

Aus dem  
Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie  
der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Rüdiger Köhling



# **Der altersabhängige Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die synaptische Plastizität am medialen Tractus perforans**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von  
Tim Wende  
aus Rostock

Einreichung: 15. Januar 2018

Verteidigung: 12. Juni 2019



Dieses Werk ist lizenziert unter einer  
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell -  
Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz.

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. habil. Timo Kirschstein  
Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie, Universitätsmedizin Rostock
2. PD Dr. med. habil. Tim Jürgens  
Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsmedizin Rostock
3. Prof. Dr. med. habil. Roland Bender  
Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>VI</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hippocampus .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Hippocampus und Gedächtnis .....	1
1.1.2 Anatomie des Hippocampus.....	3
1.1.3 Tractus perforans ( <i>engl. perforant path</i> ) .....	6
<b>1.2 Synaptische Plastizität .....</b>	<b>7</b>
1.2.1 Synaptische Plastizität und Gedächtnis.....	7
1.2.2 Mechanismen der Langzeitpotenzierung .....	7
<b>1.3 Stickstoffmonoxid.....</b>	<b>10</b>
1.3.1 Die Signalkaskade von Stickstoffmonoxid .....	10
1.3.2 Stickstoffmonoxid und synaptische Plastizität.....	11
<b>1.4 HCN-Kanäle .....</b>	<b>12</b>
1.4.1 Struktur und Funktion der HCN-Kanäle .....	12
1.4.2 HCN-Kanäle und synaptische Plastizität .....	15
<b>1.5 Ziele der Arbeit.....</b>	<b>16</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Versuchstiere .....</b>	<b>17</b>

<b>2.2</b>	<b>Materialien, Geräte und Software .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Präparation .....</b>	<b>19</b>
<b>2.4</b>	<b>Lösungen.....</b>	<b>20</b>
2.4.1	Artifizieller Liquor ( <i>engl. artificial cerebrospinal fluid, ACSF</i> ).....	20
2.4.2	Saccharose-Lösung .....	21
<b>2.5</b>	<b>Pharmakologie .....</b>	<b>21</b>
2.5.1	Aliquotierung .....	22
2.5.2	Hersteller und Endkonzentrationen .....	22
2.5.3	Badapplikation der Pharmaka .....	22
<b>2.6</b>	<b>Versuchsaufbau .....</b>	<b>23</b>
<b>2.7</b>	<b>Versuchsablauf .....</b>	<b>25</b>
<b>2.8</b>	<b>Versuchsgruppen .....</b>	<b>27</b>
<b>2.9</b>	<b>Auswertung .....</b>	<b>28</b>
2.9.1	Analyse der fEPSPs .....	28
2.9.2	Grafische Darstellung der Versuche .....	29
2.9.3	Prüfung auf signifikante Unterschiede .....	30
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Der Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die LTP am MPP .....</b>	<b>31</b>
3.1.1	Die LTP früh-postnataler Ratten unter Gabazin (Kontrollversuche) .....	31
3.1.2	L-NAME verringert die LTP am MPP früh-postnataler Ratten.....	32
3.1.3	Die Wirkung von L-NAME am MPP ist altersabhängig .....	34
<b>3.2</b>	<b>Die Kaskade des früh-postnatalen NO-Signalwegs .....</b>	<b>37</b>
3.2.1	cGMP ist der Vermittler der NO-Wirkung am MPP .....	37

3.2.2	HCN-Kanäle sind ein Effektor des NO/cGMP-Signalwegs.....	39
3.2.3	Übersicht der Ergebnisse der dBS-Versuche (P9–15).....	41
3.3	<b>Keine signifikante Änderung der PPR durch dBS .....</b>	<b>42</b>
4	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>43</b>
4.1	Das in-vitro-Modell der synaptischen Plastizität.....	43
4.2	Die NOS-Blockade am medialen Tractus perforans .....	44
4.3	Rekonstruktion des NO-Signalwegs .....	45
4.4	Differenzierung prä- und postsynaptischer Prozesse .....	47
4.5	Die Rolle der HCN-Kanäle bei der Langzeitpotenzierung.....	48
4.6	Ausblick.....	52
	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>54</b>
	<b>THESEN ZUR DISSERTATION .....</b>	<b>56</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>57</b>
	<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>72</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>73</b>

# Abkürzungen

*Physikalische Formelzeichen und deren SI-Einheiten werden nicht gesondert aufgeführt*

8-Br-cGMP	8-Bromoguanosin-3',5'-Cyclomonophosphat
AC	Adenylat-Cyclase
ACSF	artifizieller Liquor, <i>engl. artificial cerebro-spinal fluid</i>
AMPA(R)	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionsäure (-Rezeptor), <i>engl. <math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (receptor)</i>
CA1/2/3	Cornu ammonis, Region 1/2/3
CaM	Calmodulin
CaMK I/II	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Protein-Kinase I/II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cCMP	cyclisches Cytidinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CNBD	<i>engl. cyclic nucleotide binding domain</i> , cyclische Nucleotide bindende Domäne
CNG-Kanäle	<i>engl. cyclic nucleotide gated channels, CNG channels</i>
CREB-Protein	cAMP-responsives-Element bindendes Protein
dBS	Stimulation im $\delta$ -Rhythmus, <i>engl. delta-burst stimulation</i>
doi	Digitaler Objektbezeichner, <i>engl. digital object identifier</i>
EC	entorhinaler Cortex
EDRF	Stickstoffmonoxid (NO), <i>engl. endothelial-derived relaxing factor</i>
engl.	englisch
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
fEPSP	exzitatorisches postsynaptisches Feld-Potential, <i>engl. field excitatory postsynaptic potential</i>

fIPSP	inhibitorisches postsynaptisches Feld-Potential, <i>engl. field inhibitory postsynaptic potential</i>
GABA	$\gamma$ -Amino-Buttersäure, <i>engl. <math>\gamma</math>-aminobutric acid</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GYG	Glycin-Tyrosin-Glycin-Motiv
HCN-Kanäle	<i>engl. hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated, non-selective channels, HCN channels</i>
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
I <sub>h</sub>	Strom <i>I</i> durch den HCN-Kanal
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
L-NAME	L-Nitro-Arginin-Methyl-Ester
LEC	lateraler entorhinaler Cortex
LPP	lateraler Tractus perforans, <i>engl. lateral perforant path</i>
LTD	Langzeitdepression, <i>engl. long-term depression</i>
LTP	Langzeitpotenzierung, <i>engl. long-term potentiation</i>
MEC	medialer entorhinaler Cortex
MPP	medialer Tractus perforans, <i>engl. medial perforant path</i>
NMDA(R)	N-Methyl-D-Aspartat (-Rezeptor)
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
P9/10/...	9/10/... Tage postnatal
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PPR	Doppelpuls-Verhältnis, <i>engl. paired pulse ratio</i>
SEM	Standardabweichung vom Mittelwert, <i>engl. standard error of the mean</i>

sGC	lösliche Guanylat-Cyclase, <i>engl. soluble guanylyl cyclase</i>
TBS	Stimulation im $\theta$ -Rhythmus, <i>engl. theta-burst stimulation</i>
$U_{1/2}$	Median der Aktivierungskurve eines Ionenkanals
$U_{rev}$	Umkehrpotential eines Ionenkanals
vgl.	vergleiche
ZD7288	4-Ethylphenylamino-1,2-Dimethyl-6-Methylaminopyrimidinium-Chlorid
ZNS	zentrales Nervensystem



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Horizontalschnitt des Hippocampus eines Versuchstieres (P9–15).....	3
Abbildung 2. Der trisynaptische Schaltkreis.....	5
Abbildung 3. Die Verbindungen des Hippocampus .....	5
Abbildung 4. Das Standardmodell der Langzeitpotenzierung .....	8
Abbildung 5. Struktur einer Untereinheit des HCN-Kanals .....	13
Abbildung 6. Schematischer Aufbau der Versuche .....	23
Abbildung 7. Schema des dBS-Protokolls zur LTP-Induktion .....	26
Abbildung 8. Beispiel einer Messung eines fEPSP an den Körnerzell- Synapsen des MPP .....	28
Abbildung 9. Die Kontroll-LTP am MPP (P9–15).....	31
Abbildung 10. L-NAME verringert die LTP am MPP früh-postnataler Ratten.....	32
Abbildung 11. Übersicht des L-NAME-Effektes am MPP früh-postnataler Ratten .....	33
Abbildung 12. Die Kontroll-LTP am MPP adulter Ratten (P30–150).....	34
Abbildung 13. Die LTP unter L-NAME am MPP adulter Ratten .....	35
Abbildung 14. Zusammenfassung des L-NAME-Effektes am MPP adulter Ratten .....	36
Abbildung 15. Die LTP unter L-NAME + 8-Br-cGMP (P9–15) .....	37
Abbildung 16. 8-Br-cGMP hebt den L-NAME-Effekt auf .....	38
Abbildung 17. Die LTP unter L-NAME + 8-Br-cGMP + ZD7288 (P9–15).....	39
Abbildung 18. ZD7288 hebt den 8-Br-cGMP-Effekt auf.....	40
Abbildung 19. Übersicht der dBS-Versuche (P9–15).....	41
Abbildung 20. Übersicht der PPR vor und nach dBS.....	42
Abbildung 21. Schema der Signalkaskade am MPP .....	47
Abbildung 22. Aktivierungskurven von $I_h$ und $I_{Na}$ .....	49

Abbildung 23. Schematischer Vorschlag eines Modells der LTP-Induktion  
in Abhängigkeit von NO, cGMP und HCN-Kanälen an den  
Körnerzell-Synapsen des früh-postnatalen MPP ..... 52

# 1 Einleitung

Der Hippocampus ist eine paarige Formation im zentralen Nervensystem (ZNS) und spielt eine zentrale Rolle in der Funktion von Gedächtnis und räumlicher Orientierung (1). Während die Wirkung von Stickstoffmonoxid (NO) im Gefäßendothel schon weitgehend bekannt ist, wird dessen Einfluss auf die Physiologie des ZNS nach wie vor intensiv erforscht (2). In diesem Rahmen soll in der vorliegenden Arbeit der altersabhängige Einfluss von NO sowie seiner Signalkaskade auf die Plastizität der Synapsen zwischen medialem Tractus perforans und hippocampalen Körnerzellen untersucht werden.

