Anzahl dendritischer Spines zu verzeichnen. Die Wildtyp Mäuse weisen mit $7675 \pm 26,36$ ungefähr 700 Spines mehr in der Region der Amygdala auf als die Neuroserpin-Knockout Mäuse mit $6996 \pm 27,33$.

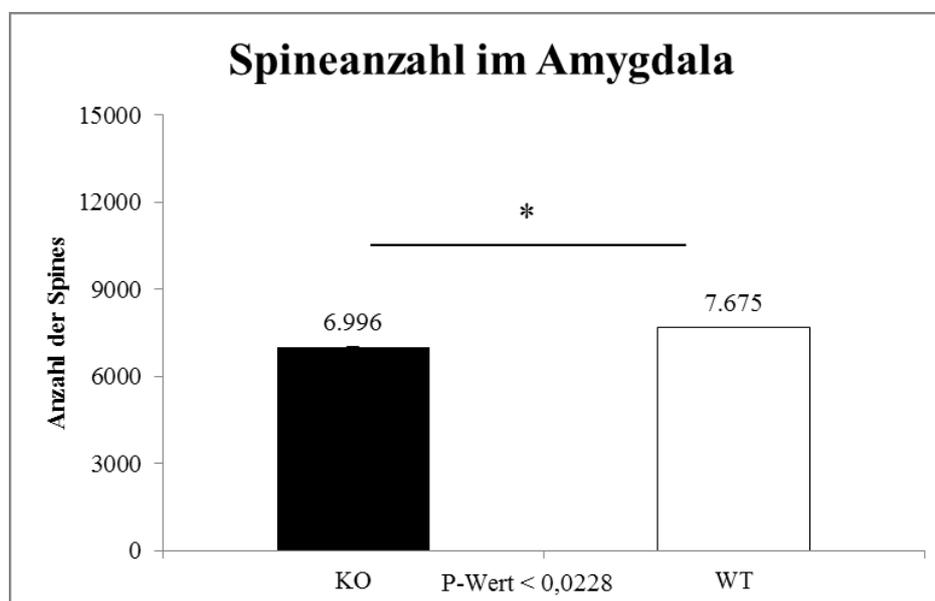


Abbildung 34: Spineanzahl im Amygdala. Dieses Diagramm veranschaulicht den Vergleich der Anzahl an dendritischen Spines zwischen Neuroserpin-Knockout Mäusen (KO) und den Wildtyp Mäusen (WT). Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die KO Mäuse besitzen mit $6996 \pm 27,33$ wesentlich weniger Spines als die Wildtyp Mäuse mit $7675 \pm 26,36$. Die Signifikanz wurde mit dem ungepaarten Student's T-Test überprüft ($P\text{-Wert} < 0,0228 \rightarrow$ signifikant '').*

Wie für die Region des Hippocampus wurde auch im Amygdala ermittelt, mit welchem Prozentsatz welche der vier Spineklassen an der Gesamtanzahl vertreten ist (siehe Tabelle 3). Die kleinste Gruppe bilden, wie auch schon im Hippocampus, die reifen mushrooms mit ca. 8% aller Spines im

Amygdala. Die anderen drei Klassen sind mit um die 30% alle ähnlich stark vertreten, im Vergleich zu den mushrooms. Den größten Anteil an der Gesamtanzahl der dendritischen Spines haben die filopodia. Jedoch variieren in der Amygdala die prozentualen Anteile der unterschiedlichen Klassen zwischen beiden Gruppen etwas. Bei den KO gibt es ca. 33,5% filopodia und bei den WT Mäusen, mit 2,37% mehr, sind es 35,9% .

Am zweithäufigsten vertreten sind die stummeligen Spines, die stubbys. Aber auch hier ist es ein Unterschied von 1,77% von 30,41% bei den KOs und 28,64% bei den Wildtyp Mäusen.

Tabelle 3: Prozentuale Vertretung der einzelnen Klassen an der Gesamtanzahl der dendritischen Spines in der Amygdala. Mit ca. 8% gibt es am wenigsten mushrooms im Amygdala. Alle drei anderen Klassen sind in etwa gleichstark vertreten. Jedoch variieren im Amygdala die prozentualen Anteile der unterschiedlichen Klassen zwischen beiden Gruppen etwas. Die meisten Spines der Amygdala gehören der Gruppe der filopodia an, bei den KO ca. 33,5% und bei den WT Mäusen, mit 2,37% mehr, gibt es 35,9% filopodias.

	KO	WT	Differenz
stubbys	30,41%	28,64%	1,77%
mushrooms	07,70%	08,10%	0,40%
long thins	28,34%	27,36%	0,98%
filopodia	33,53%	35,90%	2,37%

4.3 Analyse der Spinemorphologie im Hippocampus

Die morphologische Analyse der Spines im Hinblick auf die Differenzierung der unterschiedlichen Spinearten in verschiedenen Klassen und die Analyse der Gestaltsmerkmale, wie Kopf und Hals, wurden mit Hilfe der Imaris-Software von Bitplane durchgeführt. Es gab verschiedene Parameter, die innerhalb dieses Projektes untersucht werden sollten. Neben der Klassifizierung der Spines wurden auch verschiedene Messungen am Dendriten durchgeführt, die die Spines betreffen.

Es sind die Dichte der Spines pro μm Dendrit und die Länge aller vorhandenen Spines auf dem Dendritenausschnitt gemessen worden.

Des Weiteren wurden die Spines im Bezug auf ihre Gestalt und den für Spines charakteristischen Eigenschaften untersucht: Es sind sowohl die Kopfbreite als auch die Halslänge und -breite ermittelt worden. Bei allen fünf Messparametern wurde auch hinsichtlich der vier verschiedenen Spineklassen differenziert, so dass am Ende der Analyse pro Hirnregion 20 verschiedene Datenvergleiche zwischen den Mäusegruppen Neuroserpin-Knockout und dem Wildtyp vorliegen. Es wurden alle Messwerte statistischen überprüft.

Dabei ergaben sich für den Hippocampus aus 20 Messungen 8 signifikante morphologische Unterschiede zwischen den Neuroserpin-Knockout Mäusen und den Wildtyp Mäusen (Abbildung 35).

In der Abbildung 35 sind alle 20 Messungen und Vergleiche der Mäusegruppen veranschaulicht. Die Abbildung ist in der Y-Achse bezüglich der fünf verschiedenen Parameter, Dichte, Länge, Kopfbreite, Halslänge sowie Halsbreite aufgeteilt. Auf der X-Achse wurden die vier Klassen der Spines: stubby, mushroom, long thins und filopodia dargestellt.

Um die signifikanten morphologischen Unterschiede (P-Wert unter 0,05) hervorzuheben, wurde die Diagramme, bei denen diese auftreten, gelb hinterlegt.

Es sind jeweils die Durchschnittswerte der Messungen und die dazugehörigen Standardabweichungen, als Fehlerbalken, in den Säulendiagrammen dargestellt. Bei signifikanten Unterschieden sind die Messwerte an den Balken notiert und durch einen '*' zwischen den Balken symbolisiert worden. Der jeweilige P-Wert ist unterhalb der X-Achse angegeben.

Es ist zu erkennen, dass bezüglich des Parameters der Kopfbreite in allen 4 Klassen signifikante Unterschiede zwischen den KO und WT zu verzeichnen sind. In der Dichte hingegen liegen keine signifikanten vor.

Für eine Analyse sind nur die signifikanten Werte aussagekräftig. Aus diesem Grund werden auch nur diese Werte verwendet und im weiteren Verlauf detailliert beschrieben.

Die anderen Ergebnisse werden nicht weiter analysiert.

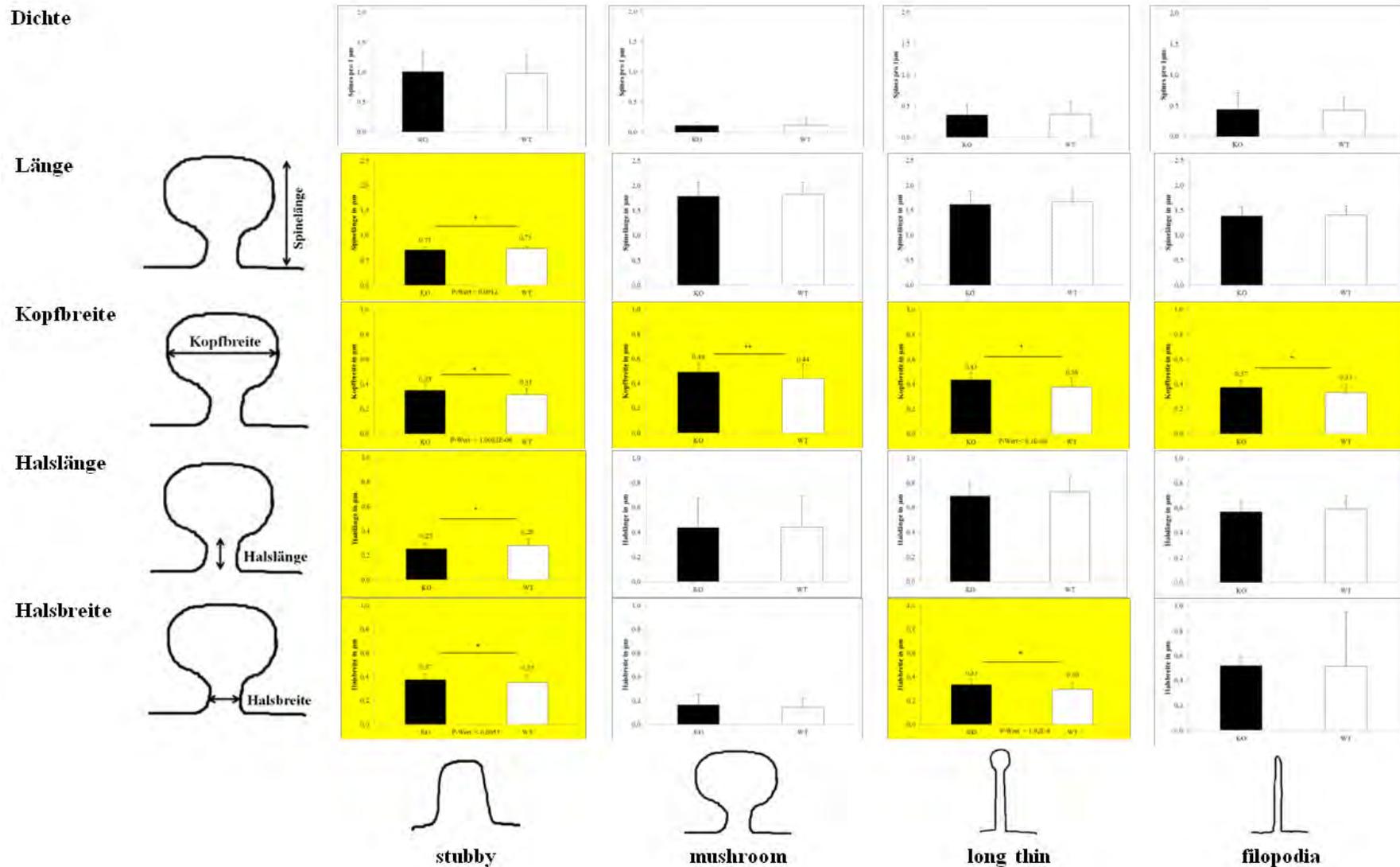


Abbildung 35: **Datendarstellungen aller Messparameter pro Spineklasse im Hippocampus.** Auf der Y-Achse dieser Darstellung sind die fünf Messparameter Dichte, Länge, Kopfbreite, Halslänge und Halsbreite aufgelistet. Daneben befinden sich die Symbole, die die jeweilige Messregion am Spine veranschaulichen. Die X-Achse der Abbildung ist in die vier Klassen stubby, mushroom, long thin und die filopodia eingeteilt. In den einzelnen Diagrammen wurden jeweils die Messwerte der Wildtyp mit den Neuroserpin-Knockout Mäusen verglichen. Bei signifikanten Unterschieden in der Morphologie zwischen beiden Gruppen (getestet über den Student's T-Test), wurden die Graphen gelb hervorgehoben und die Messwerte an den Balken notiert. Die Messwerte sind Durchschnittswerte und wurden mit der jeweiligen Standardabweichung, als Fehlerbalken, dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei der Kopfbreite in allen Klassen ein signifikanter Unterschied zwischen KO und WT auftritt. In der Dichte hingegen ist keiner vorhanden.

4.3.1 Spinelänge

In Abbildung 36 ist die durchschnittliche Länge der stubbys im Hippocampus bei Wildtyp Mäusen und den Neuroserpin-Knockout Mäusen dargestellt. Es wurden jeweils die Durchschnittslängenwerte und die dazugehörige Standardabweichung durch Fehlerbalken dargestellt. Es konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich der Länge zwischen beiden Maustypen nachgewiesen werden. Der P-Wert ist kleiner als 0,0012. Er wurde über den ungepaarten Student's T-Test ermittelt. Die Knockout Mäusen weisen mit nur $0,71 \pm 0,05 \mu\text{m}$ eine deutlich kleinere Länge der stubbys auf, als die Wildtyp Mäuse mit $0,73 \pm 0,04$. Damit ist ein erster Unterschied in der Morphologie der Spines zwischen Neuroserpin-Knockout und Wildtyp Mäusen zu verzeichnen.

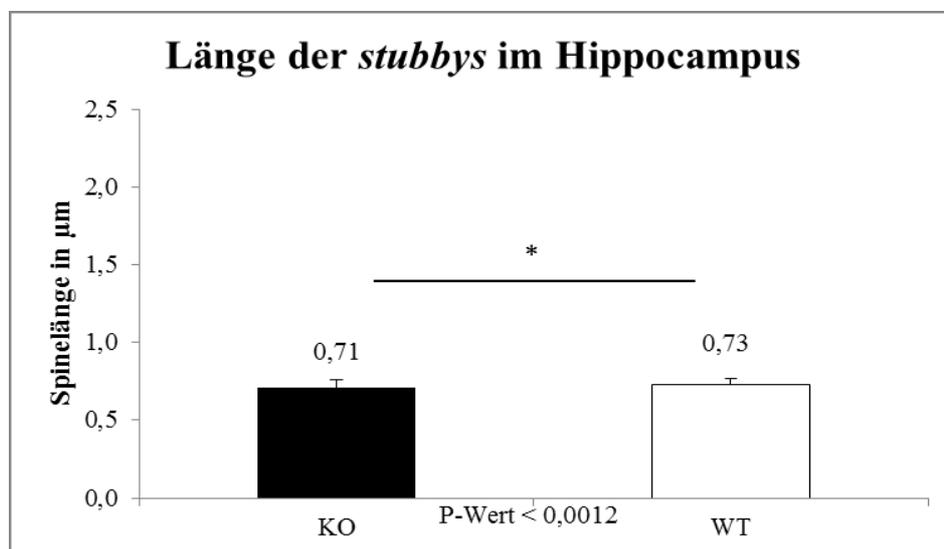


Abbildung 36: **Länge der stubbys im Hippocampus.** Es wurden die Durchschnittswerte aller gemessenen Längen (μm) von stubbys beider Mäusegruppen abgebildet und die dazugehörige Standardabweichung in Form eines Fehlerbalkens mit eingetragen. Es liegt ein signifikanter Unterschied ($P\text{-Wert} < 0,0012$) bezüglich der Länge zwischen WT und KO vor. Die stubbys weisen bei den WT Mäusen eine Länge von $0,73 \pm 0,04 \mu\text{m}$ auf. Bei den Knockout Mäusen hingegen beträgt die Länge lediglich $0,71 \pm 0,05 \mu\text{m}$. Die Signifikanz wurden mit einem ungepaarten Student's T-Test überprüft (*).

4.3.2 Kopfbreite

Ein weiterer Parameter, der untersucht wurde, ist die Kopfbreite.

Die Abbildung 37 zeigt die einzelnen Messwerte der durchschnittlichen Kopfbreiten, in μm , der KO und der WT Mäuse. Es wurden auch hier die durchschnittlichen Messwerte, der Durchmesser, und die dazugehörige Standardabweichung in Form von Fehlerbalken abgebildet.

Bei der Analyse der Kopfdurchmesser konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Neuroserpin-Knockout und Wildtyp Mäusen nachgewiesen werden. Die KO Mäuse weisen, mit $0,35 \pm 0,04 \mu\text{m}$, einen $0,04 \mu\text{m}$ breiteren Kopf auf, als die Wildtyp Mäuse mit $0,31 \pm 0,05 \mu\text{m}$.

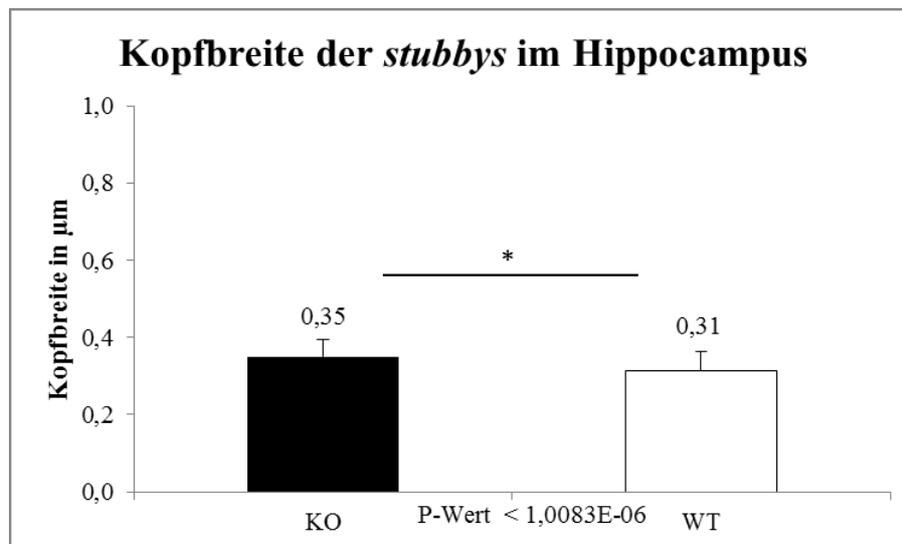


Abbildung 37: **Kopfbreite der stubbys im Hippocampus.** Es wurden die Durchschnittswerte aller gemessenen Durchmesser der Köpfe (μm) von stubbys beider Mäusegruppen abgebildet und die dazugehörige Standardabweichung in Form eines Fehlerbalkens eingetragen. Es liegt ein signifikanter Unterschied ($P\text{-Wert} < 1,0083E-06$) bezüglich des Kopfdurchmessers zwischen WT und KO vor. Die stubbys weisen bei den WT Mäusen eine Kopfbreite von $0,31 \pm 0,05 \mu\text{m}$ auf. Bei den Knockout Mäusen hingegen beträgt die Breite $0,35 \pm 0,04 \mu\text{m}$. Damit ist der Kopfdurchmesser der stubbys von KO, mit $0,04 \mu\text{m}$, größer als der der WT Mäuse. Die Signifikanz wurden mit einem ungepaarten Student's T-Test überprüft (*).

Die Kopfbreite der mushrooms wurde in der Abbildung 38 dargestellt. Es ist wie bei der Spineklasse der stubbys auch bei den mushrooms ein signifikanter Unterschied zwischen WT und KO vorhanden. Der P-Wert liegt mit $< 0,001$ eindeutig unter $0,05$ und damit ist die Differenz der Messwerte zwischen KO und WT signifikant. Die Spines der Neuroserpin-Knockout Mäuse weisen mit $0,49 \pm 0,07\mu\text{m}$ einen wesentlich größeren Kopfdurchmesser auf, als die Wildtyp Mäuse mit $0,44 \pm 0,12\mu\text{m}$. Da durch den Levene-Test eine ungleiche Varianz der Messwerte bei den mushrooms festgestellt worden ist, wurde der Welch-Test in der Statistiksoftware SPSS durchgeführt. Der P-Wert liegt unverändert bei $< 0,001$.

Vergleicht man Abbildung 37 und 38, dann erkennt man, dass bei den Messwerten der mushrooms eine um einiges größere Fehlerabweichung vorzufinden ist als wenn man den Wildtyp betrachtet.

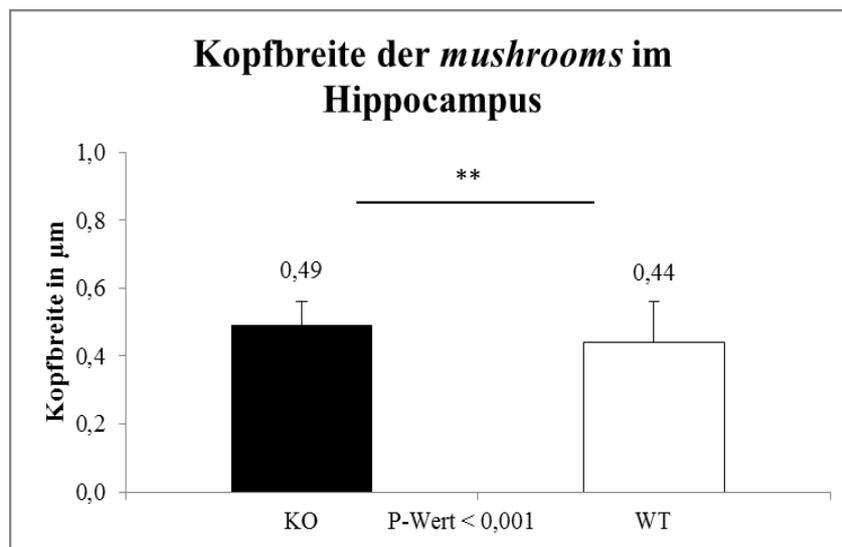


Abbildung 38: **Kopfbreite der mushrooms im Hippocampus.** Es wurden die Durchschnittswerte aller gemessenen Durchmesser der Köpfe (μm) von mushrooms beider Mäusegruppen abgebildet und die dazugehörige Standardabweichung in Form eines Fehlerbalkens eingetragen. Es liegt ein signifikanter Unterschied ($P\text{-Wert} < 0,001$) bezüglich des Kopfdurchmessers zwischen WT und KO vor. Die mushrooms der Wildtyp Mäuse besitzen eine Kopfbreite von $0,44 \pm 0,12\mu\text{m}$. Bei den Knockout Mäusen hingegen beträgt der Durchmesser $0,49 \pm 0,07\mu\text{m}$. Damit ist die Kopfbreite der mushrooms von KO mit $0,05\mu\text{m}$ um einiges größer als die der WT Mäuse. Die Signifikanz wurden mit einem ungepaarten Student's T-Test getestet (*) und aufgrund ungleicher Varianz mit dem Welch-Test überprüft (**).

In Abbildung 39 ist der Kopfdurchmesser der Spines der Klasse long thins in einem Diagramm dargestellt. Es liegt ein signifikanter Unterschied in der Größe der Köpfe von long thins zwischen WT und KO vor. Wie auch schon bei den Klassen der stubbys und der mushrooms sind die Kopfdurchmesser der Neuroserpin-Knockout Mäuse um einiges größer als die des Wildtyps. Der knollenartige Kopf der long thins weist durchschnittlich eine Größe von $0,43 \pm 0,06\mu\text{m}$ auf und ist damit $0,05\mu\text{m}$ größer als ein Spinekopf der Wildtyp Mäuse mit $0,38 \pm 0,07\mu\text{m}$. Der Signifikanzwert des Unterschiedes in der Kopfbreite liegt unterhalb von $6,1\text{E-}08$.

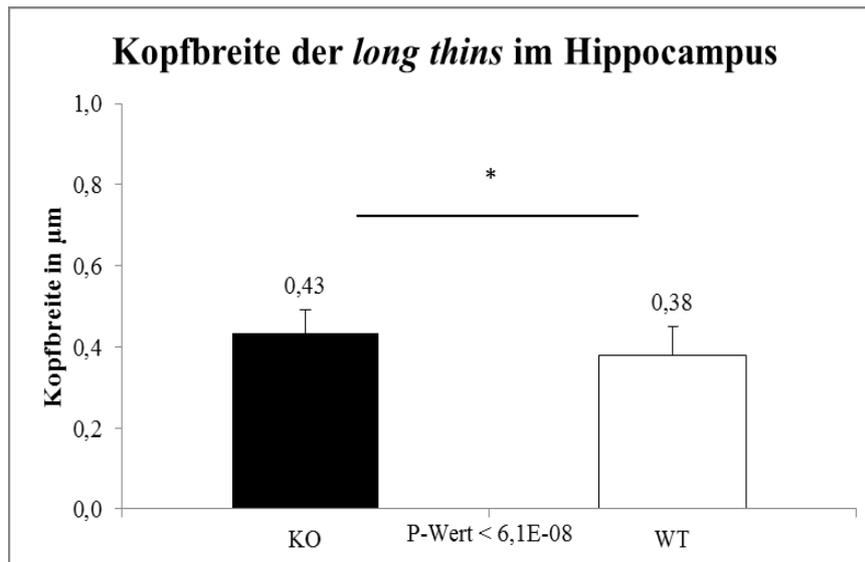


Abbildung 39: **Kopfbreite der long thins im Hippocampus.** Es wurden die Durchschnittswerte aller gemessenen Durchmesser der knollenartigen Köpfe (μm) von long thins beider Mäusegruppen abgebildet und die dazugehörige Standardabweichung in Form eines Fehlerbalkens eingetragen. Es liegt ein eindeutiger signifikanter Unterschied ($P\text{-Wert} < 6,1\text{E-}08$) bezüglich des Kopfdurchmessers zwischen WT und KO vor. Die long thins der Wildtyp Mäuse weisen eine Kopfbreite von $0,38 \pm 0,07\mu\text{m}$ auf. Damit ist der Kopfdurchmesser der KOs mit $0,43 \pm 0,06\mu\text{m}$ größer als der des WTs. Die Signifikanz wurde mit dem ungepaarten Student's T-Test (*) geprüft.

Als letzte Klasse wurden, bezüglich der Kopfbreite, auch die filopodia untersucht. Die Ergebnisse der Messung sind in der Abbildung 40 dargestellt. Mit $0,37 \pm 0,05 \mu\text{m}$ ist der Kopfdurchmesser von Spines der Neuroserpin-Knockout Mäuse signifikant ($P\text{-Wert} < 3,3\text{E-}06$) größer als die Kopfbreite von den Wildtypen mit $0,33 \pm 0,06 \mu\text{m}$.

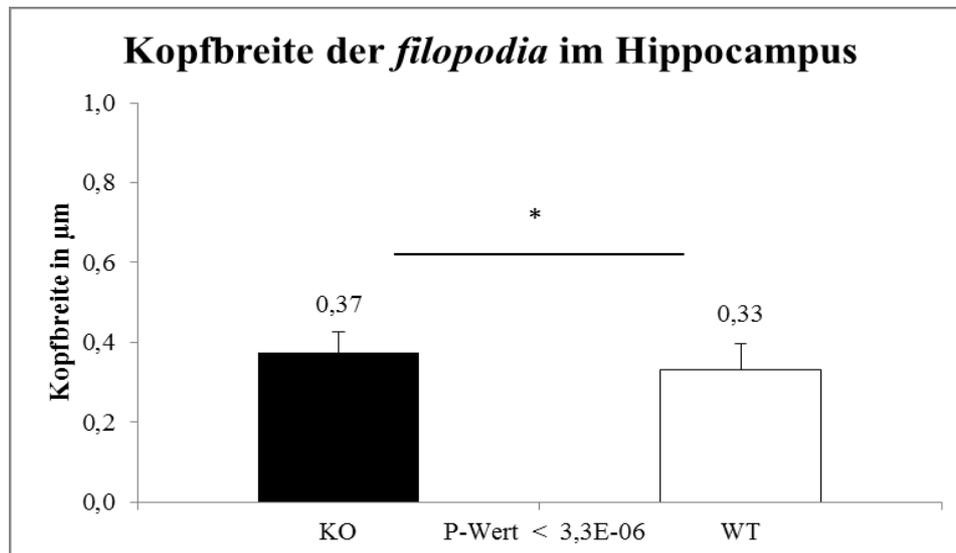


Abbildung 40: **Kopfbreite der filopodia im Hippocampus.** Es wurden die Durchschnittswerte aller gemessenen Kopfdurchmesser (μm) von filopodia beider Mäusegruppen abgebildet und die dazugehörige Standardabweichung in Form eines Fehlerbalkens eingetragen. Es liegt ein eindeutiger signifikanter Unterschied ($P\text{-Wert} < 3,3\text{E-}06$) bezüglich des Kopfdurchmessers zwischen WT und KO vor. Die filopodia weisen bei den WT Mäusen eine Kopfbreite von $0,33 \pm 0,06 \mu\text{m}$ auf. Bei den Knockout Mäusen hingegen beträgt die Breite $0,37 \pm 0,05 \mu\text{m}$. Damit ist der Kopfdurchmesser der filopodias von KO mit $0,04 \mu\text{m}$ um einiges größer als der der WT Mäuse. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten Student's T-Test überprüft (*).

Damit kann man zusammenfassend sagen, dass in allen vier Klassen beim Parameter der Kopfgröße die Knockout Mäuse einen eindeutig größeren Spinekopf besitzen als die Wildtyp Mäuse. Ein klarer morphologischer Unterschied zwischen beiden Mäusetypen, der alle Spinearten betrifft, konnte damit aufgedeckt werden.

4.3.3 Halslänge

Ein weiteres charakteristisches Merkmal, neben dem Kopf eines Spines, ist der Hals. Um festzustellen, ob es auch signifikante Unterschiede bezüglich dieses Merkmals zwischen dem Neuroserpin-Knockout und den Wildtyp Mäusen gibt, wurden sowohl die Halsbreite als auch die Halslänge analysiert.

In Abbildung 35 ist zu erkennen, dass im Hinblick auf die Halslänge eines Spines nur ein signifikanter Unterschied in der Klasse der stubbys nachgewiesen werden konnte.

In Abbildung 41 sind die Daten der Messung der Halslängen grafisch dargestellt. Es wurden die durchschnittlichen Halslängen beider Gruppen und die dazugehörigen Standardabweichungen durch Fehlerbalken in dem Diagramm veranschaulicht.

Betrachtet man die Messwerte, so fällt auf, dass ein signifikanter Unterschied bezüglich der Halslängen der stubbys zwischen WT und KO zu verzeichnen ist. Der P-Wert liegt unter 0,00013. Die Wildtyp Mäuse weisen mit $0,28 \pm 0,05\mu\text{m}$ einen eindeutig längeren Hals auf als die Knockout Mäuse mit $0,25 \pm 0,04\mu\text{m}$.