## 1.1 Hippocampus

Gelegen im medialen Temporallappen des Menschen, ist der Hippocampus eine Formation mit zentraler Bedeutung für das episodische Gedächtnis und die räumliche Navigation (1). Seit den Veröffentlichungen zum unter dem Pseudonym „H.M.“ berühmt gewordenen Patienten Henry Gustav Molaison widmeten die Neurowissenschaften kaum einer Gehirnstruktur mehr Aufmerksamkeit als dem Hippocampus. Molaison wurde infolge einer Temporallappenepilepsie beidseits medial lobektomiert, wodurch er Uncus, Amygdala und 2/3 seines Hippocampus verlor (3). Postoperativ besserte sich zwar die Epilepsie, jedoch kam es zu einer irreversiblen anterograden Amnesie, die im Vergleich mit anderen Operationen auf die weitgehende Zerstörung des Hippocampus zurückgeführt wurde. Dies prägte die noch heute gültige Vorstellung vom Hippocampus als Tor zum Gedächtnis.

### 1.1.1 Hippocampus und Gedächtnis

Die Fähigkeit, bekannte Informationen zu erkennen und wiederzugeben, ist eine der zentralen Funktionen nicht nur des menschlichen Großhirns. Für diese Funktion gilt der Hippocampus als wichtiges anatomischer Element. Daneben hat er Bedeutung für die Regulation emotionalen Verhaltens, einzelner Aspekte der motorischen Kontrolle und auch für die Regulation der hypothalamischen Funktion (4).

Es werden Netzwerke von Millionen von Nervenzellen benötigt, die in ihrem räumlichen und zeitlichen Zusammenspiel die komplexe Leistung des menschlichen Gedächtnisses hervorbringen (5). Obwohl es die Zusammenarbeit von allen

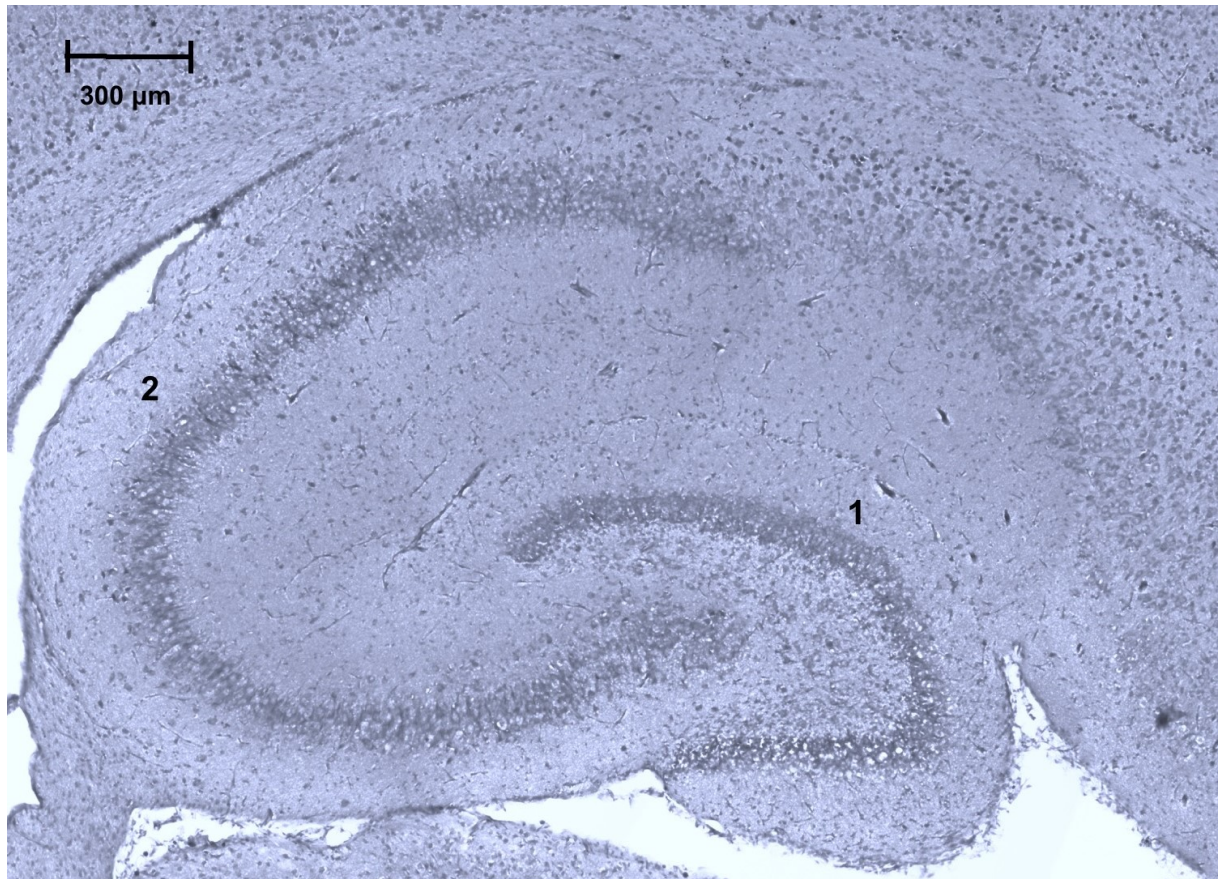
Großhirnbereichen erfordert (6), gibt es für das Lernen – speziell deklarativer und episodischer Inhalte – einen entwicklungsgeschichtlich vorgegebenen anatomischen Weg, der über den Hippocampus führt (3).

Dieser nimmt eine Filterfunktion ein, bevor die Informationen in den Isocortex gelangen (4). Trotz seiner einfachen Struktur als Teil des Allokokortex erfüllt der Hippocampus höhere kognitive Funktionen aus allen Bereichen des deklarativen Gedächtnisses (4). Gleichzeitig verfügt der Hippocampus über eine hohe synaptische Plastizität, die sich durch die Veränderung der Signalübertragung nach wiederholt dargebotenem Reiz äußert (7), sowie über die im menschlichen Nervensystem seltene Fähigkeit zur adulten Neurogenese (6).

Der Neurogenese im Hippocampus, welche vor allem in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus stattfindet, wird unter anderem für die Unterscheidung zwischen neuen und alten Informationen eine Bedeutung zugemessen (6). Ebenso vermutet wird die Erhöhung des erinnerten Detailreichtums durch Neurogenese sowie eine Schlüsselrolle der Neurogenese in der individuellen Evolution des Gedächtnisses (6).

### 1.1.2 Anatomie des Hippocampus

Die erste Beschreibung des Hippocampus erfolgte bereits 1587 durch Arantius, den italienischen Chirurgen und Anatomen, der auch das Foramen ovale sowie den Ductus arteriosus und den Ductus venosus zuerst beschrieb (8). Er war es auch, der den Terminus "Hippocampus" einführte, der auf die einem Seepferdchen ähnliche Erscheinung beim Blick von intraventrikulär verweist.



**Abbildung 1. Horizontalschnitt des Hippocampus eines Versuchstiers (P9–15)**

Nissl-Färbung mit Toluidin-Blau. Eindeck-Medium: Entellan. Anfertigt von Tina Sellmann, Institut für Physiologie, Rostock. 1: Gyrus dentatus; 2: Cornu ammonis

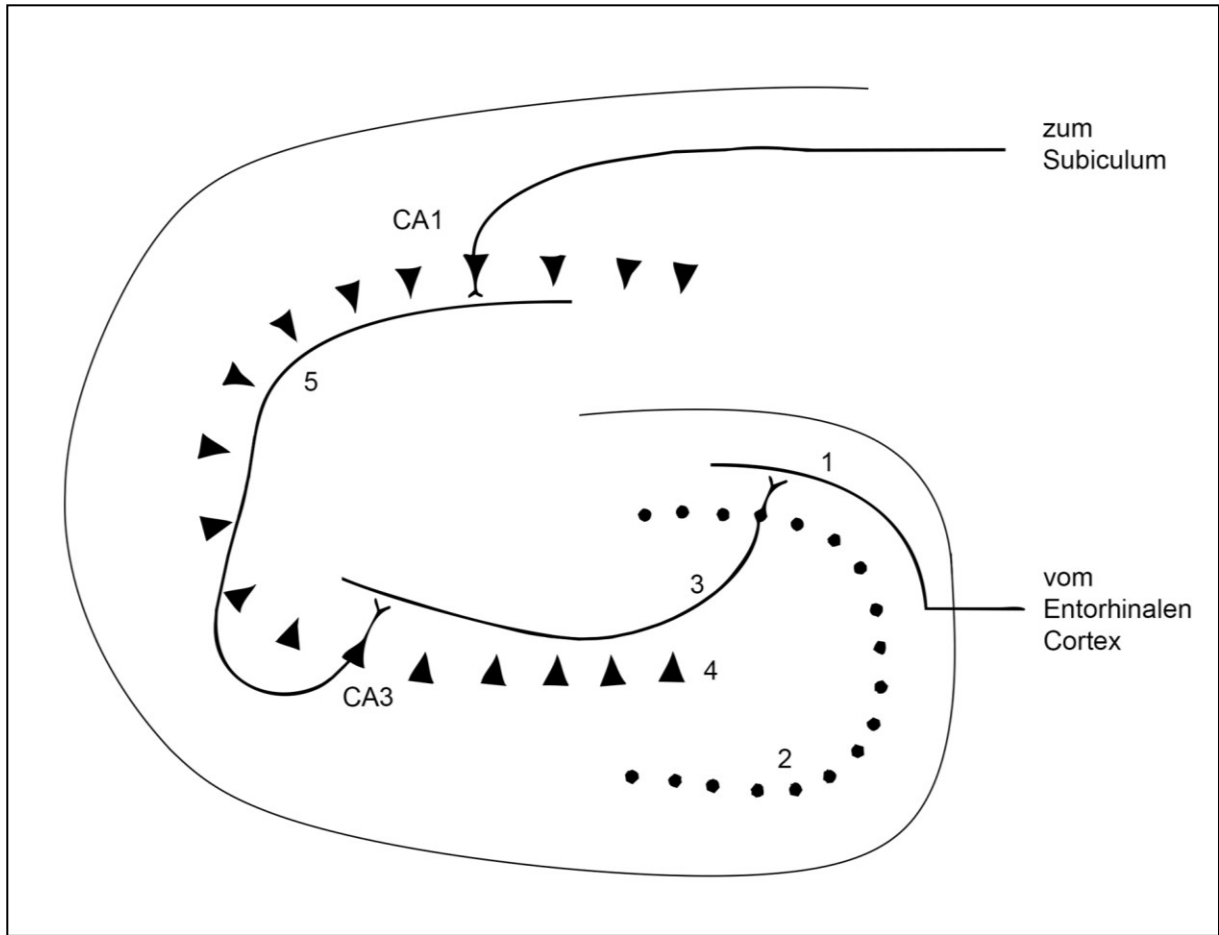
Der Hippocampus besteht aus zwei Anteilen, dem Cornu ammonis (Ammonshorn) und dem Gyrus dentatus (4). Diese liegen zu Beginn der Entwicklung noch nebeneinander, jedoch wölbt sich das Cornu ammonis im Verlauf nach medial ins Ventrikelsystem vor, wodurch der Gyrus dentatus eine konkave Form annimmt. Die beiden Schichten trennen sich und bilden die für den hippocampalen Querschnitt typische Struktur aus zwei U-förmigen, ineinandergreifenden Laminae, getrennt durch den Sulcus hippocampalis. Während der tiefe Anteil des Sulcus hippocampalis in der Entwicklung bald verschwindet, bleibt der oberflächliche Anteil gut sichtbar als Sulcus hippocampalis superficialis (siehe Abbildung 1).