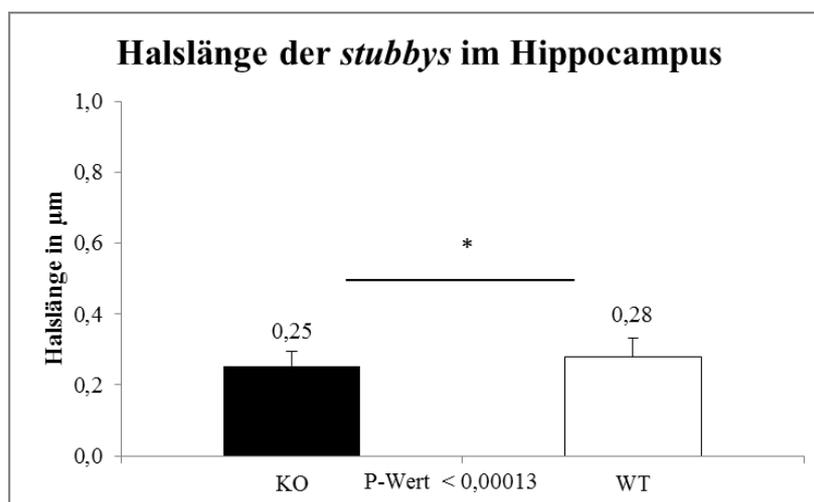


Abbildung 41: **Halslänge der stubbys im Hippocampus.** Es wurden die Durchschnittswerte aller gemessenen Längen der Hälse (μm) von stubbys beider Mäusegruppen abgebildet und die dazugehörige Standardabweichung in Form eines Fehlerbalkens eingetragen. Es liegt ein signifikanter Unterschied ($P\text{-Wert} < 0,00013$) bezüglich der Halslänge zwischen WT und KO vor. Die stubbys weisen bei den WT Mäusen eine Halslänge von $0,28 \pm 0,05\mu\text{m}$ auf. Bei den Knockout-Mäusen hingegen beträgt die Länge lediglich $0,25 \pm 0,04\mu\text{m}$. Damit weisen die stubbys der Wildtyp Mäuse mit $0,03\mu\text{m}$ deutlich längere Spinehälse als die KO Mäuse. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten Student's T-Test überprüft (*).

4.3.4 Halsbreite

Als nächstes wurde die Halsbreite der Spines untersucht (siehe Abbildung 35). Dabei ergaben sich, sowohl bei den stubbys als auch bei dem long thins, signifikante Unterschiede zwischen den Knockout und den Wildtyp Mäusen.

In Abbildung 42 sind die Messwerte der stubbys abgebildet. Anhand der durchschnittlichen Werte der Halsbreite wird deutlich, dass auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen den KO und WT für die Klasse der stubbys vorliegt. Der Halsdurchmesser bei den Neuroserpin-Knockout Mäusen ist mit $0,37 \pm 0,05\mu\text{m}$ ganze $0,02\mu\text{m}$ größer als der des Wildtyps mit $0,35 \pm 0,06\mu\text{m}$. Die Spinehäuse der stubbys sind im Hippocampus der KOs also wesentlich ausgeprägter als die der Wildtyp Mäuse.

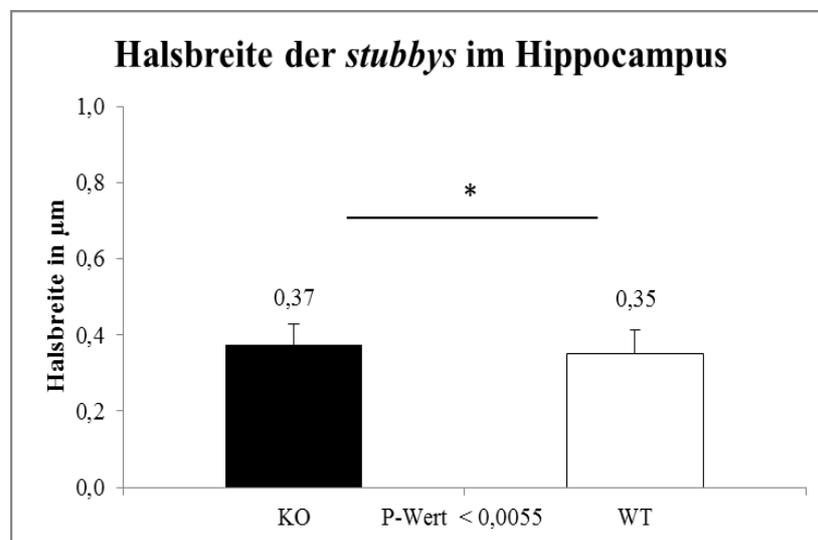


Abbildung 42: **Halsbreite der stubbys im Hippocampus.** Es wurden die Durchschnittswerte aller gemessenen Breiten der Hälse (μm) von stubbys beider Mäusegruppen abgebildet und die dazugehörige Standardabweichung in Form eines Fehlerbalkens eingetragen. Es liegt ein signifikanter Unterschied ($P\text{-Wert} < 0,0055$) bezüglich des Halsdurchmessers zwischen WT und KO vor. Die stubbys weisen bei den WT Mäusen eine Halsbreite von $0,35 \pm 0,06\mu\text{m}$ auf. Bei den Knockout Mäusen hingegen beträgt der Durchmesser des Spinehalses durchschnittlich $0,37 \pm 0,05\mu\text{m}$. Damit weisen die stubbys der Wildtyp Mäuse mit $0,02\mu\text{m}$ eine kleinere Halsbreite auf als die KO Mäuse. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten Student's T-Test (*) überprüft.

Die Ergebnisse der Messungen des Halsdurchmessers der long thin Spines sind in der Abbildung 43 dargestellt. Neben den stubbys konnte demnach auch in der Klasse der long thins ein signifikanter Unterschied im Durchmesser der Spinehalse zwischen Neuroserpin-Knockout und den Wildtyp Mäusen nachgewiesen werden. Die Spines der KOs besitzen mit $0,33 \pm 0,05\mu\text{m}$ einen eindeutig größeren und ausgeprägteren Hals als die Wildtyp Mäuse mit $0,30 \pm 0,06\mu\text{m}$. Auch der sehr kleine P-Wert, unter $1,92\text{E-}08$, verdeutlicht den klaren Unterschied zwischen beiden Maustypen bezüglich dieses morphologischen Parameters.

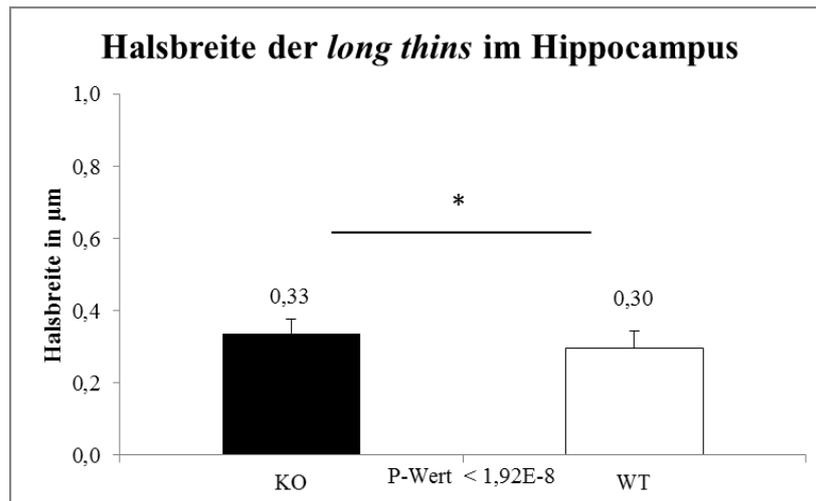


Abbildung 43: **Halsbreite der long thins im Hippocampus**. Es wurden die Durchschnittswerte aller gemessenen Halsdurchmesser (μm) von long thins beider Mäusegruppen abgebildet und die dazugehörige Standardabweichung in Form eines Fehlerbalkens eingetragen. Es liegt ein signifikanter Unterschied ($P\text{-Wert} < 1,92\text{E-}08$) bezüglich des Halsdurchmessers zwischen WT und KO vor. Die long thins weisen bei den WT Mäusen eine Halsbreite von $0,30 \pm 0,06\mu\text{m}$ auf. Bei den Knockout Mäusen hingegen beträgt der Durchmesser des Spinehalses durchschnittlich $0,33 \pm 0,05\mu\text{m}$. Damit weisen die long thins des Wildtyps mit $0,02\mu\text{m}$ einen dünneren Hals auf als die der KO Mäuse. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten Student's T-Test überprüft.

Auch in den anderen beiden Klassen, mushrooms und filopodia, ist zu erkennen, dass die Spines dieser Klassen bei den KOs die Tendenz haben breitere Hälse zu besitzen, als die der WT.

In der Tabelle 4 sind die durchschnittlichen Messwerte der Halsbreiten von mushrooms und die der filopodia aufgelistet. Es wurden auch jeweils die Standardabweichungen der Durchschnittswerte mit angegeben, sowie der Signifikanzwert des Unterschiedes zwischen WT und KO.

Es konnten keine signifikanten Differenzen zwischen Wildtyp und dem Knockout nachgewiesen werden, da der P-Wert $> 0,05$ liegt. Damit sind die Daten dieser beiden Klassen nicht aussagekräftig.

Tabelle 4: Nicht signifikante Daten bezüglich der Halsbreite der beiden Spineklassen mushroom und filopodia. In der Tabelle sind die durchschnittlichen Messwerte der Kopfbreite, in μm , der Spines der jeweiligen Klassen für den Wildtyp und den Neuroserpin-Knockout aufgeführt. Es wurde für jeden Wert die Standardabweichungen und der Signifikanzwert (P-Wert) des Unterschiedes zwischen WT und KO angegeben. Liegt der P-Wert unter 0,05, handelt es sich um einen signifikanten Unterschied in der Kopfbreite zwischen KO und WT. In beiden Klassen sind keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Halsbreite vorhanden und somit nicht aussagekräftig.

	KO	WT	P-Wert
mushroom	$0,16 \pm 0,09\mu\text{m}$	$0,14 \pm 0,08\mu\text{m}$	$> 0,08\mu\text{m}$
filopodia	$0,52 \pm 0,07\mu\text{m}$	$0,51 \pm 0,43\mu\text{m}$	$> 0,91\mu\text{m}$

Im Hippocampus konnten sowohl für die Spinelänge, Kopfbreite, Halslänge sowie bei der Halslänge signifikante Differenzen in der Morphologie der Spines zwischen Neuroserpin-Knockout und Wildtyp Mäusen festgestellt werden. Am eindeutigsten waren die Resultate bezüglich der Kopfbreite, da dort in allen vier Klassen die KO einen breiten und ausgeprägteren Kopf aufwiesen, als die WT. Bei den anderen Parametern waren nur einzelne Klassen durch klare Unterschiede hervorgetreten.

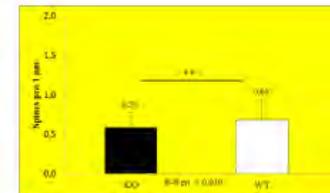
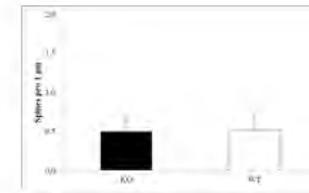
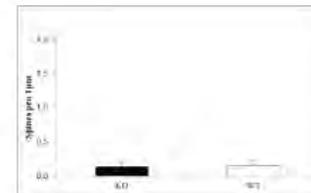
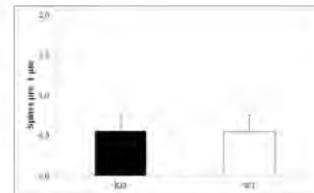
4.4 Analyse der Spinemorphologie in der Amygdala

Es wurden dieselben Parameter wie im Hippocampus auch bei den Spines in der Region der Amygdala durchgeführt.

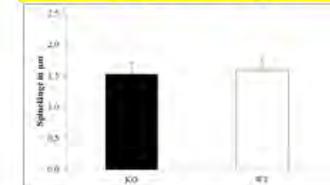
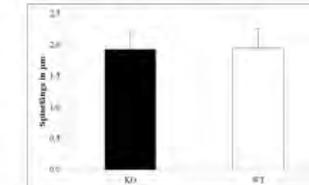
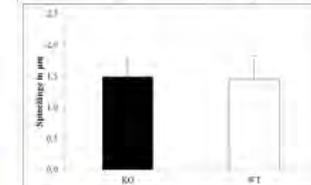
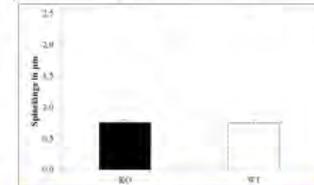
In der Abbildung 44 sind alle Messparameter und Klassen für die morphologische Analyse der Spines im Amygdala dargestellt. Es wurden hier auf der Y-Achse die fünf Messparameter Dichte, Länge, Kopfbreite, Halslänge und Halsbreite aufgelistet. Daneben befinden sich die Symbole, die die jeweilige Messregion am Spine veranschaulichen. Die X-Achse der Abbildung ist in die vier Spineklassen stubby, mushroom, long thin und filopodia eingeteilt.

In den Diagrammen der einzelnen Messwerte wurden jeweils die Durchschnittswerte der Spines der Neuroserpin-Knockout Mäuse mit denen der Wildtyp Mäuse verglichen. Liegen signifikante Unterschiede vor, dann sind die entsprechenden Diagramme gelb hervorgehoben. Auch hier wurde die Signifikanz wieder über den Student's T-Test bestimmt (*) und falls erforderlich ein Welch-Test durchgeführt, diese Daten sind dann mit '**' gekennzeichnet.

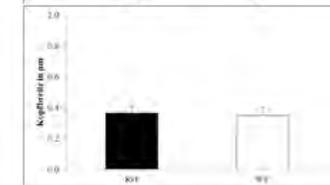
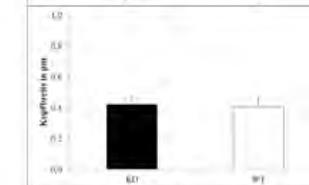
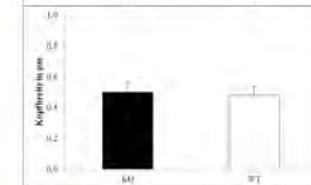
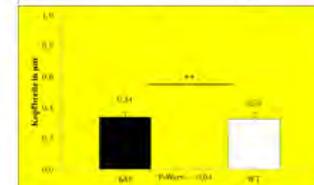
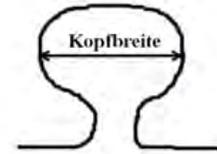
Dichte



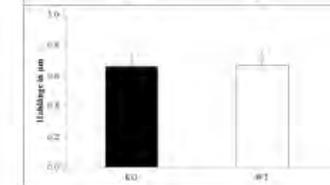
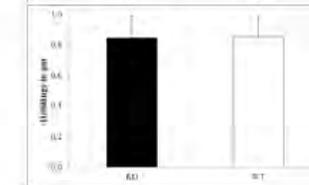
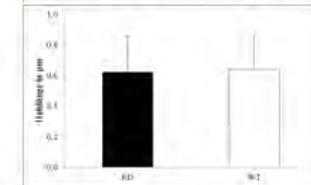
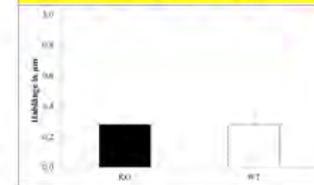
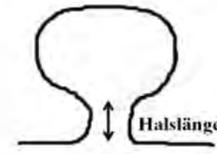
Länge



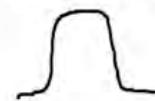
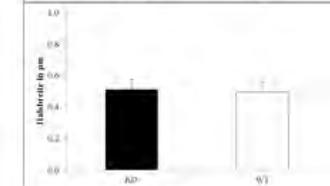
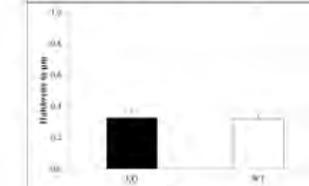
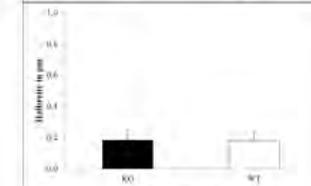
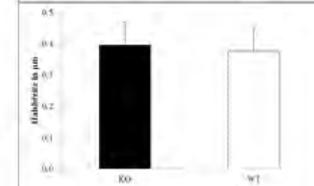
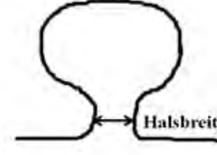
Kopfbreite



Halslänge



Halsbreite



stubby



mushroom



long thin



filopodia

Abbildung 44: Darstellung aller Messparameter pro Spineklasse im Amygdala. Auf der Y-Achse sind die fünf Messparameter Dichte, Länge, Kopfbreite, Halslänge und Halsbreite aufgelistet. Daneben befinden sich die Symbole, die die jeweilige Messregion am Spine veranschaulichen. Die X-Achse der Abbildung ist in die vier Spineklassen stubby, mushroom, long thin und die filopodia eingeteilt. In den Diagrammen der einzelnen Messwerte wurden jeweils der Wildtyp mit den Neuroserpin-Knockout Mäusen verglichen. Bei signifikanten Unterschieden in der Morphologie zwischen beiden Gruppen (getestet über den Student's T-Test) wurden die Graphen gelb hervorgehoben und die Messwerte an den Balken notiert. Die Messwerte sind Durchschnittswerte und wurden mit der jeweiligen Standardabweichung, als Fehlerbalken, dargestellt. Es sind im Amygdala nur zwei signifikante Unterschiede in der Morphologie der Spines zwischen KO und WT zu verzeichnen. Zum Einen in der Dichte der filopodias und zum Anderen in der Kopfbreite bei den stubby Spines. Neben dem T-Test wurde auch die Varianz der Messwerte überprüft. Bei ungleicher Varianz, wie bei den beiden signifikanten Diagrammen, ist der Welch-Test durchgeführt worden, um die Signifikanz zu Prüfen. Die Daten sind dann mit '**' markiert.

4.4.1 Spinedichte

Im Amygdala sind in zwei Fällen signifikante Differenzen zwischen den Knockout und Wildtyp Mäusen zu verzeichnen. Zum Einen betrifft es den Parameter der Dichte. Dort konnte in der Klasse der filopodia ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Abbildung 45).

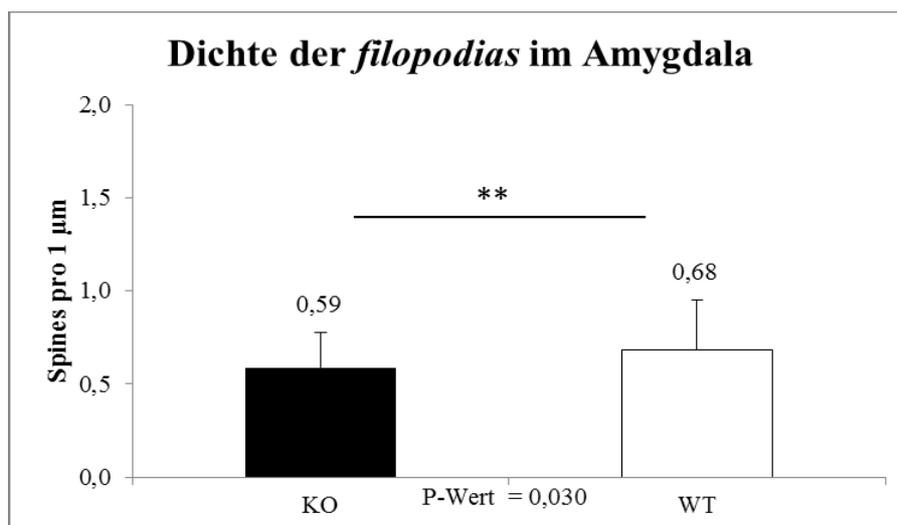


Abbildung 45: **Dichte der filopodia im Amygdala.** Es wurden die Durchschnittswerte aller ermittelten Dichten (Spines pro µm) der filopodia beider Mäusegruppen abgebildet und die dazugehörige Standardabweichung in Form eines Fehlerbalkens eingetragen. Es liegt ein signifikanter Unterschied (P-Wert = 0,030) bezüglich Dichte an Spines der Klasse der filopodia zwischen WT und KO vor. Die filopodias weisen bei den WT Mäusen eine Dichte von $0,68 \pm 0,26$ Spines/µm auf. Damit ist der Dichte an filopodia Spines bei den KO Mäusen mit nur $0,59 \pm 0,18$ Spines/µm um einiges geringer als die der WT Mäuse. Die Signifikanz wurde mit dem ungepaarten Student's T-Test ermittelt (*) und aufgrund ungleicher Varianz mit dem Welch-Test überprüft (**).

In dem Diagramm der Abbildung 45 sind die durchschnittlichen Dichten und ihre Standardabweichung in Form von Fehlerbalken abgebildet. Anhand der Werte kann man erkennen, dass die Wildtyp Mäusen im Amygdala mit $0,68 \pm 0,26$ Spines/µm eine größere Dichte an Spines besitzen als die Knockout Mäuse mit $0,59 \pm 0,18$ Spines/µm. Die Differenz beider Werte ist signifikant, da der P-Wert mit 0,03 unter der 0,05-Grenze liegt. Neben der Signifikanz, die über den T-Test ermittelt wurde, ist auch die Varianz analysiert worden. Bei den Messwerten der Dichte lag eine ungleiche Varianz vor, weshalb mit Hilfe des Welch-Tests überprüft (**) wurde, ob der P-Wert aufgrund dessen verändert ist. Es ist aber keine Abweichung aufgetreten.

4.4.2 Kopfbreite

Neben der Dichte an filopodia ist auch bei der Kopfbreite der Spines im Amygdala in der Klasse der stubbys ein signifikanter Unterschied zwischen WT und KO festgestellt worden.

In Abbildung 46 sind die Ergebnisse der Messung in einem Balkendiagramm dargestellt.

Es liegt ein kleiner aber signifikanter Unterschied (P-Wert < 0,04) bezüglich des Durchmessers der Spineköpfe der stubbys zwischen beiden Maustypen vor. Die Köpfe der stubbys in Neuroserpin-Knockout Mäusen weisen mit $0,34 \pm 0,03\mu\text{m}$ eine etwas höhere Kopfbreite auf als die Wildtyp Mäuse mit $0,33 \pm 0,04\mu\text{m}$. Auch bei diesen Werten wurde ein Welch-Test zur Überprüfung der Signifikanz aufgrund einer ungleichen Varianz durchgeführt (**).

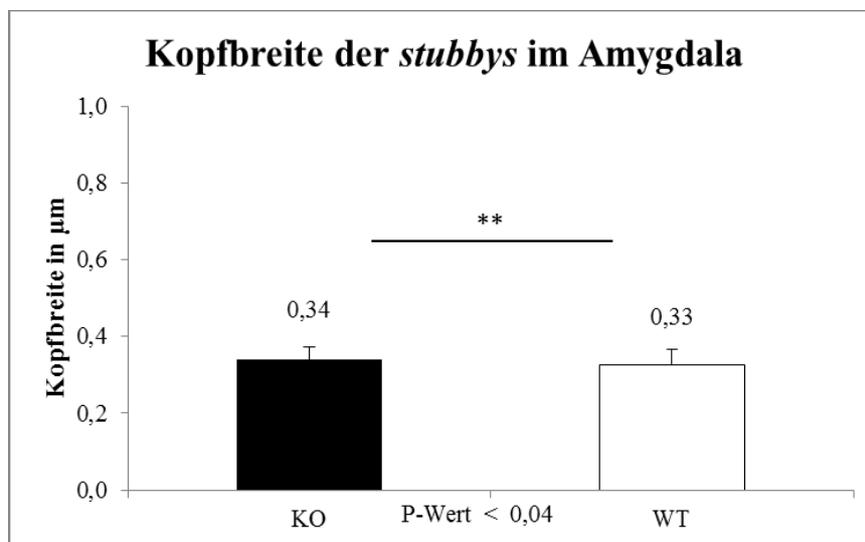


Abbildung 46: **Kopfbreite der stubbys in der Amygdala.** Es wurden die Durchschnittswerte aller gemessenen Durchmesser der Köpfe (μm) von stubbys beider Mäusegruppen abgebildet und die dazugehörige Standardabweichung in Form eines Fehlerbalkens eingetragen. Es liegt ein kleiner aber signifikanter Unterschied (P-Wert < 0,04) bezüglich des Kopfdurchmessers zwischen WT und KO vor. Die stubbys der Wildtyp Mäuse besitzen eine Kopfbreite von $0,33 \pm 0,04\mu\text{m}$ auf. Bei den Knockout Mäusen hingegen beträgt der Durchmesser $0,34 \pm 0,03\mu\text{m}$. Damit ist die Kopfbreite der stubbys von KO mit $0,01\mu\text{m}$ um einen kleinen Anteil größer als die der WT Mäuse. Die Signifikanz wurde mit dem ungepaarten Student's T-Test ermittelt (*) und wegen ungleicher Varianz mit dem Welch-Test überprüft (**).

In den anderen drei Spineklassen mushroom, long thin und filopodia konnte kein signifikanter Unterschied zwischen WT und KO festgestellt werden. Es besteht die Tendenz im Amygdala, dass die Spines der Neuroserpin-Knockout Mäuse einen größeren Kopfdurchmesser besitzen, als die des Wildtyps. Diese Werte sind jedoch aufgrund der Nichtsignifikanz nicht aussagekräftig. Die Daten der drei Klassen sind in der nachfolgenden Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Nicht signifikante Daten bezüglich der Kopfbreite der Klassen mushroom, long thin und filopodia. In dieser Tabelle sind die durchschnittlichen Messwerte der Kopfbreite in μm der Spine der Klassen mushroom, long thin und filopodia für den Wildtyp und den Neuroserpin-Knockout aufgeführt. Es wurden für jeden Messwert die Standardabweichungen und der Signifikanzwert (P-Wert) des Unterschiedes zwischen WT und KO angegeben. In allen drei Klassen sind keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

	KO	WT	P-Wert
mushroom	0,50 \pm 0,06 μm	0,48 \pm 0,06 μm	> 0,063 μm
long thin	0,42 \pm 0,05 μm	0,41 \pm 0,06 μm	> 0,159 μm
filopodia	0,36 \pm 0,05 μm	0,35 \pm 0,06 μm	> 0,094 μm

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es, eine morphologische Analyse von dendritischen Spines bei Neuroserpin-Knockout Mäusen durchzuführen und mit Wildtyp Mäusen zu vergleichen, um festzustellen, ob Unterschiede in der Anzahl und Gestalt der Spines zwischen beiden Mäusetypen nachzuweisen sind.

Zunächst wurden dafür die Spines der Hirnregionen Hippocampus und Amygdala mit DiI-Fluoreszenzkristallen eingefärbt und Bilder mit dem konfokalen Mikroskop angefertigt. Die Analyse der Morphologie der Spines beider Hirnbereiche ist mit Hilfe einer Software durchgeführt worden. Auf diese Weise soll überprüft werden, welchen Einfluss Neuroserpin auf die Morphologie von dendritischen Spines, dem Hauptsitz der synaptischen Übertragung im Gehirn, in jenen Hirnregionen und deren Funktion ausübt.

5.1 Vergleich der Spineanzahl im Hippocampus und Amygdala

Im Hinblick auf die Anzahl wurde im Hippocampus kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp und Knockout Mäusen nachgewiesen (Abbildung 33).

In der Region der Amygdala hingegen konnte bei den Wildtyp Mäusen eine Spineanzahl von $7675 \pm 26,36$ ermittelt werden, die damit ca. 700 Spines mehr als die KOs besitzen.

Im Gegensatz zum Hippocampus ist diese Differenz zwischen WT und KO mit einem P-Wert $< 0,0228$ signifikant.

Im Amygdala scheint das Vorhandensein von Neuroserpin, einem natürlichen Level im WT, die Spinebildung anzuregen. Es wurde bereits von Borges et al (2010) (siehe Abbildung 18) nachgewiesen, dass bei einer Ns-Überexpression mehr Spines (höhere Dichte) auftreten.

Man könnte also daraus schließen, dass je mehr Ns vorliegt (höheres Level), desto mehr Spines gibt es. Auf der anderen Seite, je weniger Neuroserpin exprimiert wird oder wenn ein Gen-Knockout bezüglich Ns vorliegt, desto weniger Spines können nachgewiesen werden.

Diese Feststellungen konnten innerhalb dieser Arbeit anhand signifikanter Daten belegt werden (siehe Abbildung 34 und 45).

Es kommt also zu einem eindeutigen Ergebnis bei der Frage, wie sich der Neuroserpin-Knockout auf die Anzahl der Spines auswirkt. Im Amygdala konnten deutlich weniger Spines bei NsKO Mäusen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse im Hippocampus zeigen hingegen keinen Unterschied zwischen beiden Mäusegruppen. Neuroserpin scheint demnach in der Region des Hippocampus keinen Einfluss auf die Anzahl von dendritischen Spines zu besitzen.

Eine weitere Auffälligkeit ist die Verteilung der vier Spineklassen in der gemessenen Anzahl von Spines (Tabelle 2).

Im Hippocampus ähneln sich die Prozentzahlen für jede Klasse. Zum Beispiel besitzen beide Mäusegruppen zu ungefähr 52% die stummelförmigen, stubby, Spines und nur zu etwa 6% die reifen, mushroom, Spines. Die als Spinevorläufer angesehenen filopodia sind mit ca. 23% vertreten. Betrachtet man allerdings die Prozentwerte im Amygdala, so fällt auf, dass dort die Spannweite zwischen WT und KO zum Teil deutlich weiter ist und dass die Klassen anders verteilt vorliegen.

Im Amygdala gibt es mehr mushrooms mit 8%, jedoch deutlich weniger stubby Spines (Tabelle 3), die im Hippocampus die Hälfte aller vertretenen Spines darstellen, so sind es hier nur gerundet 30%. Auffällig ist im Amygdala auch, dass sowohl beim KO, als auch beim WT die filopodia (~33-35%) am meisten und auch deutlich mehr als im Hippocampus vorkommen.

Da sich die Reihenfolge der Häufigkeit der vertretenen Klassen aber innerhalb des Hippocampus und der Amygdala im Knockout- und Wildtyp nicht unterscheiden, scheint dieser Unterschied zwischen beiden Mäusegruppen nicht durch Neuroserpin bedingt zu sein, sondern charakteristisch für die jeweilige Region zu sein.