Das Cornu ammonis lässt sich histologisch in vier Schichten einteilen. Das Stratum oriens enthält die Korbzellen, sowie Dendriten der Pyramidenzellen. Die Korbzellen sind die vorherrschenden Interneurone im Hippocampus. Sie kommen verstreut über alle Schichten vor und üben einen inhibitorischen Einfluss auf die Schaltkreise aus. Die Zellkörper der Pyramidenzellen befinden sich im Stratum pyramidale. In Stratum radiatum, Stratum lacunosum und Stratum moleculare findet man sowohl Dendriten als auch Axone der Pyramidenzellen, die hier auch umgeschaltet werden.

Der Gyrus dentatus hingegen besteht histologisch aus drei Schichten. Im Stratum moleculare werden die Axone des Tractus perforans auf die Dendriten der Körnerzellen umgeschaltet. Die Somata der Körnerzellen liegen im Stratum granulosum. Das Stratum multiforme des Gyrus dentatus trennt ihn vom Cornu ammonis und enthält die Axone der Körnerzellen.

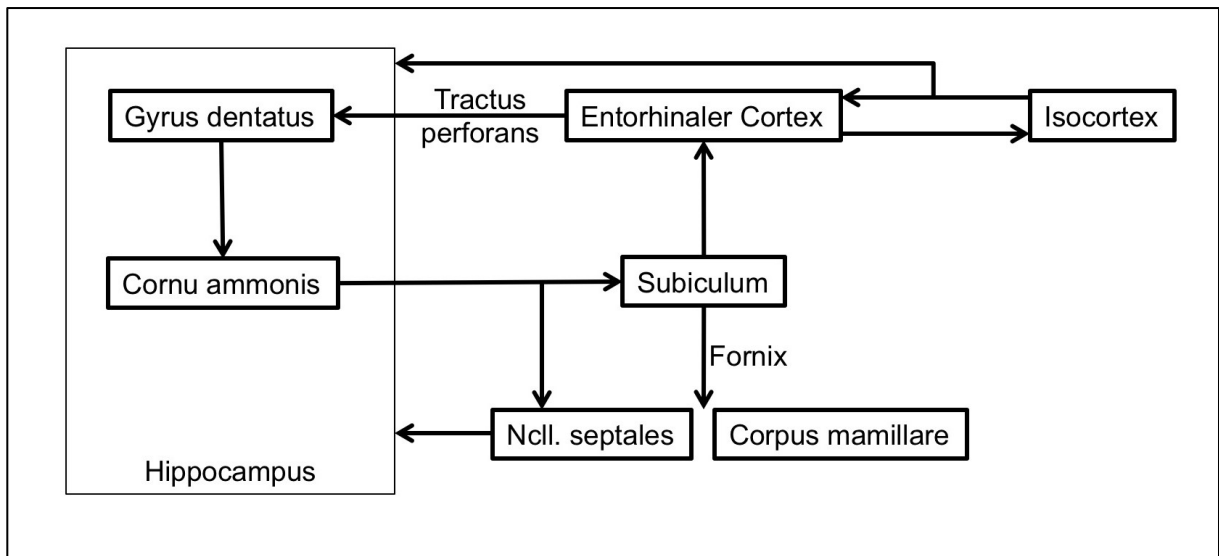
Das Subiculum liegt zwischen Cornu ammonis und entorhinalen Cortex. Es bildet den Ausgang aus dem Hippocampus zum Isocortex und integriert ebenso Afferenzen aus dem Assoziationscortex.

Die Afferenzen des Hippocampus enden zunächst an den Körnerzellen im Stratum granulosum des Gyrus dentatus. Die Körnerzellen projizieren über Moosfasern auf die Pyramidenzellen in der CA3-Region des Stratum pyramidale des Cornu ammonis. Diese Pyramidenzellen wiederum projizieren über die Schaffer-Kollaterale auf die CA1-Region im Stratum pyramidale. Die Axone der Pyramidenzellen aus der CA1-Region enden im Subiculum. Die Axone des Subiculus projizieren über den Fornix entlang der Seitenventrikel zu den Nuclei septales und zum Corpus mamillare. Außerdem gehen von Subiculum und Stratum pyramidale im Sinne einer Rückkopplung Kollaterale zurück zum Entorhinalen Cortex, der diese Signale an den temporalen Assoziationscortex, den Temporalpol und den präfrontalen Cortex weiterleitet (siehe Abbildungen 2, 3).



**Abbildung 2. Der trisynaptische Schaltkreis**

1: Tractus perforans; 2: Stratum granulosum, Gyrus dentatus; 3: Moosfasern; 4: Stratum pyramidale, Cornu ammonis; 5: Schaffer-Kollateralen; CA1: Schicht 1 des Cornu ammonis; CA3: Schicht 3 des Cornu ammonis.



**Abbildung 3. Die Verbindungen des Hippocampus**

Erstellt nach (4).

### 1.1.3 Tractus perforans (*engl. perforant path*)

Die wichtigsten Afferenzen des Hippocampus sind die Axone des Tractus perforans (9). Als Teil des Papez-Kreises projiziert dieser vom entorhinalen Cortex (EC) in den Gyrus dentatus (10).

Zunächst konvergieren isocorticale Fasern im entorhinalen Cortex, von wo aus Axone über den Tractus perforans in den Hippocampus ziehen (9). Der Tractus perforans durchbricht die weiße Substanz des entorhinalen Cortex sowie das Subiculum und tritt so in den Gyrus dentatus ein. Während Lamina III des EC in die CA1-Region projiziert, verlaufen die Axone aus Lamina II zur Region CA3 und eben über den Tractus perforans in den Gyrus dentatus (10).

Im Gyrus dentatus selbst werden viele Teilleistungen des Gedächtnisses erbracht: es werden eingehende Informationen integriert, Muster – vor allem räumliche – erkannt und nach Kontext bewertet (11,12). Ähnliches leistet der Gyrus dentatus für die Erkennung von Gerüchen (13). Diese Leistungen lassen ihm eine wichtige Rolle im Angstverhalten zukommen (14).

Axone aus dem medialen entorhinalen Cortex (MEC) bilden den medialen Tractus perforans (*medial perforant path, MPP*). Axone aus dem lateralen entorhinalen Cortex (LEC) bilden den lateralen Tractus perforans (*lateral perforant path, LPP*). Die Bezeichnungen „medial“ und „lateral“ sind hier als vereinfacht zu betrachten. Tatsächlich liegt der MEC caudomedial, während der LEC rostrolateral zu finden ist (10). Während beide Anteile des Tractus perforans an den Dendriten der Körnerzellen im Gyrus dentatus enden, befinden sich die Synapsen des MPP in der mittleren Molekularschicht und die Synapsen des LPP in der äußeren Molekularschicht (15). Einige Fasern des Tractus perforans ziehen auch weiter in die CA1-Region des Cornu ammonis (16). Elektrophysiologisch erkennt man die Synapsen des MPP an ihrer Doppelpulsdepression: bei zwei gleich starken, schnell aufeinander folgenden, präsynaptischen Strompulsen fällt das zweite postsynaptische Potential kleiner aus als das erste (17). Im LPP hingegen findet man eine Doppelpulsbahnung; das zweite postsynaptische Potential ist größer als das erste (15,18).



## 1.2 Synaptische Plastizität

### 1.2.1 Synaptische Plastizität und Gedächtnis

Ein elektrophysiologisches Modell zur experimentellen Beurteilung der Eigenschaften von Gedächtnis und Lernen ist die synaptische Plastizität, unter welcher man die aktivitätsabhängige Anpassung der synaptischen Übertragung versteht. Eine experimentelle Messgröße dieser Anpassung ist die Langzeitpotenzierung (engl. *long term potentiation, LTP*) (19). LTP bedeutet die Steigerung des elektrischen Signals an einer chemischen Synapse. Diese Steigerung kann Minuten bis Monate anhalten und entsteht infolge von Umbauprozessen an der Synapse, welche durch natürliche Aktivität oder verschiedene Reizprotokolle induziert werden können.

Analog zur Langzeitpotenzierung kann man in vielen Experimenten eine Langzeitdepression beobachten (engl. *long term depression, LTD*) (20). Die LTD ist gekennzeichnet durch eine Verringerung des elektrischen Signals einer Synapse.