Die stubbys symbolisieren Spines, die vermutlich keinen präsynaptischen Partner besitzen, da sie ihn eventuell gerade durch mangelnde neuronale Aktivität verloren haben und sich zurückziehen oder versuchen einen neuen Kontakt aufzubauen [2].

Der Hippocampus ist die Region, die für die Speicherung neuer Erinnerungen verantwortlich und im Lernprozess involviert ist [23][25]. Während des Lernens, dem LTP als Mechanismus unterliegt [5], kommt es innerhalb kürzester Zeit, aufgrund eines Anstieges in der neuronalen Aktivität, zur Ausbildung neuer Spines und synaptischen Kontakten [3][30][43][33]. Lässt die Aktivität nach oder werden bestehende Kontakte nicht mehr genutzt, kommt es zum Abbau dieser [54][55][44]. Demnach ist es ein logischer Effekt, dass dabei viele stubbys vorliegen müssen, um diesen Anforderungen gerecht zu werden.

Die filopodia sind am zweithäufigsten vertreten, weil sie als Vorläufer der Spines immer auf der Suche nach dem optimalen präsynaptischen Partner sind, um neue Erinnerungen zu verknüpfen und neue, gute Pfade herzustellen [33]. Dass die filopodia und die long thins zu etwa gleichen Teilen in beiden Mäusegruppen vorkommen, liegt daran, dass die long thins sehr dynamische und instabile Spines sind, die auf synaptische Stimulationen, wie durch neue Reize, schnell reagieren.

Aus diesem Grund sind sie ebenfalls für den Lern- und Erinnerungsprozess von großer Bedeutung und besitzen aus dem Grund auch den Namen „plasticity spines“. Deshalb sind sie im Hippocampus auch relativ stark vertreten.

Die wenigen mushrooms, auch „memory spines“ genannt, stehen dabei für stabile synaptische Verknüpfungen, Erinnerungen, die aufgrund hoher Aktivität bestehen bleiben und gespeichert werden [27]. Warum sie im Verhältnis zu den anderen Spineklassen in nur so geringer Prozentzahl vertreten sind, könnte darin begründet liegen, dass im Hippocampus immer wieder zahlreiche neue Erinnerungen gebildet werden und dadurch viele der „plasticity spines“ vorliegen. Alte Erinnerungen, die nicht mehr benötigt werden, was durch eine sinkende neuronale Aktivität symbolisiert wird, werden aufgegeben. Es gibt also nur einen kleinen Kern der stabilen „memory spines“, den mushrooms, die die beständigen und wichtigen Erinnerungen abspeichern.

Dadurch, dass der Hippocampus viel erforscht wird, hauptsächlich im Zusammenhang mit LTP, ist viel über die Region und die Morphologie der Synapsen und Spines bekannt und nachvollziehbar.

Die Amygdala hingegen ist schon aufgrund ihres Aufbaus und den zahlreichen daraus resultierenden Funktionen, sehr komplex.

Man weiß aber, dass die Amygdala, besonders der basolaterale Komplex, in der Formation von Angsterinnerungen eine Kernaufgabe spielt [17] und mit der CA1-Region des Hippocampus direkt verknüpft ist [17] [5] [20]. Damit könnte man die morphologischen Eigenschaften und die Bedeutung der einzelnen Spineklassen vermutlich auch auf die Existenz jener im Amygdala übertragen.

Dennoch kann es sein, dass Neuroserpin einen gewissen Einfluss auf die Spineklassen hat, denn es sind mehr stubbys und weniger filopodia in den KOs als in den Wildtyp vorzufinden (Tabelle 2).

Der genaue Einfluss wird aus den vorliegenden Daten jedoch nicht aufgedeckt.

Der Neuroserpin-Knockout scheint also im Amygdala Auswirkungen auf die Spineanzahl zu haben, da in dieser Hirnregion deutlich weniger Spines in den Neuronen der NsKO Mäuse vorzufinden waren als im Wildtyp.

Im Hippocampus konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Anzahl ermittelt werden.

Demnach kann es sein, dass Neuroserpin im Hippocampus und Amygdala einen scheinbar unterschiedlichen Einfluss auf die Anzahl der Spines besitzt.

5.2 Vergleich der morphologischen Eigenschaften dendritischer Spines

Neben der Analyse der Anzahl der Spines in Neuroserpin-Knockout Mäusen und dem Vergleich mit Wildtyp Mäusen, wurden die Spines auch im Hinblick auf ihre Morphologie untersucht. Es wurden Untersuchungen am Dendriten mit der Analysesoftware durchgeführt, die sich mit der Dichte, der kompletten Länge der Spines und denen für sie charakteristischen Eigenschaften, Kopf und Hals, für jede der vier Spineklassen beschäftigten. Neben der Kopfbreite sind auch die Halslänge sowie -breite untersucht worden.

Sowohl für den Hippocampus (Abbildung 35), als auch für die Region der Amygdala (Abbildung 44), wurde eine Übersicht über alle durchgeführten Messungen pro Klasse angefertigt, um einen Überblick zu bekommen, bei welchen Messungen signifikante Unterschiede zwischen dem Neuroserpin-Knockout und dem Wildtyp aufgetreten sind

Dabei konnten für den Hippocampus 8 und im Amygdala 2 signifikante Unterschiede zwischen beiden Mausgruppen ermittelt werden, die damit reflektieren, dass Neuroserpin durchaus Veränderungen in der Morphologie von dendritischen Spines verursacht.

5.2.1 Hippocampus: Kopfbreite

Ganz besonders stark ist der Einfluss auf die Kopfbreite, dem Kernbaustein der Spines, denn in allen vier Klassen ist bei den Spines von Neuroserpin-Knockout Mäusen ein größerer Kopfdurchmesser nachgewiesen worden als bei den Wurfgeschwistern im Wildtyp (Abbildung 35). Neuroserpin hat demnach eine Wirkung auf die Größe des Spinekopfes.

Es wurde herausgefunden, dass eine Überexpression von Neuroserpin, sehr hohes Neuroserpinlevel in den Neuronen, sogar eine Reduktion des Spinekopfes bewirkt [7]. Das haben Borges et al (2010) festgestellt, als sie primäre hippocampale Neuronen mit Neuroserpin transfiziert haben und untersuchen wollten, ob eine höhere Neuroserpinexpression einen Effekt auf die Nervenzellen hat.

Diese Feststellung konnte auch innerhalb dieser Arbeit anhand signifikanter Daten bestätigt werden. Ohne Neuroserpin, KO, sind die Spineköpfe signifikant größer. Mit Ns, beim WT, sind die Kopfdurchmesser deutlich kleiner (siehe Abbildungen 36 bis 39).

Anhand dieser Daten liegt die Vermutung nahe, dass je höher die Konzentration von Neuroserpin vorliegt, desto geringer scheint die Kopfbreite der Spines zu sein.

5.2.2 Hippocampus: Halsbreite

In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Neuroserpin-Knockout Mäusen und dem Wildtyp in der Ermittlung des Halsdurchmessers in zwei von vier Spineklassen nachgewiesen werden.

Bei den KOs sind die Häse von den stubbys und den long thins signifikant breiter als beim Wildtyp (Abbildung 35).

Es sind zwar nur zwei von vier Klassen, die einen signifikanten Unterschied aufweisen (Abbildung 42 und Abbildung 43), aber auch die beiden anderen Klassen scheinen zu zeigen, dass die KOs breitere Häse besitzen als der WT. Diese Werte sind jedoch nicht signifikant und demnach nicht aussagekräftig (siehe Tabelle 4).

Es ist auffällig, dass in der Klasse der filopodia eine sehr hohe Standardabweichung vorliegt.

Diese könnte durch Messfehler bedingt sein und aus diesem Grund sollte man die Klasse nicht in die Bewertung mit einbeziehen.

Betrachtet man die restlichen drei Klassen, dann liegt in zwei von drei Fällen ein signifikantes Ergebnis, dass die Ns(-/-) einen breiteren Hals aufweisen, vor. Es zeichnet sich also durchaus eine Tendenz ab.

5.2.3 Hippocampus: Halslänge

Neben den beiden signifikanten Unterschieden in der Halsbreite in den Klassen der stubbys und der long thins, konnte auch ein Effekt des Neuroserpin-Knockouts auf die Halslänge nachgewiesen werden.

Es ist zu erkennen, dass die KOs einen signifikant kürzeren Hals aufweisen als die Spines des WTs.

Dieses Phänomen liegt allerdings nur in einer Klasse, bei den stubbys, vor.

5.2.4 Veränderungen der Spinemorphologie im Hippocampus

Die folgende Abbildung 47 zeigt zusammenfassend sowohl die Art der morphologischen Veränderungen zwischen WT und KO im Hippocampus, als auch den Spinebaustein, den diese Veränderung betrifft, für jede der vier Spineklassen.

Es ist zu erkennen, dass die stubbys der KOs einen kürzeren und dickeren Hals, sowie einen breiteren Kopf aufweisen und allgemein kleiner sind als die stubbys des WTs.

In der Klasse der mushrooms konnte eine Vergrößerung des Kopfes bei den Spines der KO beobachtet werden und die long thins der KO zeigen sowohl einen größeren Kopf als auch einen ausgeprägteren Hals als der WT. Die filopodia der Wildtyp Mäuse zeigen einen kleineren Kopf als die der Neuroserpin-Knockout Mäuse.

Hippocampus

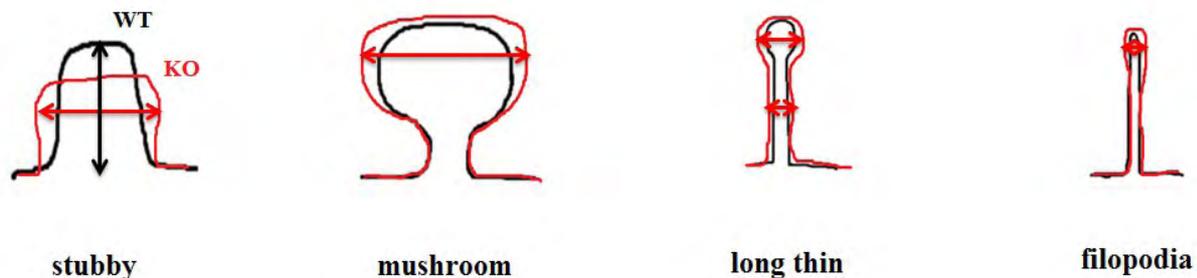


Abbildung 47: **Veränderungen in der Spinemorphologie im Hippocampus.** Diese Graphik zeigt die Veränderungen in der Gestalt der dendritischen Spines in Neuroserpin-Knockout Mäusen (KO) und im Wildtyp (WT). Es sind alle vier Spineklassen aufgezeigt und die Veränderungen, die in den KO Mäusen aufgrund des Neuroserpin-Knockouts auftreten, wurden mit roten Pfeilen dargestellt. Die stubbys der KO haben einen kürzeren und dickeren Hals, sowie einen breiteren Kopf und sind allgemein kleiner als die stubbys des WT. Bei den mushrooms konnte eine Vergrößerung des Spinekopfes beim KO beobachtet werden und die long thins der KO zeigen sowohl einen größeren Kopf als auch einen ausgeprägteren Hals als der WT. Die filopodia der Wildtyp Mäuse zeigen einen kleineren Kopf als die der Neuroserpin-Knockout Mäuse.

Demnach kommt es bei den Spines der Neuroserpin-Knockout Mäuse zu einer Verbreiterung und Verkürzung des Spinehalses und zu einer Vergrößerung des Spinekopfes.

Es liegen im Hippocampus also signifikante Unterschiede in der Morphologie der Spines zwischen beiden Mäusegruppen vor (Abbildung 35).

5.2.5 Amygdala: Kopfbreite

Im Amygdala konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied bei der Ermittlung der Kopfbreite von Spines in Neuroserpin-Knockout und den Wildtyp Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 46).

Die Spines, genauer die Klasse der stubbys, der KOs haben einen signifikant größeren Kopfdurchmesser mit $0,34 \pm 0,03 \mu\text{m}$ als die des Wildtyps mit $0,33 \pm 0,04 \mu\text{m}$.

Jedoch konnte bezüglich der Kopfbreite nur in einer von vier Klassen (Abbildung 44) ein recht kleiner, $0,01 \mu\text{m}$, signifikanter Unterschied im Kopfdurchmesser ermittelt werden.

Man kann aufgrund dessen dieses eine Resultat nicht auf alle Spineklassen der KOs übertragen und damit einen allgemeinen Einfluss des Neuroserpins auf den Spinekopf im Amygdala formulieren. Dazu sind die Ergebnisse nicht eindeutig genug.

Mit diesen Daten konnte man die Veränderung des Spinekopfes, wie sie auch im Hippocampus vorzufinden sind, auch im Amygdala, in der Klasse der stubbys, signifikant nachweisen.

Die anderen Klassen zeigen ebenfalls die Tendenz, dass die Spines der KOs einen größeren Kopfdurchmesser besitzen im Vergleich zum WT (Tabelle 5). Die Differenzen zwischen WT und KO sind dort jedoch nicht signifikant.

Neuroserpin scheint also in der Tat einen Effekt auf die Morphologie der Spines zu besitzen, da in beiden Hirnregionen, in denen Neuroserpin in hohem Level exprimiert wird [6], die gleichen morphologischen Veränderungen festgestellt werden konnten.

5.2.6 *Amygdala: Spinedichte*

Ein weiterer signifikanter Unterschied im Amygdala ist in der Dichte der Spineklasse der filopodia zu verzeichnen (Abbildung 45). Die Dichte an filopodia ist dabei im Wildtyp signifikant höher als in den Neuroserpin-Knockout Mäusen. Sie beträgt $0,68 \pm 0,26$ Spines/ μm und liegt damit deutlich höher als die Dichte in den KOs mit $0,59 \pm 0,18$ Spines/ μm .

Damit scheinen in den Neuroserpin-Knockout Mäusen wesentlich weniger Spines der Klasse der filopodia aufzutreten als bei dem Wildtyp.

Filopodia gelten als die Vorläufer von dendritischen Spines, da sie hauptsächlich im frühen postnatalen Stadium auftreten und im adulten Gehirn schrumpfen.

Warum liegt eine so viel höhere Dichte im Amygdala des WT vor als im KO?

Filopodia sind aufgrund ihres langen dünnen Halses sehr dynamisch und beweglich und können somit während der Synaptogenese leichter nach präsynaptischen Partnern suchen [33].

Einige filopodia können sich nicht zu Spines weiterentwickeln, da sie keinen präsynaptischen Partner in Aussicht haben. Der Prozess der Bildung von Kontakten zwischen der axonalen Seite und den filopodia ist ein höchst selektiver Vorgang. Ist der Partner nicht passend, dann bildet sich keine Synapse aus [3]. Vielleicht liegen im Amygdala andere Bedingungen für die Ausbildung von Synapsen vor, so dass dort aus diesem Grund mehr filopodia vorzufinden sind, die sich nicht zu Spines weiterentwickelt haben [29].

Man hat herausgefunden, dass bei einer Blockade der synaptischen Transmission im Hippocampus ein Anstieg in der Anzahl nicht-synaptischer filopodia auftritt [45].

Demnach könnte es vielleicht ein Grund sein, weshalb im Amygdala mehr Spines beim WT vorliegen, dass bei geringer synaptischer Transmission im Amygdala, eventuell bedingt durch wenig Stimuli, dort auch mehr filopodia aufzufinden sind.

5.2.7 *Veränderung der Spinemorphologie im Amygdala*

Die Abbildung 48 zeigt die Veränderungen in der Gestalt von stubbys der KOs. Der Kopfdurchmesser liegt im Vergleich zum WT eindeutig vergrößert vor.

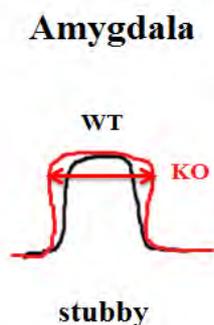


Abbildung 48: **Morphologische Veränderungen der Spines im Amygdala.** Die Spines der *NsKO* sind in rot dargestellt, die der *WT* in schwarz. Es konnte festgestellt werden, dass die stubbys der *KO* Mäuse eine größere Kopfbreite aufweisen, als die stubbys der *WT* Mäuse.

Es konnte im Amygdala also signifikant festgestellt werden, dass beim *KO* weniger Spines als im *WT* vorzufinden sind, diese aber größere Köpfe besitzen.

5.3 Etablierung der Methode im Hippocampus und Amygdala

Ziel der Arbeit war die Analyse der dendritischen Spines in Neuroserpin-Knockout Mäusen in den Hirnregionen des Hippocampus und der Amygdala. Es musste im Laufe dieser Arbeit eine Vorgehensweise etabliert werden, die es ermöglicht, die Spines in diesen Bereichen zu analysieren. Denn so, wie die Analyse im Hippocampus und speziell im Amygdala geplant war, gab es keinen Hinweis auf bereits durchgeführte Versuche mit dem DiI-Fluoreszenzfarbstoff in eben jenen Regionen.

Die Arbeiten von Shen et al (2008), die sich mit der Quantifizierung der Spinedichte und der Kopfweite im nucleus accumbens beschäftigt haben, sowie die von Kim et al (2007), die von der DiI-Färbung von fixierten kortikalen Schnitten handelt, dienten als Orientierung bei der Analyse innerhalb dieser Bachelorarbeit.

Anders als in beiden Arbeitsgruppen wurden hier nicht mit Ratten, sondern mit Mäusen die Versuche durchgeführt. Beide unterscheiden sich von der Morphologie allerdings nicht gravierend voneinander, sodass deshalb keine schlechteren Ergebnisse zu erwarten gewesen wären.

Das Gewebe wurde mit 4% PFA in PBS perfundiert und nicht mit 1.5%, um eine stärkere Fixierung zu erreichen. Es handelte sich ebenfalls um koronale und 200µm dicke Schnitte.

Als Lösung beim Schneiden wurde jedoch 1% PBS gewählt und während des Prozesses auch nicht gekühlt, da diese Option nicht zur Verfügung stand. Anschließend sind die Schnitte bis zur Färbung jedoch nicht in PBS gelassen, sondern wieder ins Fixativ gegeben worden.

Für die Färbung wurde eine andere Vorgehensweise gewählt, da weder Genkanone noch eine Glasmikropipette vorlagen. Es ist eine Kombination aus Zahnstocher und Insektennadel verwendet worden (Abbildung 21).

Die Menge an DiI-Kristallen für die Färbung musste ebenfalls getestet werden, da dort keine Angaben zu vorlagen. War diese zu groß, hatte das eine zu starke Diffusion zur Folge. Es durfte gerade nur ein, mit dem Auge kaum wahrzunehmender, Partikel auf der Nadel vorliegen.

Die Gewebepunktionen mussten so durchgeführt werden, dass diese nicht zu dicht beieinander liegen, da dann ebenfalls eine zu starke Färbung vorlag und keine Analyse möglich war. Zwei Punktionen im Hippocampus und höchstens drei im Amygdala erwiesen sich als eine gute Menge (Abbildung 22).

Des Weiteren musste zunächst die optimale Länge der Inkubationszeit ermittelt werden.

Die vier Stunden von Kim et al waren eindeutig zu kurz, da dort noch nicht viel Diffusion vorzufinden war. Die 24-48 Stunden jedoch bedeuteten einen zu großen Zeitraum, was zu einer sehr starken Diffusion führte und die Dendriten kaum vom Hintergrund zu differenzieren waren. Die Inkubationszeit wurde mit maximal 16 Stunden eingehalten.

Bei den Mikroskopeinstellungen wurde sich hauptsächlich an denen der Publikationen gehalten.

Es wurde ein Bildformat von 512 x 512 verwendet, da die aufgenommenen Bilder mit diesem Format besser in der Imaris-Software bearbeitet werden konnten. Die Färbung war somit stärker sichtbar und die Stackaufnahmezeit somit kürzer. Es wurde außerdem eine kleinere Intervallgröße entlang der Z-Achse (step size) für die Bildaufnahme verwendet, 0,3-0,4µm, um die Spines besser aufnehmen zu können. Ist die step size zu groß, dann kann es sein, dass Besonderheiten am Dendriten bezüglich der Spinemorphologie oder sogar ganze Spines nicht aufgezeichnet werden können.

Des Weiteren musste der Zeitraum ausgetestet werden, in welchem die Bilder am Mikroskop aufgenommen werden konnten und noch keine zu starke Hintergrundfärbung durch die Diffusion

des DiI entstanden ist. Nach einer Woche war diese schon zu hoch, wohingegen am ersten Tag die Diffusion meist noch nicht genug fortgeschritten war. Die besten Bilder entstanden am zweiten und dritten Tag.

Bezüglich der Analyse der dendritischen Spines sind andere Messbedingungen gewählt worden. Die Analyse sollte ca. 100µm distal zum Soma der Neuronen beginnen. Weniger als 100µm erwiesen sich im Hippocampus teilweise als sehr schwierig, da die Zellreihen der Pyramidenzellen einen zu großen Durchmesser aufwiesen, dass man mit 75µm oder 50µm noch immer innerhalb der Zellsoma anderer Pyramidenzellen lag und noch keine Dendriten zur Auswertung erreicht waren.

Die Länge des Bereiches, in dem der Dendrit morphologisch untersucht wurde, betrug ungefähr 50µm. Diese Länge erwies sich als optimal, da sie nicht zu kurz war, um sie ohne optischen Zoom auf dem Zieldendrit auszuwählen und auch nicht als zu lang, als dass sie nicht unter vierfachem optischen Zoom auf einer Aufnahme zu realisieren war.

Die Tatsache, dass die Analyse im Hippocampus mit Hilfe dieser Vorgehensweise doch recht erfolgreich und gut durchzuführen war, gibt Rückschlüsse darauf, dass die Methode in der Durchführung keine großen Fehler zu besitzen scheint und gut entwickelt wurde.

Warum im Amygdala nicht derart viele signifikante Resultate, wie im Hippocampus, erbracht werden konnten, kann mehrere Ursachen haben.

5.4 Ursachen für eine geringere Ausbeute an signifikanten Daten im Amygdala

5.4.1 Kein signifikanter Unterschied zwischen WT und KO

Ein Grund wäre, dass in der Tat keine signifikanten Unterschiede in der Spinemorphologie zwischen WT und KO vorliegen. Wobei die Tendenzen, auch wenn es nur Tendenzen sind, auf etwas anderes hindeuten, könnten diese auch vom Zufall bedingt sein.

Es konnten trotz intensiver Recherche der Literatur und Kommunikation zu anderen Laboren nicht herausgefunden werden, ob bisher schon einmal Analysen der Spinemorphologie beim Neuroserpin-Knockout im Amygdala durchgeführt wurden.

Deshalb ist auch nicht bekannt, ob es dort überhaupt Unterschiede gibt.

5.4.2 Hirnregion

Ein weiterer Grund könnte in der Hirnregion selbst begründet sein.

Es musste für diese Arbeit ermittelt werden, welche Region des Amygdala für die Analyse der Spines von Neuroserpin-Knockout Mäusen am geeignetsten ist.

Es gibt viele verschiedene Nuklei, die die Amygdala bilden [19]. Durch die Literatur ist bekannt, dass im Bezug auf Angstkonditionierung der zentrale Kern und der basolaterale Komplex eine wichtige Rolle spielen.

Da jedoch die meisten Neuronen im Bereich des basolateralen Amygdalas vorzufinden sind [27], wurde sich für diese Analyse auf diesen Bereich konzentriert.

Die Färbung mit DiI im basolateralen Komplex bei Mäusen, auch in Verbindung mit Neuroserpin, ist jedoch neu.

Es wurden bisher nur der mediale Kern der Amygdala und auch nur von Ratten mit DiI-Fluoreszenzkristallen gefärbt [46] [47] und mit dem Ziel der Neuroserpinanalyse noch nicht durchgeführt. Aufgrund des Mangels an Erfahrungswerten, musste die Analyse dort eigenhändig entwickelt werden.

Der Komplex selbst besteht aus mehreren kleineren Kernen, den lateralen, basalen und basomedialen Nuklei [19]. Es wurde der komplette basolaterale Komplex für die Analyse gewählt und nicht nur einer der drei Kerne, da die Vermutung nahelag, dass aufgrund der dann sehr kleinen Zielregion, zu wenig Zellen gefärbt werden und es Probleme bei der Lokalisierung sowie Punktation dieser Zielregion geben könnte. Da die Pyramidenzellen 80% aller Neurone im ganzen basolateralen Komplex darstellen [18] und es das Ziel war, diese Zellen zu untersuchen, wurde nicht weiter in die Unterkerne differenziert.

Im Nachhinein könnte dies eine Fehlerquelle der Analyse darstellen, denn es ist über die Literatur herausgefunden worden, dass der basale Kern keine essentielle Rolle in der Angstkonditionierung spielt und es eine direkte Verbindung zwischen der CA1-Region des Hippocampus mit dem lateralen Kern der Amygdala gibt [17].

Um die Methode überhaupt im Amygdala erproben und feststellen zu können, ob sie dort überhaupt durchführbar ist, war die Wahl des kompletten basolateralen Komplexes jedoch eine gute Lösung.

Nach Betrachtung und Auswertung der Messdaten, weniger signifikante im Amygdala, kommt jedoch die Vermutung auf, dass die Analyse anders verlaufen wäre, wenn man die Untersuchung der Morphologie von dendritischen Spines bei Neuroserpin-Knockout Mäusen auf den lateralen Nukleus der Amygdala beschränkt hätte.

Denn nun könnten die Daten durch Werte des basalen Nukleus, die eigentlich nicht relevant für die Analyse wären, verfälscht worden sein und dass vielleicht auf Grund dessen, wenn es überhaupt einen Unterschied gibt, die Ausbeute an signifikanten Differenzen im Amygdala im Vergleich zum Hippocampus reduziert ist.

5.4.3 Auswahl der Hirnschnitte

Eine weitere Fehlerquelle wäre die Auswahl der Schnitte, auf welchem die Zielregion des basolateralen Komplexes der Amygdalas zu finden ist. Eine große Hilfe dabei ist der „mouse-brain-atlas“. Dabei handelt es sich um eine Art Internetlexikon, in welchem ein Mäusegehirn sowohl koronal und horizontal geschnitten wurde und die Schnitte der Reihe nach geordnet vorliegen. Auf jedem Schnitt sind dabei die Hirnregionen beschriftet, die dort vorzufinden sind.

Es wurden die Schnitte Bregma -1,06mm bis -1,70mm für die Analyse gewählt, denn es wurden auf allen in diesem Bereich eingeschlossenen Ebenen der basolaterale Komplex (BLA) der Amygdala nachgewiesen.

Es kann aber zu einer leichten Verschiebung der Regionen kommen, wenn die Schnitte mit dem Vibratom nicht ganz gerade angefertigt wurden. Demnach ist es auch möglich, dass, durch eine leichte Verschiebung, die Zellen einer anderen Amygdalaregion mit in die Auswertung einbezogen worden sind und die Ergebnisse verfälscht haben.

5.4.4 Zelldichte

Ein Problem bei der Analyse der Amygdala, bzw. genauer des basolateralen Komplexes, lag jedoch in der geringen Zelldichte der Pyramidenzellen im Vergleich zum Hippocampus. Dieses Problem trat jedoch erst auf, als die gefärbten Schnitte unter dem konfokalen Mikroskop betrachtet wurden. Die Pyramidenzellen liegen anders als im Hippocampus, wo sie in Reihen und gestapelt aneinander positioniert sind (Abbildung 28), im Amygdala einzeln und mit wesentlich geringerer Häufigkeit vor (Abbildung 31).

Diese Tatsache erschwerte die Färbung, da aufgrund der geringeren Dichte weniger Zellen gefärbt vorlagen und damit auch wesentlich weniger Dendriten für die Analyse zur Verfügung standen. Aus diesem Grund konnten auch nicht die gleichen Anzahlen an Dendriten im Hippocampus und Amygdala untersucht werden. Es gestaltete sich als äußerst schwierig die 20 Dendriten im basolateralen Komplex bei jeder Maus zur Auswertung zu finden. Würden dort die Pyramidenzellen genauso vorliegen, wie im Hippocampus, hätte eine andere Anzahl für die Analyse zur Verfügung gestanden.

Es ist also im Amygdala von äußerster Wichtigkeit die DiI-Kristalle richtig zu platzieren, um viele und gute Färbung von Neuronen und Dendriten zu erreichen. Jedoch hat es auch ein bisschen mit Glück zu tun, ob man mit der Insektennadel in die Nähe einer Pyramidenzelle gekommen ist oder sie direkt getroffen hat. Der Faktor der Zelldichte ist demnach durchaus ein Faktor, der das Ergebnis der Analyse nachhaltig beeinflusst haben könnte.

Es gibt demnach verschiedene Gründe, die dazu beigetragen haben könnten, dass im Amygdala weniger signifikante Ergebnisse erreicht wurden, als im Hippocampus.

Dazu gehören die Probleme, die eine neuentwickelte Methode mit sich bringt. Die Durchführung dieser scheint für den Hippocampus gut entwickelt zu sein, was man anhand der recht großen Anzahl signifikanter Daten erkennt.

Für die Amygdala jedoch scheint die Methode noch nicht genug erprobt zu sein.

Das Problem könnte dabei an der Region selbst liegen, dass die Durchführung dort sich als etwas diffiziler erwiesen hat, als erwartet, aufgrund der Tatsache, dass andere morphologische Bedingungen vorliegen, wie geringere Zelldichte und Lage der Neuronen. Vielleicht auch, dass der Analysebereich zu groß gewählt wurde und die falschen Nuklei beinhaltet.

Neben der Methode könnte ein weiterer Aspekt sein, dass vielleicht gar kein signifikanter Unterschied zwischen Neuroserpin-Knockout Mäusen und dem Wildtyp bezüglich der Morphologie der dendritischen Spines vorliegt und deshalb weniger Unterschiede in der Amygdala festgestellt wurden. Dies sollte jedoch mit einem weiteren Versuch überprüft werden, bevor man es als einen Grund in Betracht zieht.

5.5 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob Neuroserpin einen Einfluss auf die Morphologie von dendritischen Spines zeigt.

Im Hippocampus konnten signifikante Unterschiede zwischen dem WT und den NsKO festgestellt werden. Diese zeigten, dass Neuroserpin in der Tat einen Effekt auf die Gestalt der Spines ausübt, da diese wesentlich größere Köpfe sowie kürzere und breitere Hälse bei den KOs im Vergleich zum WT zeigen.

Um die ersten Resultate zu bestätigen, sollte der Versuch noch einmal mit mehreren Versuchstieren wiederholt werden. Denn bei einer größeren Anzahl reduziert sich auch die Fehlerquote.