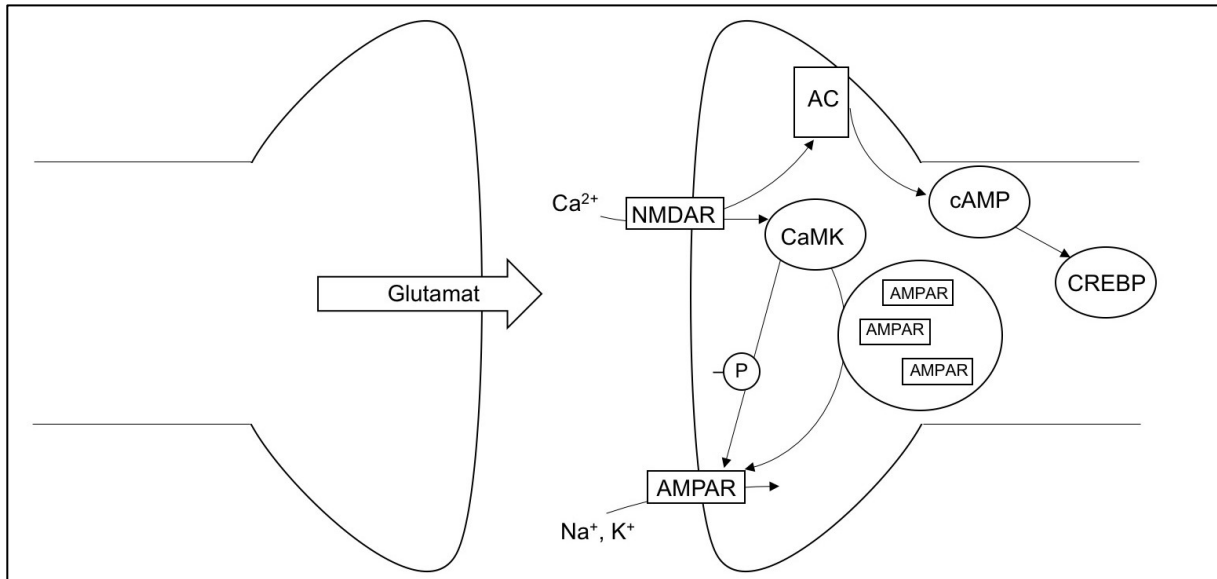
Seit den ersten Beschreibungen der LTP geht man davon aus, dass sie ein elektrophysiologische Korrelat von Lernen und Gedächtnis darstellt (21,22). Bereits 1949 postulierte Donald Hebb, dass der Lernprozess zu einem Umbau der Neurone führe, den man auch an einzelnen Synapsen beobachten könne (23,24). Und tatsächlich konnte gezeigt werden, dass beim Lernprozess *in vivo* ebenfalls eine LTP auftritt (19). Nichtsdestotrotz bleibt die LTP nur ein Teil der messbaren Repräsentation der Gedächtnisleistung, welche ein komplexes Zusammenspiel von vielen anatomischen Regionen und physiologischen Prozessen ist (25).

### 1.2.2 Mechanismen der Langzeitpotenzierung

Trifft ein Aktionspotential oder ein überschwelliger elektrischer Reiz auf die präsynaptische Membran, so schüttet diese, vermittelt durch einen Calcium-Einstrom, ihre Neurotransmitter in den synaptischen Spalt aus (26). Diese Neurotransmitter binden unter anderem an ionotrope postsynaptische Rezeptoren, infolgedessen Ionen-Kanäle öffnen, sodass entweder ein exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) oder ein inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP) entsteht. Die Summe dieser Potentiale wird am Axonhügel integriert, was das Auslösen eines neuen Aktionspotentials zur Folge haben kann.

Man kann drei Phasen der LTP beobachten: die Induktion, die Transduktion und die Expression (25). Die Induktion beschreibt die Mechanismen, die eine LTP auslösen.

Als Transduktion werden die Signalkaskaden bezeichnet, die schließlich zur messbaren Expression der LTP führen. Zur Induktion der LTP wurden zunächst Hochfrequenz-Stimulationen (HFS) eingesetzt (21). Der  $\theta$ -Rhythmus, der auch bei der lernenden Ratte *in vivo* auftritt, wurde auch erfolgreich zur LTP-Induktion angewendet (*engl. theta-burst stimulation, TBS*) (27–29). Ebenso wurde eine LTP-Induktion durch Hochfrequenz-Magnetstimulation beschrieben (30). Die Induktion der LTP ist vor allem von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR) abhängig (25,31) (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4. Das Standardmodell der Langzeitpotenzierung**

NMDAR: NMDA-Rezeptor; CaMK: Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Protein-Kinase; AMPAR: AMPA-Rezeptor; AC: Adenylatcyclase; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; CREBP: *engl. cAMP responsive element binding protein*. Erstellt nach (25,32).

Wird Glutamat in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, so sind es in erster Linie  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionsäure-Rezeptoren (*engl.  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors, AMPAR*), die hierdurch aktiviert werden und das chemische Signal in ein EPSP umwandeln (26), während die NMDA-Rezeptoren im physiologischen Grundzustand größtenteils durch Magnesium blockiert sind (33,34). Wird durch HFS oder TBS eine LTP induziert, summieren sich die EPSPs der AMPA-Rezeptoren räumlich und zeitlich. Zusammen mit der Anreicherung von extrazellulären Kalium im synaptischen Spalt und der Auto-Inhibition der GABAergen Ströme wird so der Magnesium-Block der NMDA-Rezeptoren gelöst, Glutamat kann an diese binden und es entstehen EPSPs, welche sich wiederum räumlich und zeitlich summieren (32).

Nach Auflösung des Magnesium-Blocks können Natrium, Kalium und Calcium die Ionenpore des NMDAR passieren, wobei die elektrochemische Triebkraft von Calcium in die Zelle am höchsten ist (26). Durch den Calcium-Einstrom wird die intrazelluläre

Signalkaskade in Gang gesetzt, die zur Ausbildung der LTP führt und die Phase der Transduktion darstellt (25,26).

Ist der Einstrom von Calcium in die Nervenzelle groß genug, führt die erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration zur Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Protein-Kinase II (CaMKII) (35). Die CaMKII phosphoryliert daraufhin die GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors, wodurch dessen Leitfähigkeit um bis zu 50% erhöht wird (35,36). Zur Expression der LTP gehört auch die erhöhte Dichte von AMPA-Rezeptoren (37). Obwohl noch nicht abschließend geklärt ist, wie diese Dichte reguliert wird (26), stehen in bisherigen Untersuchungen zwei Mechanismen im Vordergrund: Der Einbau sowie die Verankerung von AMPA-Rezeptoren (35). Es existieren weitere Proteinkinasen, die durch Regulation der Funktion einzelner Proteine zur LTP beitragen, so zum Beispiel die Proteinkinase A, die Proteinkinase C oder auch Tyrosin-Kinasen (26). Ebenso ist bekannt, dass das CREB-Protein (*engl. cAMP responsive element binding protein*) durch Regulation der Genexpression zum anhaltenden Effekt der LTP beiträgt (38). All diese molekularen Umbauprozesse führen zu einer Zunahme sowohl von Volumen als auch Oberfläche der postsynaptischen Membran (26,39–41).

Während sich die bis hierher beschriebenen Prozesse auf die postsynaptische Membran beschränken, gibt es auch präsynaptische Mechanismen, die zur Expression der LTP führen oder beitragen (40,41). So existieren Nachweise über erhöhte Ausschüttung von Neurotransmittern (42,43) bei gleichzeitig fehlenden Veränderungen an der postsynaptischen Membran (44). Zur Differenzierung von prä- und postsynaptischen Prozessen eignet sich die Analyse des Doppelpulsverhältnisses (*engl. paired pulse ratio, PPR*) (45). Besteht an einer chemischen Synapse eine hohe Freisetzungswahrscheinlichkeit für die Neurotransmitter, werden durch eine präsynaptische Depolarisation so viele Vesikel freigesetzt, dass bei einer kurz darauffolgenden Depolarisation noch nicht genügend Vesikel wiederaufgenommen sind, um eine gleich große Depolarisation an der postsynaptischen Membran hervorzurufen. Es kommt zur Doppelpulsdepression. Umgekehrtes gilt für eine niedrige Freisetzungswahrscheinlichkeit der Neurotransmitter. Findet nun eine präsynaptische LTP-Expression statt, so muss es mit Änderung der Freisetzungswahrscheinlichkeit auch zu einer Änderung des Doppelpulsverhältnisses (PPR) kommen (46,47).

Eine Modulation der präsynaptischen Membran im Rahmen der LTP erfordert die Kommunikation von der post- zur präsynaptischen Membran in Form eines retrograden Signalwegs (26,32,40,41). Ein Molekül, das durch seine Eigenschaften als retrogrades Signal in Frage käme, ist Stickstoffmonoxid (NO) (41). Es ist schnell synthetisierbar (48) und ebenso in der Lage, durch Diffusion von der post- zur präsynaptischen Membran zu gelangen (49).

### 1.3 Stickstoffmonoxid

Hauptsächlich bekannt durch seine Rolle in der Relaxation des glatten Muskels (50), wird seit über 25 Jahren die vielgestaltige Wirkung von Stickstoffmonoxid (NO) als interneuronaler Botenstoff untersucht (51–53). Während die Funktion und Regulation des NO-Stoffwechsels im glatten Muskel bereits vielfach beschrieben wurde und schon therapeutische Anwendung findet (54), stellt sich die Signalgebung von NO im zentralen Nervensystem noch nicht vollständig dar.

#### 1.3.1 Die Signalkaskade von Stickstoffmonoxid

NO wird von verschiedenen Isoformen der NO-Synthase (NOS) intrazellulär gebildet, namentlich der neuronalen NO-Synthase (nNOS) sowie der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) (2). All diese Enzyme synthetisieren NO aus L-Arginin, mit dem Nebenprodukt Citrullin (48). Während die iNOS hauptsächlich in Zellen des Immunsystems aktiv ist, besitzt die eNOS eine wichtige Funktion im Gefäßsystem (2). Die nNOS hingegen wurde schon oft mit der Homöostase des ZNS in Verbindung gebracht (55). Zu beachten ist hierbei, dass NO in einem Radius von 700 nm auf ein Zehntel seiner Ausgangskonzentration abfällt (56). Die NO-Rezeptoren sind bei einer Konzentration von 10 nM gesättigt (57).