Bei einer Wiederholung sollte man jedoch vorher die Amygdalaanalyse überdenken.

Entweder man führt sie unverändert, unter den selben Bedingungen, wie beim ersten Mal durch und prüft, ob es wiederholt zu wenig signifikanten Resultaten kommt, oder man verändert den Bereich der Analyse im Amygdala. Es könnte anstatt des gesamten BLA-Komplexes auch nur der laterale Nukleus gewählt werden, da aus der Literatur bekannt ist, dass dieser in direkter Verbindung mit der CA1-Region des Hippocampus steht [17].

Zusätzlich könnte man untersuchen, ob es einen Unterschied in der Spinemorphologie, unter Einfluss von Neuroserpin, zwischen jungen und erwachsenen Mäusen gibt.

Dafür würde man die gleiche Methode mit 13 Wochen alten Mäusen durchführen. Die Untersuchung der Spines deckt jedoch nur den morphologischen Teil der Neuroserpin-Analyse ab.

Eine weitere wichtige Arbeit, um Neuroserpins Wirkung genauer zu erforschen, wäre die funktionelle Analyse. Diese beinhaltet Verhaltensstudien, ähnlich denen von Madani et al (2003) mit Ns-überexprimierenden Mäusen [11], von NsKO Mäusen, die bisher nicht stattgefunden haben, die momentan aber schon am UKE durchgeführt werden.

Diese Tests beinhalten das soziale Verhalten der NsKO gegenüber anderen Artgenossen.

Dieser Aspekt ist besonders wichtig im Bezug auf Schizophrenie, da man festgestellt hat, dass das soziale Verhalten bei schizophrenen Patienten eingeschränkt vorliegt [48]. Des Weiteren werden das Arbeitsgedächtnis, welches in Schizophrenie Defizite aufweist [41], sowie das Verhalten der Neuroserpin-Knockout Mäuse in eine neuen Umgebung untersucht.

Die biochemische Analyse wäre die letzte Art und Weise, um Neuroserpin, genauer bis in seine Biochemie, zu erforschen.

Ziel ist es, den Mechanismus herausfinden zu können, mit dem Neuroserpin bzw. dessen Knockout die Spinebildung beeinflusst. Eine Möglichkeit wäre das Adhäsionsmolekül N-Cadherin.

Es ist bereits herausgefunden worden, dass Ns die Expression von N-Cadherin, welches in der postsynaptischen Membran im Kopf des Spines lokalisiert ist, reguliert [49].

In der Arbeit von Lee et al (2008) wurde der Effekt von Neuroserpin auf N-Cadherin in PC12-Zellen getestet. Ohne Neuroserpin lagen diese Zellen einzeln vor, mit Ns bildeten sie hingegen große Zellcluster und zeigten eine wesentliche höhere Anzahl an Zell-Adhäsionsmolekülen. Es scheint demnach durchaus eine Abhängigkeit zwischen N-Cadherin und Ns zu geben, bei der es sich lohnt, dieser in Zukunft weiter auf den Grund zugehen. Es konnte zusätzlich herausgefunden werden, dass N-Cadherin auch einen Effekt auf dendritische Spines zu besitzt scheint, denn die Zerstörung von N-Cadherin bewirkt ein Schrumpfen der Spinelänge und den Verlust ihrer Stabilität auf Grund größerer Beweglichkeit [50]. Aus diesem Grund und weil schon in dieser Arbeit der Effekt Neuroserpins auf die Spinemorphologie analysiert wurde, ist es wichtig, diesen Faktor in zukünftige Untersuchungen und Forschungen miteinzubeziehen.

6 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, ob der Gen-Knockout von Neuroserpin in Mäusen Veränderungen in der Morphologie von dendritischen Spines bewirkt.

Dazu wurden die Spines der Ns-KO Mäuse mit denen des Wurfgeschwister Wildtypes verglichen. Durch eine Färbung mit dem DiI-Fluoreszenzfarbstoff sind die Pyramidenzellen des Hippocampus und des Amygdalas sichtbar gemacht worden, um eine Analyse der Spines dieser Regionen durchführen zu können.

Zusammenfassend konnten signifikante Unterschiede in der Morphologie der Spines zwischen WT und KO in beiden Hirnregionen und bezüglich der Spineanzahl nachgewiesen werden.

Es ist zu einem eindeutigen Ergebnis bei der Frage gekommen, wie sich der Neuroserpin-Knockout auf die Anzahl der Spines auswirkt.

Im Amygdala konnten deutlich weniger Spines bei NsKO Mäusen, verglichen mit dem WT, nachgewiesen werden. Die Ergebnisse im Hippocampus zeigen hingegen keinen Unterschied zwischen beiden Mäusegruppen.

Demnach kann es sein, dass Neuroserpin im Hippocampus und Amygdala einen unterschiedlichen Einfluss auf die Anzahl der Spines zu besitzen scheint.

Im Hinblick auf die Morphologie wurde im Hippocampus festgestellt, dass die Spines der Knockout Mäuse in allen Klassen einen breiteren Kopf und einige auch einen dickeren sowie kürzeren Hals besitzen, als die der Wildtyp Mäuse.

Es kann also sein, dass das Level an Neuroserpin im Hippocampus ausschlaggebend für die Größe des Spinekopfes ist, denn je höher die Konzentration an Ns, desto geringer scheint die Kopfbreite der Spines auszufallen.

Neben dem Hippocampus konnten auch im Amygdala signifikante Veränderungen in der Morphologie zwischen dem Neuroserpin-Knockout und dem WT nachgewiesen werden.

In den KO Mäusen sind deutlich weniger Spines vorzufinden und diese besitzen zudem größere Köpfe als die Spines des WT. Es könnte sein, dass im Amygdala durch das Kopfwachstum (größere Fläche, größere synaptische Aktivität) die geringere Anzahl an Spines ausgeglichen werden soll. Das hätte den gleichen Effekt, wie wenn weniger Verbindungen vorliegen würden, die genutzt werden könnten. Diese würden aber dafür häufiger in Anspruch genommen werden und deshalb scheinen die Spines dann einen ausgeprägteren Kopf zu besitzen.

Es sind demnach weniger signifikante Unterschiede zwischen beiden Mäusegruppen im Amygdala nachgewiesen worden als im Hippocampus.

Somit ist es möglich, dass im Amygdala vielleicht gar keine Unterschiede zwischen KO und WT bezüglich der Spines vorliegen. Dies ist allerdings nur eine Vermutung, die noch nicht bewiesen werden konnte.

Es kann aber auch darin begründet liegen, dass die Analyse im Amygdala im Laufe dieser Arbeit etabliert werden musste und sich um einiges diffiziler gestaltete, aufgrund anderer morphologischer Bedingungen.

Mit dieser Analyse konnte ein wichtiger Einfluss Neuroserpins auf die Neuronen aufgedeckt werden, den es nun gilt, mit weiteren Versuchen, zu bestätigen. Denn nur auf diese Weise bekommt man heraus, ob Neuroserpin wirklich einen derartigen Effekt bewirkt oder ob die Daten dem Zufall zu zuführen sind.

Diese Arbeit stellt somit einen kleinen aber wichtigen Baustein in der Erforschung von Neuroserpin dar. Jede Entdeckung im Bezug auf Neuroserpin und seine Wirkung auf die Neuronen des Gehirns, bringt die Forschung bezüglich dieses sehr faszinierenden aber recht unbekanntem Proteins weiter voran. Nur wenn man weiß, wie Neuroserpin agiert und was es bewirkt, kann herausgefunden werden, welche exakte Rolle Neuroserpin in den psychiatrischen Erkrankungen inne hat und wie man sie vielleicht in Zukunft beheben bzw. heilen kann.

7 Abkürzungen

AMPA	Aminomethylphosphonsäure, verbreitetster Neurotransmitter-Rezeptor des Zentralnervensystems
BLA	Basolateraler Komplex der Amygdala
CA1-3	Cornu Ammonis 1-3
DiI	1,1-Dioctadecyl-3,3,3,3-Tetramethylindocarbocyanin Perchlorat
DIV	Day In Vitro
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, zur Antikoagulation von Blutproben
E15	Embryonaler Tag 15
FENIB	Familiäre Enzephalopathie mit Neuroserpin Inclusion Bodies
GABAerg	GABA= γ -Aminobuttersäure, auf GABA reagierend
hrGFP	humanized renilla reniformis Green Fluorescent Protein
KO	Knockout
LA	Lateraler Kern der Amygdala
LTD	Langzeit-Depression
LTP	Langzeit-Potenzierung
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat, als Rezeptor= Ionenkanal in der Zellmembran, aktiviert durch bindenden Liganden Glutamat
Ns	Neuroserpin
NsKO	Neuroserpin-Knockout
n.s.	nicht signifikant
Ns(-/-)	Neuroserpin-Knockout
PBS	„Phosphat buffered saline“, phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PSD	„post synaptic density“, postsynaptisch dichte Membranregion
P-Wert	Signifikanzwert
SPSS	Statistik- und Analysesoftware von IBM
tPA	tissue plasminogen activator, gewebespezifischer Plasminogenaktivator
WT	Wildtyp

8 Fachbegriffe

adult	erwachsen
afferent	hinzuführend; Afferenzen: Fortsätze von Neuronen, die zugeleitete Signale empfangen (Dendriten)/Erregung von der Peripherie ins Zentralnervensystem weiterleiten
akzessorisch	zusätzlich, auf anatomische Strukturen und Krankheiten bezogen
AMPA-Rezeptoren	Aminomethylphosphonsäure, verbreitetster Neurotransmitter-Rezeptor des Zentralnervensystems
anterograde Amnesie	Form von Gedächtnisstörung: Erinnerungsverlust für Ereignisse
apikal	zur Schädelspitze hin, an der Spitze liegend
Axon	langer, schlauchartiger Nervenfortsatz, auch Neurit genannt, der elektrische Impulse vom Soma wegleitet
axonal	das Axon betreffend
basal	zur Basis, zum Zellkörper hin orientierend
basolateral	alle Seiten außer der apikalen; dem Lumen/Basis einer Zelle angewandte Seite
Bouton	Knospe, knollenartige Ausstülpung
„Branching-Point“	Verzweigungspunkt
Bregma	der Punkt, an dem sich die sagittale und koronale Schädelnaht verbinden; dient als Referenzpunkt bei der Einordnung von Hirnregionen/Schnitten
Cluster	Haufen
Dendrit	astartiger Zellfortsatz von Nervenzellen
Depolarisation	Änderung des Membranpotentials zu positiveren Werten hin
deskriptive Statistik	beschreibende Statistik; Daten in Graphen darstellen und ordnen
distal	anatomische Hauptrichtung, von der Nervenzellmitte/Soma entfernt
Downregulation	Steuerungsvorgang zur Verminderung der Rezeptordichte oder der Ausschüttung eines biologischen Stoffes (Schutzmechanismus)
Dysregulation	Fehlsteuerung, Schwankungen im Neuroserpinlevel/Störung des Hormonhaushaltes
efferent	herkommend, Efferenzen: Fasern, von denen Signale ausgehen; Bereiche von Nervenzellen (Neurit), über die Erregungen von bestimmten Bereichen fort an andere weiterleiten
Expansion	Wachstum
Expression/Genexpression	Biosynthese von Proteinen
exzitatorisch	erregend, stimulierend

GABAerg	GABA= γ -Aminobuttersäure, auf GABA reagierend
Gen-Knockout	vollständiges Abschalten, außer Gefecht setzen, eines Gens im Genom eines Organismus
Induktion	Auslösung; Einführung
Klüver-Bucy-Syndrom	beidseitige Temporallappen-Läsion Verhaltensauffälligkeiten werden als dieses Syndrom bezeichnet
Konditionierung	in der Verhaltens-Lern-Psychologie: Erlernen von Reiz-Reaktionsmustern; Lerntheorie: einem natürlichen (unbedingten) Reflex kann man durch Lernen einen neuen, bedingten Reflex hinzufügen
Konnektivität	Verbindung von Neuronen
koronal	Frontalebene, stirnwärts
Korrelation	wechselseitige Beziehung
kortikal	den Cortex betreffend
Läsion	Schädigung, Verletzung
Langzeit-Depression	langanhaltende Reduktion der synaptischen Transmission, ausgelöst durch einen niederfrequenten Stimulus
Langzeit-Potenzierung	andauernde Erhöhung der synaptischen Transmission, ausgelöst durch einen hochfrequenten Stimulus (tetanische Stimulation)
limbisches System	Funktionseinheit des menschlichen Gehirns, zusammengesetzt aus mehreren Strukturen, verantwortlich für Verarbeitung von Emotionen und der Entstehung von Triebverhalten
Morphologie	beschreibt die äußere Gestalt von Lebewesen oder biologischen Einheiten; Lehre von Form, Gestalt und Struktur
Neophobie	Angst vor neuen Objekten, Situationen, neuartigen Dingen
Neuriten	Axon; einziger Fortsatz eines Neurons, mit dem eine Erregung vom Soma fort an ausgewählte Zellen weitergeleitet werden kann
Nissl-Färbung	histologische Färbetechnik zur Darstellung von Nervengewebe; violette bzw. blaue Farbstoffe binden an basophile RNA und DNA und färben Ribosomen u. Nukleoli blau bzw. violett; werden nur Zellkörper nicht aber die Fortsätze gefärbt
NMDA-Rezeptoren	N-Methyl-D-Aspartat, als Rezeptor= Ionenkanal in der Zellmembran, aktiviert durch bindenden Liganden Glutamat
Phänotyp	auch Erscheinungsbild; tatsächliche morphologische und physiologische Eigenschaften eines Organismus, unabhängig davon, ob diese Merkmale vererbt oder erworben wurden

Plastizität	Eigenschaften von Neuronen, Synapsen, Spines, sich in Abhängigkeit von der Verwendung in ihren Eigenschaften zu verändern; synaptische Plastizität: aktivitätsabhängige Änderung der Stärke der synaptischen Übertragung, verursacht durch Veränderungen in der Morphologie oder Physiologie der Synapse
Polymerisation	chemische Reaktion, bei der fortlaufend Monomere an ein wachsendes Polymer gebunden werden
postnatal	nach der Geburt
postsynaptisch	den postsynaptischen Bereich betreffend
präsynaptisch	den präsynaptischen Bereich betreffend
Projektionsneurone	Nervenzellen, deren langes Axon zur Erregungsleitung zu anderen Arealen des Zentralnervensystems dient
reziprok	wechselseitig
Rhesusaffen	Primatenart aus der Gruppen der Makaken
Signaltransduktion	Signalübertragung
Soma	Körper einer Zelle/Nervenzelle
Spines	Dorn bzw. Ausstülpung, die aus dem Schaft eines Dendriten hervortreten
stack	Stapel von Schichtaufnahmen z.B. eines Neurons, zur Rekonstruktion der 3D-Struktur des Objektes
step size	Intervalgröße (Schichtdurchmesser), mit welcher von dem Neuron unter dem Mikroskop Aufnahmen gemacht werden
Synaptogenese	Entstehung bzw. Herstellung einer neuen Synapse, bzw. eines synaptischen Kontaktes einer Nervenzelle zu einer anderen
tetanische Stimulation (theta-Burst Stimulation)	elektrische Reizung von Nervenzellen mit einer hohen sich wiederholenden Frequenz
transfektieren	Einbringen von fremden genetischen Material (DNA/RNA) in eukaryotische Zellen
Transmission	Erregungsübertragung an den Synapsen über Neurotransmitter
Überexpression	stark erhöhte Expression eines Gens einer Zelle; resultiert in einer entsprechend hohen Synthese des Proteins, welches durch eben jenes Gen kodiert wird
Vibratom	Schneidegerät, mit welchem man sehr dünne Gewebeschnitte durch Vibration einer Rasierklinge anfertigen kann
Wildtyp	normaler Organismus ohne Mutationen, wie er in der Natur vorzufinden ist