Der einzige bislang nachgewiesene Rezeptor von NO ist die lösliche Guanylatcyclase (*engl. soluble guanylyl cyclase, sGC*) (58). Diese weist eine ähnliche Verbreitung im ZNS auf wie die nNOS, was für gemeinsame Mechanismen der beiden Enzyme spricht (2). Die sGC bildet aus intrazellulärem Guanosin triphosphat (GTP) cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) (58). cGMP beeinflusst durch Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) eine große Menge an Zellfunktionen (55). Weitere Ziele der Signalkaskaden von Stickstoffmonoxid sind CNG-Kanäle (*engl. cyclic nucleotide gated channels, CNG channels*) und HCN-Kanäle (*engl. hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated non-selective ion channels, HCN channels*) (2).

### **1.3.2 Stickstoffmonoxid und synaptische Plastizität**

Da die NOS durch den Calcium/Calmodulin-Komplex (CaM) als auch durch die CaM-Kinase stimuliert wird (2,48), wurde schon früh nach der Entdeckung von NO als EDRF (*engl. endothelial-derived relaxing factor*) dessen Rolle als interzellulärer Botenstoff im ZNS untersucht (59). Unter anderem zeigten experimentelle Untersuchungen, dass die Synthese von NO durch den Calcium-Einstrom an den NMDA-Rezeptoren stimuliert wird (2,59,60). Ebenso ermöglicht NO die altersabhängige Expression der LTP im Experiment mit hippocampalen Neuronen (61–64). Die NO-Synthese findet hierbei in den postsynaptischen Dendriten statt, während die cGMP-vermittelte Wirkung präsynaptisch erfolgt. Hierfür sprechen auch Experimente, bei denen eine Änderung der PPR beobachtet wurde (47). Eine dieser retrograden Wirkungen auf die präsynaptische Membran ist die Regulation der Endozytose von Neurotransmittern (60). Ebenso wurde die Beeinflussung der Glutamat-Freisetzung im Hippocampus durch präsynaptisch gebildetes NO und eine daraus folgende Modulation von HCN-Kanälen beobachtet (65). Weiterhin wird der Einbau postsynaptischer AMPA-Rezeptoren vermutlich auch durch die NO-vermittelte Aktivität der PKG reguliert (66,67).

Die Zusammenschau dieser Ergebnisse zeigt, dass postsynaptisch gebildetes NO auf beiden Seiten der Synapse zur Expression der LTP beiträgt und somit eine Funktion bei der Regulation der synaptischen Plastizität innehaben könnte (2,55).

Da die HCN-Kanäle von allen cyclischen Nucleotiden moduliert werden (68), sind sie ein möglicher Effektor des NO/cGMP-Signalweges im ZNS (65,69).

## 1.4 HCN-Kanäle

Der Strom über HCN-Kanäle wurde bereits vor 40 Jahren erstmals beschrieben (70). Die Kanäle selbst wurden erst in den 1990er Jahren identifiziert (71,72) und haben durch ihre Funktion als Schrittmacher des Herzens im Sinusknoten eine wichtige Rolle in der medizinischen Pharmakotherapie. Da sie über die cyclischen Nucleotide gesteuert werden (69), sind die HCN-Kanäle durch die Stoffwechselsituation ihrer Zelle beeinflusst. Während im Sinusknoten die Aktivierung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren über einen cAMP-Anstieg die HCN-Kanäle aktiviert und so die Herzfrequenz steigert (68), wird zunehmend die Bedeutung des NO/cGMP-Signalwegs für die Funktion der Kanäle deutlich (2,46,65,68,73).

HCN-Kanäle finden sich auch im gesamten ZNS, wobei vor allem die Isoform HCN2 vorliegt, während HCN1 und HCN4 vermehrt in Neocortex, Hippocampus, Cerebellum und Hirnstamm vorkommen und HCN3 nur gering exprimiert wird (69,71). Auch im peripheren vegetativen Nervensystem wurden HCN-Kanäle nachgewiesen (74).

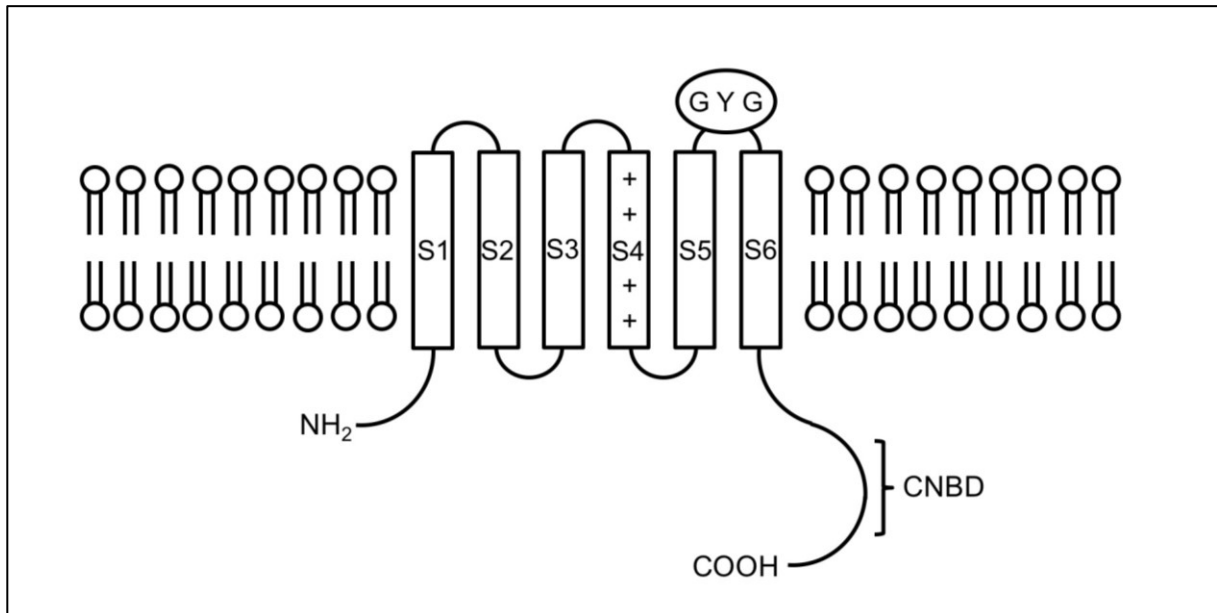
HCN-Kanäle wurden direkt mit der Entstehung des neuropathischen Schmerzes (75) und der Pathophysiologie der Epilepsie in Verbindung gebracht (76). Allerdings besitzt der Strom  $I_h$  über die HCN-Kanäle je nach Lokalisation sowohl epileptogene, als auch anti-epileptogene Eigenschaften (69,77,78). Ebenso wurde ein verringerter  $I_h$  beim Morbus Parkinson infolge des Dopamin-Mangels im Globus pallidus externus beobachtet (79). Anatomische Untersuchungen legen nahe, dass insbesondere präsynaptische HCN-Kanäle im Gyrus dentatus am medialen Tractus perforans zur Reifung der dortigen Körnerzell-Synapsen beitragen (15).

Ihre besondere Struktur lässt die HCN-Kanäle also vielfältige Funktionen im gesamten ZNS übernehmen, was im Folgenden dargestellt werden soll.

### 1.4.1 Struktur und Funktion der HCN-Kanäle

Wie in ihrem Namen festgehalten, sind die *hyperpolarization activated, cyclic nucleotide gated, non-selective ion channels* (HCN-Kanäle) spannungsgesteuerte Ionenkanäle (80). Sie bestehen aus 4 Untereinheiten mit je 6 Transmembranhelices (S1–6) und ähneln damit vielen anderen spannungsgesteuerten Kanälen (69). Die Ionenpore der Kanäle wird auch hier durch die Segmente S5 und S6 der vier Untereinheiten gebildet, wobei Segment S4 als Spannungssensor fungiert (71) (siehe Abbildung 5). Während in anderen Kanälen die Ionenpore durch dieses Segment bei

Hyperpolarisation verschlossen wird, ist in HCN-Kanälen das Gegenteil der Fall (81). Aus genau diesem Grund wurde der Strom  $I_h$  zunächst als „funny current“ bezeichnet (82), und auch der jetzt etablierte Name für die Kanäle trägt dieser Tatsache Rechnung.



**Abbildung 5. Struktur einer Untereinheit des HCN-Kanals**

Eine Untereinheit besteht aus den Segmenten S1-6. S5 und S6 bilden die Ionenpore. Das positiv geladene Segment S4 bildet den Spannungssensor. Die C-Terminale beinhaltet die cyclische Nucleotide bindende Domäne (engl. *cyclic nucleotide binding domain*, CNBD). GYG: Glycin-Tyrosin-Glycin-Motiv. Modifiziert nach (69).

Aufgrund ihres Glycin-Tyrosin-Glycin-Motivs (GYG) lassen die HCN-Kanäle bevorzugt Kalium-Ionen durch die Kanalpore passieren, allerdings wurde auch der Durchstrom von Calcium- und Natrium-Ionen nachgewiesen (71). HCN-Kanäle sind also nicht-selektive Kationen-Kanäle. Da unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich der Einwärtsstrom von Natrium-Ionen zum  $I_h$  beiträgt, führt die Aktivierung der Kanäle zur Depolarisation der Zellmembran (72). Durch Depolarisation werden die HCN-Kanäle hingegen geschlossen (68).

Im Zusammenspiel mit der Aktivierung durch Hyperpolarisation erklärt sich, dass HCN-Kanäle sowohl rhythmische Entladungen einer Zelle vermitteln als auch das Ruhemembranpotential einer Zelle stabilisieren können (69,71).

Die HCN-Kanäle werden wie viele andere Proteine durch cyclische Nucleotide reguliert (72). Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) steigern beide den  $I_h$  (68), wobei die Affinität von cAMP zur CNB-Domäne etwa 10-fach höher ist (82). Die Proteinkinase C und die

cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGKII) haben dagegen einen inhibitorischen Effekt auf den  $I_h$  (69).