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über das menschliche Gehirn und seine Funktionen.....	9
Abbildung 2: Verschiedene Typen von Neuronen.....	10
Abbildung 3: Querschnitt durch das menschliche Gehirn.....	10
Abbildung 4: Aufbau des menschlichen Gehirns und Lage von Amygdala und Hippocampus	11
Abbildung 5: Amygdalaaufbau.....	12
Abbildung 6: Das neuronale Netzwerk unter Stresseinwirkung.....	13
Abbildung 7: Aufbau des Hippocampus.....	14
Abbildung 8: Aufbau einer Synapse aus Spine und Axon.....	15
Abbildung 9: Strukturelle Dynamik von dendritischen Spines.....	16
Abbildung 10: Klassifizierung der unterschiedlichen Spinearten.....	17
Abbildung 11: Aufbau eines Spines.....	19
Abbildung 12: Schema eines reifen "mushroom" Spines.....	20
Abbildung 13: Aktinzytoskelett: Mechanismus der Expansion eines Spines.....	22
Abbildung 14: Darstellung des Ortes der synaptischen Übertragung	23
Abbildung 15: LTP-Induktion/ Expression einer Synapse.....	24
Abbildung 16: Auswirkung von LTP und LTD auf die Spinemorphologie.....	25
Abbildung 17: Neuroserpinexpression im Gehirn einer adulten Maus.....	27
Abbildung 18: Auswirkungen einer Neuroserpinüberexpression.....	28
Abbildung 19: Neuroserpinüberexpression: Veränderte Spinegestalt.....	28
Abbildung 20: Verhaltensstudie von NsKO und WT.....	29
Abbildung 21: Speer aus Insektennadel und Zahnstocher.....	33
Abbildung 22: Koronaler Hirnschnitt auf Ebene des Hippocampus und der Amygdala.....	34
Abbildung 23: Imaris: Darstellung der 3D-Rekonstruktion	37
Abbildung 24: Imaris: Exakte 3D-Kopie des Originaldendriten	38
Abbildung 25: Imaris: "Spines Classifier".....	39
Abbildung 26: Imaris: Datendarstellung im Balkendiagramm.....	40
Abbildung 27: Mikroskopaufnahme: Pyramidenzellen im Hippocampus.....	43
Abbildung 28: Mikroskopaufnahme: Lage apikaler Dendrit im Hippocampus.....	44
Abbildung 29: Mikroskopaufnahme: Einzelner DiI-gefärbter Dendrit im Hippocampus.....	45
Abbildung 30: Mikroskopaufnahme: Mehrere DiI-gefärbte Dendriten im Hippocampus.....	46
Abbildung 31: Mikroskopaufnahme: Pyramidenzelle im Amygdala.....	47
Abbildung 32: Mikroskopaufnahme: Einzelner DiI-gefärbter Dendrit im Amygdala.....	48
Abbildung 33: Spineanzahl im Hippocampus.....	49
Abbildung 34: Spineanzahl im Amygdala.....	50
Abbildung 35: Datendarstellung aller Messparameter pro Spineklasse im Hippocampus.....	53
Abbildung 36: Länge der stubbys im Hippocampus.....	54
Abbildung 37: Kopfbreite der stubbys im Hippocampus.....	55
Abbildung 38: Kopfbreite der mushrooms im Hippocampus.....	56
Abbildung 39: Kopfbreite der long thins im Hippocampus.....	57
Abbildung 40: Kopfbreite der filopodia im Hippocampus.....	58
Abbildung 41: Halslänge der stubbys im Hippocampus.....	59
Abbildung 42: Halsbreite der stubbys im Hippocampus.....	60
Abbildung 43: Halsbreite der long thins im Hippocampus.....	61
Abbildung 44: Darstellung aller Messparameter pro Spineklasse im Amygdala.....	63
Abbildung 45: Dichte der filopodia im Amygdala.....	64

Abbildung 46: Kopfbreite der stubbys im Amygdala.....	65
Abbildung 47: Veränderungen in der Spinemorphologie im Hippocampus.....	71
Abbildung 48: Morphologische Veränderung der Spines im Amygdala.....	72

10 Literaturverzeichnis

- [1]: **Hering H, Sheng M.** *Dendritic Spines: Structure, Dynamics and Regulation.* Nature Rev Neurosci 2001; 2: 880-8.
- [2]: **Wiegert JS, Oertner TG.** *Dendritische Spines: Dynamische Bausteine des Gedächtnisses.* Neuroforum 2011; 1: 12-20.
- [3]: **Bhatt DH, Zhang S, Gan W-B.** *Dendritic Spine Dynamics.* Annu Rev Physiol 2009; 71: 261-82.
- [4]: **Von Bohlen O, Halbach.** *structure and function of dendritic spines within the hippocampus.* Ann Anat-Elsevier 2009; 191: 518-31.
- [5]: **Leuner B, Shors TJ.** *Stress, Anxiety and Dendritic Spines: What are the Connections?.* J Neurosci 2013; 251: 108-19.
- [6]: **Galliciotti G, Sonderegger P.** *Neuroserpin.* Front in Biosci 2006; 11:33-45.
- [7]: **Borges VM, Lee TW, Christie DL, Birch NP.** *Neuroserpin Regulates the Density of Dendritic Protrusions and Dendritic Spine Shape in Cultured Hippocampal Neurons.* J Neurosci Research 2010; 88: 2610-7.
- [8]: **Vawter MP, Weickert CS, Ferran E, Matsumoto M, Overman K, Hyde TM, et al.** *Gene Expression of Metabolic Enzymes and a Protease Inhibitor in the Prefrontal Cortex Are Decreased in Schizophrenia.* J Neurochem Research 2004; 29 (6): 1245-55.
- [9]: **Brennan KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhart C, Tran N, Sangar S et al.** *Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells.* Nature 2011; 473: 221-5.
- [10]: **Hakak Y, Walker JR, Li C, Wong WH, Davis KL, Buxbaum JD et al.** *Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia.* PNAS 2001; 98 (8): 4746-51.
- [11]: **Madani R, Kozlov S, Akhmedov A, Cinelli P, Kinter J, Lipp H-P, et al.** *Impaired explorative behavior and neophobia in genetically modified mice lacking or overexpressing the extracellular serine protease inhibitor neuroserpin.* J Mol and Cell Neurosci 2003; 23: 473-94.
- [12]: **Gordon C.** *Anatomica. The Complete Home Medical Reference.* Deutsche Ausgabe. Königswinter, Könenmann in der Tandem Verlag GmbH 2004; p. 162.
- [13]: **Schwegler JS.** *Der Mensch: Anatomie und Physiologie.* Auflage 3. Stuttgart. Georg Thieme Verlag 2002; pp. 403-63.
- [14]: **Gertz SD.** *Basiswissen Neuroanatomie.* Auflage 2. Stuttgart, New York. Georg Thieme Verlag 1997; pp.1-7.
- [15]: **Faller A, Schünke M.** *Der Körper des Menschen.* Auflage 13. Stuttgart, New York. Georg Thieme Verlag 1999; pp. 535-606.
- [16]: **Ulfig N.** *Kurzlehrbuch der Anatomie.* Stuttgart. Georg Thieme Verlag 2008; p. 7-18.
- [17]: **Kaschel TB.** *Die Langzeit-Depression in der lateralen Amygdala.* Berlin. Medizinische Fakultät Charité. Universitätsmedizin. Dissertation. 2010.

- [18]: **Orsini CA, Maren S.** *Neuronal and Cellular Mechanisms of Fear and Extinction Memory Formation.* *Neurosci Biobehav Rev* 2012; 36(7): 1773-1802.
- [19]: **Sah P, Faber ESL, Lopez De Armentia M, Power J.** *The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology.* *Physiol Rev* 2003; 83: 803-34.
- [20]: **Maren S.** *Synaptic Transmission and Plasticity in the Amygdala.* *Mol Neurobiol* 1996; 13(1): 1-22.
- [21]: **Morgan JT, Amaral DG.** *A comparative analysis of the dendritic organization of principal neurons in the lateral and central nuclei of rhesus macaque and rat amygdala.* *J Comp Neurol* 2014; 522(3): 689-716.
- [22]: **Pfister R.** 2008. *Vergleichende Anatomie des Hippocampus.* Würzburg. Julius-Maximilians-Universität. Vorlesung HS-Neuroanatomie. 2008.
- [23]: **Kleemann T.** *Veränderungen der Dichte von postsynaptischen Spines an Körnerzellen im Hippocampus von p35-Knockout- und Reeler Mäusen.* Freiburg. Medizinische Fakultät/Universitätsklinikum. Dissertation. 2009.
- [24]: **Kandel EA, Schwartz JH, Jessel TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ.** *Principles of Neuronal Science.* 5th ed. New York. McGraw-Hill Companies Medical 2012: p. 392-411.
- [25]: **Kandel EA, Schwartz JH, Jessel TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ.** *Principles of Neuronal Science.* 5th ed. New York. McGraw-Hill Companies Medical 2012: p. 1487-1521.
- [26]: **Hayashi Y, Majewska AK.** *Dendritic Spine Geometry: Functional Implication and Regulation.* *J Neuron* 2005; 46: 529-32.
- [27]: **Tada T, Sheng M.** *Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis.* *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16: 95-101.
- [28]: **Shen H, Sesack SR, Toda S, Kalivas PW.** *Automated quantification of dendritic spine density and head spine diameter in medium spiny neurons of the nucleus accumbens.* *Brain Struct Funct* 2008; 213: 149-57.
- [29]: **Lippmann J, Dunaevsky A.** *Dendritic Spine Morphogenesis and Plasticity.* *J Neurobiol* 2005; 64: 47-57.
- [30]: **Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H.** *Structure-stability-function relationships of dendritic spines,* *Trends Neurosci* 2003; 26: 360-8.
- [31]: **Hotulainen P, Hoogenraad CC.** *Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function.* *J Cell Biol* 2010; 189: 619-29.
- [32]: **Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J.** *Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition.* *Trends Neurosci* 2010; 33(3): 121-9.
- [33]: **Lai KO, Ip NY.** *Structural plasticity of dendritic spines: the underlying mechanisms and its dysregulation in brain disorders.* *Biochem et Biophys Acta* 2013; 1832: 2257-63.
- [34]: **Holtmaat A, Svoboda K.** *Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain.* *Nat Rev Neurosci* 2009; 10: 647-58.
- [35]: **Tatavarty V, Das S, Yu J.** *Polarization of actin cytoskeleton is reduced in the dendritic protrusions during early spine development in hippocampal neuron.* *Mol Biol Cell* 2012; 23: 3167-77.

- [36]: **Bosch M, Hayashi Y.** *Structural plasticity of dendritic spines.* Curr Opin Neurobiol 2012; 22: 383-8.
- [37]: **Yuste R, Bonhoeffer T.** *Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity.* Annu Rev Neurosci 2001; 24: 1071-89.
- [38]: **Krueger SR, Ghisu GP, Cinelli P, Gschwend TP, Osterwalder T, Wolfer DP, Sonderegger P.** *Expression of Neuroserpin, an Inhibitor of Tissue Plasminogen Activator, in Developing and Adult Nervous System of the Mouse.* J Neurochem 1997; 17(23): 8984-96.
- [39]: **Davis RL, Holohan PD, Shrimpton AE, Tatum AH, Daucher J, Collins GH, et al.** *Familial Encephalopathy with Neuroserpin Inclusion Bodies.* Americ J Path 1999; 155(6): 1901-13.
- [40]: **Leuner B, Shors TJ.** *Synapse Formation and Memory.* Encyclopedia of behavioral Neurosci (Koob G, LeMoal M, Thompson RF, Eds) Elsevier 2010; 349-55.
- [41]: **Glausier JR, Lewis DA.** *Dendritic Spine Pathology in Schizophrenia.* J Neurosci 2013; 251: 90-107.
- [42]: **Kim BG, Dai HN, McAtee M, Vicini S, Bregmann BS.** *Labeling of dendritic spines with the carbocyanine dye DiI for confocal microscopic imaging in lightly fixed cortical slices.* J Neurosci Methods 2007; 162 (1-2): 237-43.
- [43]: **Kandel EA, Schwartz JH, Jessel TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ.** *Principles of Neuronal Science.* 5th ed. New York. McGraw-Hill Companies Medical 2012: p. 1269-71.
- [44]: **Butz M, van Ooyen A.** *A Simple Role of Dendritic Spine and Axonal Bouton Formation Can Account for Cortical Reorganisation after Focal Retinal Lesions.* PLOS Comput Biol 2013; 9(10): e1003259.
- [45]: **Bourne J, Harris KM.** *Do thin spines learn to be mushroom spines that remember?.* Curr Opin Neurobiol 2007; 17: 381-6.
- [46]: **Brusco J, Dall'Oglio A, Rocha LB, Rossi MA, Moreira JE, Rasio-Filho AA.** *Descriptive findings on the morphology of dendritic spines in the rat medial Amygdala.* Neurosci Letter 2010; 483(2): 152-6.
- [47]: **Cooke BM, Simerly RB.** *Ontogeny of bidirectional connections between the medial nucleus of the amygdala and the principal bed nucleus of the stria terminalis in the rat.* J Comp Neurobiol 2005; 489(1): 42-58.
- [48]: **Wilhelm K.** *Kontaktstörung im Nervennetz.* Kongressbericht experimentelle Medizin Max Planck Forschung 2006; 4: 58-62.
- [49]: **Lee TW, Coates LC, Birch NP.** *Neuroserpin Regulates N-Cadherin-Mediated Cell Adhesion Independently of its Activity as an Inhibitor of Tissue Plasminogen Activator.* J Neurosci Research 2008; 86: 1243-53.
- [50]: **Mysore SP, Tai CY, Schumann EM.** *N-Cadherin, spine dynamics and synaptic function.* Front Neurosci 2008; 2(2): 168-75.

-
- [51]: URL: www.airflag.com/Hirn/w3/w3Gehirn.html
Datum letzter Zugriff: 04.03.2014.
- [52]: **Alzheimer Forschung Initiative e.V.**. *Anatomie des Gehirns*.2011.
URL: http://www.alzheimer-forschung.de/alzheimer-krankheit/illustrationen_anatomie.htm
Datum letzter Zugriff: 03.04.2014.
- [53]: **Williams RW**. 1999. *Mouse-brain-atlas C57BL/6J-Section 20*, neurogenetics at UT Health Science Center.
URL: www.mbl.org/atlas170/atlas170_frame.html
Datum letzter Zugriff: 04.03.2014.
- [54]: **Gehirn lernen**.
URL:<http://www.gehirnlernen.de/plastizitaet>.
Datum letzter Zugriff: 12.03.2014.
- [55]: **ntv.de**. *Fortschritt in der Gedächtnisforschung: Kontakte fördern Synapsenbildung*. Okt. 2012. URL: <http://www.ntv.de/wissen/Kontakte-foerdern-Synapsenbildung-article7371836.html>
Datum letzter Zugriff: 12.03.2014.