Im Sinusknoten des Herzens kommen die oben beschriebenen Eigenschaften der HCN-Kanäle voll zum Tragen. Dort ist der  $I_h$  die entscheidende Komponente zur rhythmischen Generierung von Aktionspotentialen (71). So kann das vegetative Nervensystem über  $\beta$ -Adrenozeptoren die Herzfrequenz steigern, indem diese die Adenylatcyclase (AC) aktivieren und den cAMP-Spiegel erhöhen (83). Durch die Aktivierung muskarinerner Acetylcholin-Rezeptoren hingegen kann der  $I_h$  gehemmt werden (84), was entsprechend die Herzfrequenz senkt.

Auch in der Genese thalamokortikaler Rhythmen, wie sie während Schlafphasen, epileptischen Anfällen und der Verarbeitung sensorischer Informationen auftreten (85–87), spielen HCN-Kanäle durch ihre Fähigkeit zur Generierung wiederkehrender Entladungen eine wichtige Rolle (68,69,88). Gerade die vom Thalamus in den Cortex ziehenden  $\delta$ -Wellen, die charakteristisch für die späten Schlafphasen sind, werden von HCN-Kanälen generiert (88). Aber auch  $\gamma$ - und  $\theta$ -Rhythmus sind von HCN-Kanälen abhängig (68). Die thalamokortikalen Rhythmen gehen zurück auf synchronisierte Entladungen der thalamischen Neurone, die *bursts* (engl. Salven) genannt werden (89). Es wurde bereits gezeigt, dass der NO/cGMP-Signalweg die thalamokortikalen Rhythmen reguliert, wobei als Effektor der  $I_h$  vermutet wird (90).

Auch im Arbeitsgedächtnis wird den HCN-Kanälen eine wichtige Funktion zugeschrieben, die darin bestehen könnte, durch Unterbrechung bestimmter Synapsen die Aktivität spezifischer präfrontaler Neurone gezielt zu fördern (71,91). Hier wird eine Regulierung der Kanäle durch D1-Dopamin-Rezeptoren und  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptoren vermutet (91).

HCN-Kanäle können als Hochpassfilter wirken, da ihr Strom bei niedriger Eingangsfrequenz der Potentialänderung entgegenwirkt, aber bei erhöhter Eingangsfrequenz nicht mehr aktiviert wird (71,92). Gleichzeitig entsteht durch die Membranzeitkonstante ein Tiefpassfilter (71,86,93). Dadurch können Synapsen und neuronale Netzwerke eine Eigenfrequenz erhalten (68).

Indem sie die integrative Funktion cerebellärer Purkinje-Zellen gewährleisten, üben die HCN-Kanäle auch eine entscheidende Funktion im motorischen Gedächtnis aus. So konnte an Versuchstieren, denen das Gen für HCN1-Kanäle fehlte, gezeigt werden, dass der  $I_h$  unabdingbar für das Lernen motorischer Abläufe ist (94).



Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist auch der Einfluss präsynaptischer HCN-Kanäle auf die Eigenschaften der Synapse. Obwohl die Art und Weise noch nicht geklärt ist, wird ein modulierender Einfluss des  $I_h$  auf die Vesikelfreisetzung aus der präsynaptischen Membran angenommen (71), der teilweise durch cAMP reguliert wird (95).

#### **1.4.2 HCN-Kanäle und synaptische Plastizität**

Wie viele andere hippocampale Prozesse wurde der Zusammenhang zwischen HCN-Kanälen und synaptischer Plastizität hauptsächlich in der CA1-Region des Cornu ammonis untersucht. So konnte dort gezeigt werden, dass präsynaptische HCN-Kanäle der Schaffer-Kollateralen die Glutamat-Freisetzung aus der präsynaptischen Membran modulieren, während sie selbst durch den NO/cGMP-Signalweg reguliert werden (65). Ebenso wurde gezeigt, dass postsynaptische HCN-Kanäle NO/cGMP-abhängig den Strom über die NMDA-Rezeptoren erhöhen (73). Beides sind Prozesse, die eine wichtige Funktion bei der Expression der Langzeitpotenzierung (LTP) einnehmen (siehe Kapitel 1.2).

Während unter anderem in Tieren ohne HCN1-Gen eine Verstärkung der LTP in der CA1-Region gefunden wurde (71), konnte an Moosfasern kein Effekt der HCN-Kanäle auf die synaptische Plastizität nachgewiesen werden (96). Weiterhin wurde im Cortex eine Verringerung der Glutamat-Freisetzung durch HCN-Kanäle beobachtet (97). Im Hippocampus hingegen wurde eine Verringerung der LTD durch HCN-Kanäle in der CA1-Region (20) und am medialen Tractus perforans (98) gefunden.

All dies spricht dafür, dass die Funktion der HCN-Kanäle stark von ihrer Lokalisation und den exprimierenden Neuronen abhängt (69). So spielen HCN-Kanäle unter anderem in der CA3-Region des Hippocampus eine wichtige Rolle bei der Synchronisation sich entwickelnder neuronaler Netzwerke (99).

An den Körnerzell-Synapsen des medialen Tractus perforans im Gyrus dentatus konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Expression der HCN1-Kanäle 1) präsynaptisch erfolgt und 2) ab dem 15. postnatalen Tag abnimmt (15). Damit liegt die Vermutung nahe, dass der Strom  $I_h$  eine physiologische Funktion während der Reifung des Gyrus dentatus einnimmt.

## 1.5 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll mit Hilfe elektrophysiologischer Experimente der Einfluss von Stickstoffmonoxid und HCN-Kanälen auf die synaptische Plastizität untersucht werden.

Die altersabhängige Expression der HCN-Kanäle an den Endigungen des medialen Tractus perforans (15) legt eine funktionelle Bedeutung dieser Kanäle in der Reifung des Hippocampus nahe. Die synaptische Plastizität als elektrophysiologisches Korrelat von Lernen und Gedächtnis stellt ein besonders vielversprechendes Modell zur Untersuchung dieser Funktion dar. Dass diese Prozesse durch den NO/cGMP-Signalweg vermittelt werden, ist angesichts der bereits beschriebenen Zusammenhänge (siehe Kapitel 1.3 und 1.4) anzunehmen, konnte aber bislang nicht experimentell bestätigt werden. Zusammengefasst ergeben sich folgende Fragestellungen zur LTP an den Körnerzell-Synapsen des MPP:

1. Ist die Expression der LTP von der NO-Synthase abhängig?
2. Gibt es eine Altersabhängigkeit dieses Effekts?
3. Vermittelt NO seine Wirkung über die Synthese von cGMP?
4. Sind HCN-Kanäle ein Effektor des NO/cGMP-Signalweges?
5. Finden diese Prozesse prä- oder postsynaptisch statt?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Zur Untersuchung der Fragestellungen wurden Ratten des Stammes CD (Charles River/ Janvier Labs) genutzt. Diese Tiere waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen 9–15 Tage alt (9–15 Tage postnatal, P9–15). Vom Zeitpunkt der Anlieferung im Alter von 5 Tagen bis zur experimentellen Untersuchung blieben die ausschließlich männlichen Versuchstiere bei ihrem Muttertier. Dieses wurde im Institut für Physiologie gehalten, mit ständigem Zugang zu Futter und Wasser. Die Temperatur im Tierstall lag durchgehend bei 22 °C, während die Beleuchtung einem automatischen Tag-Nacht-Rhythmus unterlag, mit je 12-stündigen Phasen.

Ebenso wurden für einige Versuchsgruppen adulte Tiere des gleichen Stammes verwendet (P30–150).

### 2.2 Materialien, Geräte und Software

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Herstellersitz</i>
Analog-Digital-Wandler Micro1401 mk II	Cambridge Electronic Design	Cambridge, England
Arbeitsplatzrechner mit Windows XP	Dell	Round Rock, TX, USA
Diethylether J.T. Baker	Avantor Materials	Center Valley, PA, USA
Excel 2010	Microsoft	Redmond, WA, USA
Faraday'scher Käfig	Eigenbau Institut für Physiologie	Rostock, Deutschland
Filterpapier MN 615	Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Glaspipetten GB 150-8P	Scientific Instruments	Gilching, Deutschland
Intrafix® SafeSet	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Kaltlichtquelle KL-1500	Schott	Mainz, Deutschland
Magnetrührer IKAMAG RET-GS	IKA-Labortechnik	Staufen, Deutschland
Messkammer BSC-BU	Harvard Apparatus	Holliston, MA, USA
Mikromanipulator LBM-7	Scientifica	Uckfield, England
Mikroskop MZ-6	Leica	Wetzlar, Deutschland
Omnifix	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Osmomat 030	Gonotec	Berlin, Deutschland

Peristaltische Pumpe Perimax 12	Spetec	Erding, Deutschland
pH-Meter CG 840	Schott	Mainz, Deutschland
Pipette 10 µl bis 100 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipette 100 µl bis 1000 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Pipettenzieher PIP 5	Heka	Lambrecht/Pfalz, Deutschland
Reinstwassersystem Purelab Ultra	Elga Labwater	Celle, Deutschland
Schwingungsgedämpfter Tisch Linos 63-530	TMC	Peabody, MA, USA
Sekundenkleber	Uhu	Bühl/Baden, Deutschland
SigmaStat 3.5	Systat Software	Erkrath, Deutschland
Signal 2.16	Cambridge Electronic Design	Cambridge, England
Silberdraht 0,005 Zoll	Science Products	Hofheim, Deutschland
Skalpell Nr. 10	Dahlhausen	Halberstadt, Deutschland
Spritze Injekt®	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Spritzenaufsatz MF28G-5	World Precision Instruments	Sarasota, FL, USA
Stimulus-Generator Master-8	A.M.P.I.	Jerusalem, Israel
Stimulus-Isolator A-365	World Precision Instruments	Sarasota, FL, USA
Thermostat Haake C10	PLS Systemtechnik	Osterode, Deutschland
Thermostat TC-10	npi Electronic Instruments	Tamm, Deutschland
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Transportgefäß	Eigenbau Institut für Physiologie	Rostock, Deutschland
Vacuum Waste Kit	Scientific Instruments	Gilching, Deutschland
Verstärker mit Frequenzfilter DPA-2FX	npi Electronic Instruments	Tamm, Deutschland
Vibratom 7000 smz	Campden Instruments	Loughborough, England
Vorverstärker EXT-08	npi Electronic Instruments	Tamm, Deutschland
Waage A 120 S	Sartorius	Göttingen, Deutschland

## 2.3 Präparation

Zur Hirnentnahme wurden die Tiere in tiefer Narkose mit Diethylether durch Dekapitation getötet. Sodann erfolgten alle Präparationsschritte in Saccharose-Lösung (siehe Kapitel 2.4). Diese blieb zur Kühlung des Hirns teilweise gefroren und wurde beständig mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast.

Durch einen Medianschnitt mit einem Skalpell wurde die Kopfhaut durchtrennt. Anschließend erfolgten mit einer Schere ausgehend vom Foramen magnum ein Medianschnitt entlang der Pfeilnaht des Schädels sowie zwei Horizontalschnitte durch den Schädel. Mit einer Pinzette wurde anschließend die Schädelkalotte beidseits von medial angehoben und nach lateral aufgeklappt, wodurch das Hirn freigelegt wurde. Das Hirn wurde dann mithilfe eines gebogenen Spatels aus der eröffneten Schädelhöhle herausgekippt, wobei die Nn. olfactorii und der Hirnstamm abgetrennt wurden. Hierdurch gelangte es in eine weitere Petrischale aus Plastik mit Gelboden, welche mit ihrem eigenen Eis versetzte und mit Carbogen begaste Saccharose-Lösung beinhaltete. Vor dem Transfer auf das Vibratom wurde das Cerebellum abgetrennt.

Aus dem Hirn wurden mittels eines Vibratoms 415 µm dicke Horizontalschnitte des Hippocampus hergestellt. Hierzu wurde das Hirn mit seiner Unterseite nach oben auf den Schlitten des Vibratoms geklebt, sodass sich der Hippocampus nächstmöglich zur Klinge befand. Die horizontale Auslenkung des Vibratoms betrug 0,75 mm bei einer Frequenz von 100 Hz. Der Vortrieb der Klinge betrug 0,06 – 0,10 mm/s. Vor der Präparation wurde mittels der „Blade Alignment“-Funktion des Vibratoms die vertikale Auslenkung der Klinge auf  $\leq 1$  µm kalibriert. Aus der Schnittebene wurde mit der Längsseite einer Spritzenkanüle der Hippocampus mit umgebendem Gewebe abgetrennt. Hierzu wurde die Klinge nochmals um 15 µm angehoben, um die darunterliegende Gewebeschicht nicht zu beschädigen. Die so hergestellten Schnitte wurden mittels einer Transferpipette in ein Transportgefäß überführt und anschließend für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur in Saccharose-Lösung gelagert, welche weiterhin beständig mit Carbogen begast wurde.

Bei all diesen Schritten wurde stark darauf geachtet, das Hirn nicht durch Druck, Zug oder scharfe Kanten zu beschädigen, was zum Untergang auch hippocampaler Neurone geführt hätte. Ebenso wurde die Präparation rasch durchgeführt, da die

Neurone von der Dekapitation bis zur finalen Herstellung der Schnitte der ständigen Gefahr der Hypoxie ausgesetzt waren.

## 2.4 Lösungen

Die Lösungen wurden im Institut für Physiologie hergestellt und anschließend für maximal zwei Wochen bis zur Verwendung im Experiment bei 6 °C aufbewahrt. Der pH wurde mit NaOH eingestellt.

Zur Herstellung der Lösung wurde destilliertes Wasser verwendet, in das unter beständiger Begasung mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) die Chemikalien gegeben wurden, nachdem mittels einer Waage die entsprechende Menge bestimmt wurde. Die Lösung wurde unter beständigem Durchmischen mit einem Magnetrührer angefertigt.

Da der pH dieser Lösungen unter anderem durch Phosphat, vor allem aber durch Bikarbonat gepuffert wurde, war sowohl bei der Herstellung der Lösung als auch bei der Durchführung von Präparation und Experimenten auf eine ständige Begasung der Lösung mit Carbogen zu achten, sodass der Bikarbonat-Puffer immer gesättigt war.

### 2.4.1 Artifiziereller Liquor (*engl. artificial cerebrospinal fluid, ACSF*)

<i>Stoff</i>	<i>Konzentration in mM</i>	<i>Hersteller</i>
NaCl	124,5	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
NaHCO <sub>3</sub>	26	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
KCl	3	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	Sigma-Aldrich (München, Deutschland) / Merck (Darmstadt, Deutschland)
CaCl <sub>2</sub>	2,5	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
MgCl <sub>2</sub>	1,3	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Glucose	10	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

pH = 7,40      Osmolalität: 304 – 312 mosmol/kg

## 2.4.2 Saccharose-Lösung

<i>Stoff</i>	<i>Konzentration in mM</i>	<i>Hersteller</i>
NaCl	87	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
NaHCO <sub>3</sub>	25	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
KCl	2,5	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	Sigma-Aldrich (München, Deutschland) / Merck (Darmstadt, Deutschland)
CaCl <sub>2</sub>	0,5	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
MgCl <sub>2</sub>	7	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Glucose	10	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Saccharose	75	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

pH = 7,40 Osmolalität: 320 – 330 mosmol/kg

## 2.5 Pharmakologie

Ein Inhibitor der HCN-Kanäle ist 4-Ethylphenylamino-1,2-Dimethyl-6-Methylaminopyrimidinium-Chlorid (ZD7288) (100), welches eine irreversible Blockade der Kanäle hervorruft (101). Nichtsdestotrotz wird auch diskutiert, ob ZD7288 durch die Blockade von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen (102) oder Glutamat-Rezeptoren (103) Effekte vermittelt, die nicht auf die Blockade der HCN-Kanäle zurückgehen.

Um die Modulation der HCN-Kanäle durch cyclische Nucleotide zu untersuchen, können Analoga wie 8-Bromoguanosin-3',5'-Cyclomonophosphat (8-Br-cGMP) eingesetzt werden (104). 8-Br-cGMP ist membrangängig und kann daher über die ACSF-Lösung appliziert werden (104).

Gabazin ist ein GABA-Rezeptor-Antagonist, durch dessen Applikation die Kontamination der Messung durch lokale GABAerge Netzwerke verhindert wurde (98,105).

Ein unspezifischer Inhibitor der NO-Synthase ist NG-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME) (106,107). Für die neuronale NOS beträgt die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) 70 µM (107).

### 2.5.1 Aliquotierung

Alle Lagerungsempfehlungen der Hersteller wurden befolgt. Die Pharmaka wurden vor der Benutzung im Experiment in destilliertem Wasser gelöst und bei  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren gelagert.

<i>Pharmakon</i>	<i>Konzentration im Aliquot (mM)</i>	<i>Volumen des Aliquot (<math>\mu\text{l}</math>)</i>
Gabazin	10	50
L-NAME	100	500
8-Br-cGMP	100	250
ZD7288	10	500

### 2.5.2 Hersteller und Endkonzentrationen

<i>Pharmakon</i>	<i>Konzentration im ACSF (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>Hersteller</i>
Gabazin (SR 95531)	1	Tocris (Bristol, England) / Abcam (Cambridge, England)
L-NAME	100	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
8-Br-cGMP	50	Tocris (Bristol, England) / Abcam (Cambridge, England)
ZD7288	10	Tocris (Bristol, England)

### 2.5.3 Badapplikation der Pharmaka

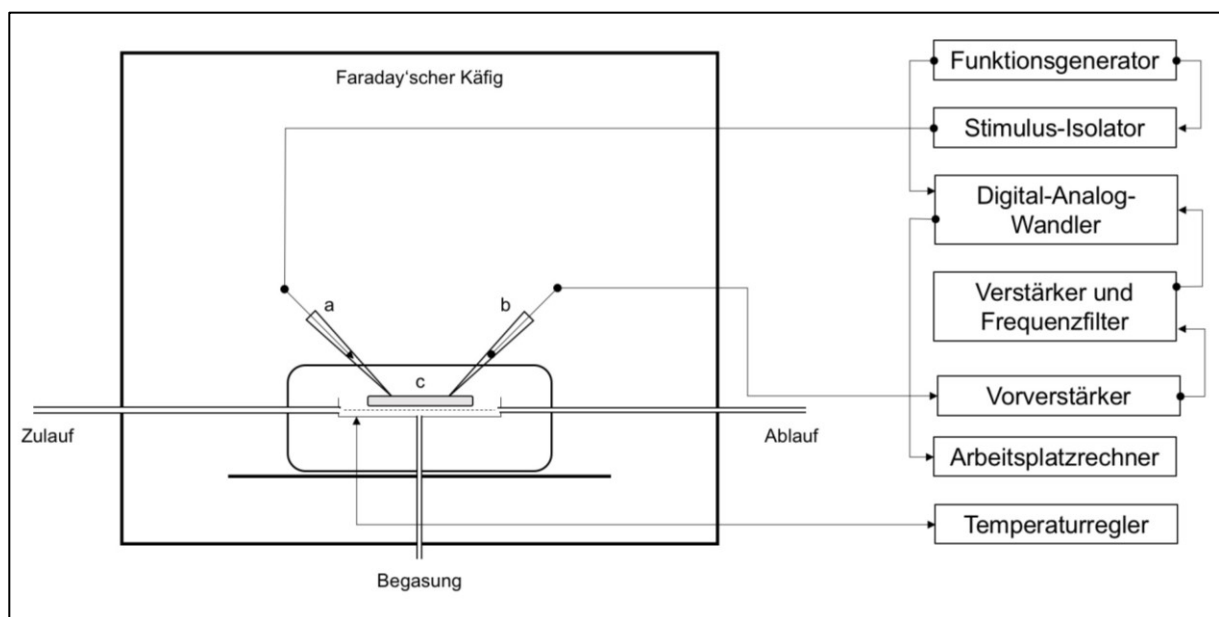
Alle Pharmaka wurden der im Versuch verwendeten ACSF-Lösung mindestens 15 Minuten vor Beginn der Aufzeichnung hinzugegeben, um eine vollständige Verteilung des Stoffes zu gewährleisten. Zusammen mit der ACSF-Lösung gelangten die Pharmaka so an ihren Wirkort.



## 2.6 Versuchsaufbau

Die elektrophysiologischen Untersuchungen an den Hippocampus-Schnitten wurden an einem Messplatz des Institutes für Physiologie vorgenommen. Dieser war umgeben von einem Faraday'schen Käfig, um die Messungen gegen elektromagnetische Felder von außerhalb abzuschirmen. Die gesamte Messapparatur befand sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch, der sowohl Stöße von außen absorbierte als auch die Manipulatoren in einem festen Verhältnis zum Hirnschnitt fixierte.

Die mit Carbogen begaste ACSF-Lösung (siehe Kapitel 2.4) wurde im Wasserbad auf 37 °C temperiert und anschließend über eine peristaltische Pumpe in die Messkammer geleitet. Hier wurde die Lösung auf  $(32 \pm 1)$  °C temperiert und weiterhin begast. Die abgeflossene ACSF-Lösung wurde durch eine Unterdruck-Pumpe abgesaugt (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6. Schematischer Aufbau der Versuche**

a: Stimulations-Elektrode; b: Ableit-Elektrode; c: Schnitt des Hippocampus. Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Marco Rohde, Institut für Physiologie, Rostock

Die Pipetten aus Borosilikat-Glas wurden vor jedem Versuch mit dem Heka PIP-5 hergestellt. Hierzu wurde ein Rohling der Glaspipette eingespannt und unter Erhitzung durch einen Heizdraht der Schwerkraft folgend auseinandergezogen. Anschließend wurde der Rohling rezentriert und in einem zweiten Schritt mit niedrigerer Temperatur erneut der Schwerkraft folgend auseinandergezogen, sodass am Ende zwei scharfe Glaspipetten mit runder, mikroskopisch kleiner Öffnung entstanden. Der elektrische Widerstand über diese Öffnung betrug 1 – 3 MΩ.

Stimulations- und Messelektroden wurden mittels dieser mit ACSF gefüllter Pipetten und Mikromanipulatoren über dem Schnitt positioniert. Der Funktionsgenerator initiierte sowohl einen Impuls des Stimulus-Isolators, als auch die Datenaufnahme des Analog-Digital-Wandlers. Dieser empfing sein analoges Signal, nachdem es von Vorverstärker ( $\times 10$ ) und Frequenzfilter aufbereitet wurde. Das digitale Signal wurde zur Datenaufnahme an einen Rechner ausgegeben und dort mit dem Analyse-Programm Signal 2.16 gespeichert und verarbeitet.

*Einstellungen Pipettenzieher:* Temperatur erster Schritt: 1202 °C; Temperatur zweiter Schritt: 670 °C.

*Einstellungen Frequenzfilter:* Verstärkung (Gain) =  $10 \times 10$ ; Hochpass (Highpass) = 3 Hz; Tiefpass (Lowpass) = 1,5 kHz; Betriebsmodus = Gleichstrom (DC). Nullpunktkompensation (Offset) durch Hochpassfunktion deaktiviert.

*Einstellungen Signal 2.16:* Abtastrate (Sample Rate) = 10 kHz; Dauer einer einzelnen Aufnahme (Frame length) = 350 ms; Datenpunkte pro einzelner Aufnahme (Frame points) = 3.000.

## 2.7 Versuchsablauf

Frühestens 30 Minuten nach Präparation der Hippocampus-Schnitte wurden diese mit einer abgeschnittenen Transferpipette in die oben beschriebene Messapparatur gelegt. Anschließend äquibrierten die Schnitte mindestens weitere 30 Minuten.

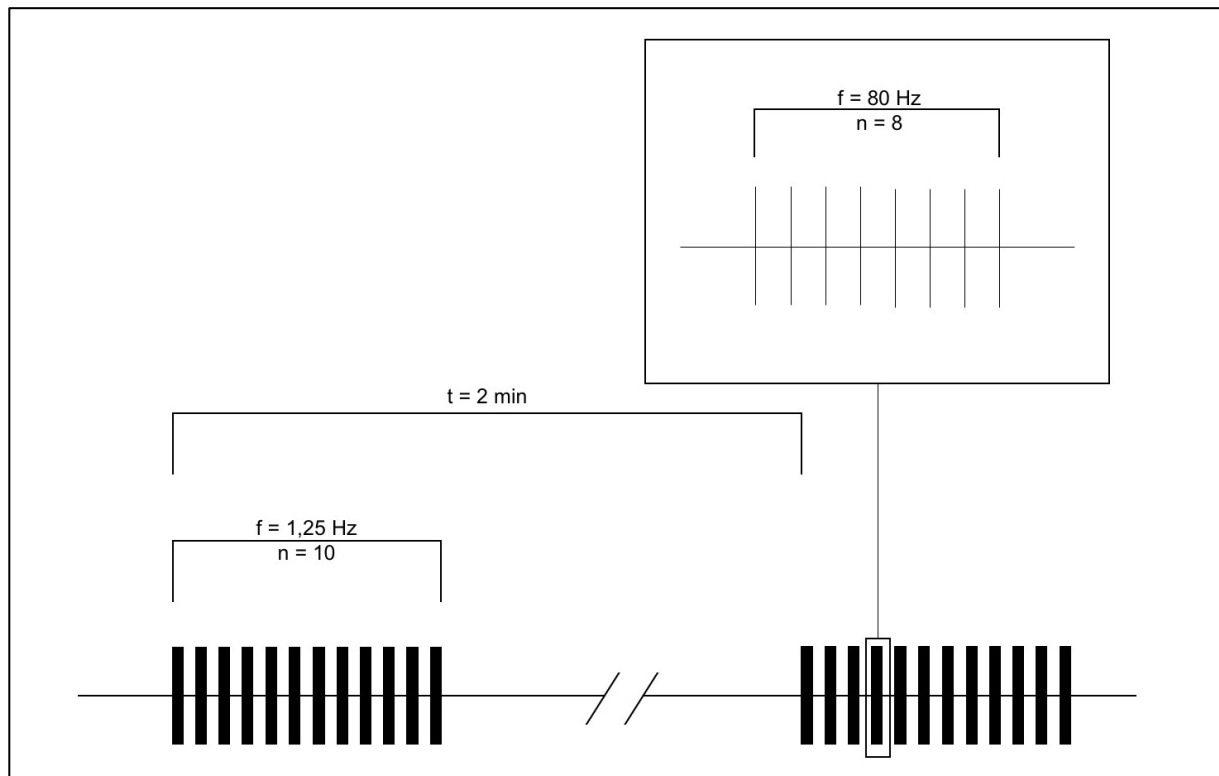
Die Elektroden zur Stimulation und Messung wurden beide in der mittleren Molekularschicht des Gyrus dentatus platziert, wo die synaptische Umschaltung von den Axonen des medialen Tractus perforans (MPP) auf die Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus stattfindet (10,15). Die Elektroden wurden so platziert, dass sich zwischen Stimulationselektrode und Ableitelektrode möglichst viele Körnerzell-Synapsen des MPP befanden. Dies konnte mithilfe der Ableitelektrode an einer Doppelpulsdepression erkannt werden, bei der das postsynaptische Potential auf einen zweiten, 40 ms späteren Stimulus, kleiner ausfällt als das vorhergehende (siehe Kapitel 1.1.4). Die so evozierten und im elektrischen Feld gemessenen postsynaptischen Potentiale werden als fEPSPs (*engl. field excitatory postsynaptic potentials*) bezeichnet (30).

Wurden die Synapsen des MPP auf diese Weise identifiziert, blieben beide Elektroden über das gesamte Experiment in ihrer Position fixiert. Die Dauer eines Stimulus betrug konstant 100  $\mu$ s. Die Stromstärke des Stimulus wurde so gewählt, dass die fEPSPs 40 – 50 % ihrer maximalen Amplitude erreichten. Anschließend blieb diese Stromstärke über das gesamte Experiment gleich groß. Nun wurde alle 30 Sekunden ein Stimulus abgegeben sowie das fEPSP aufgezeichnet.

Zur Untersuchung der Fragestellungen wurden verschiedene Versuchsgruppen gebildet. Allen war gemeinsam, dass sie nach Ablauf der oben beschriebenen Prozedur mindestens 20 Minuten dem 30-sekündlich wiederkehrenden Reiz unterzogen wurden, um den Ausgangswert der fEPSP-Steilheit zu bestimmen (siehe Kapitel 2.9.1). Anschließend wurde ein standardisiertes Protokoll zur LTP-Induktion appliziert. Danach wurde für mindestens 60 Minuten die Stärke der Potenzierung der synaptischen Übertragung beobachtet, indem wieder ein alle 30 Sekunden wiederkehrender Reiz appliziert wurde.

Zu Beginn und Ende des Experimentes wurden mindestens 2 Reize als Doppelpuls mit einem Interstimulusintervall von 40 ms abgegeben. Hierdurch sollten etwaige Änderungen der synaptischen Übertragung im zeitlichen Verlauf des Versuches in prä- und postsynaptische Mechanismen unterschieden werden (siehe Kapitel 1.2.3).

In der AG Neurophysiologie am Institut für Physiologie wurde in den vergangenen Jahren erfolgreich ein Protokoll zur Induktion der Langzeitpotenzierung (LTP) erarbeitet. Hierbei wird in der für den einzelnen Versuch ermittelten Reizstärke eine definierte Gruppe von Stimuli abgegeben (siehe Abbildung 7). Die Dauer dieser Stimuli betrug jeweils 150  $\mu$ s. Eine Stimulation im  $\delta$ -Rhythmus bietet sich gerade aufgrund dessen direkter Verbindung zur Funktion der HCN-Kanäle an (siehe Kapitel 1.4.1).



**Abbildung 7. Schema des dBS-Protokolls zur LTP-Induktion**

Mit einer Frequenz von 1,25 Hz ( $\delta$ -Rhythmus) wurden 10 Untergruppen (*engl. bursts*) von Reizen appliziert. Diese Untergruppen bestanden aus jeweils 8 Stimuli, die mit einer Frequenz von 80 Hz abgegeben wurden. Nach 2 Minuten wurden erneut 10 gleichartige Untergruppen von Reizen appliziert.

## 2.8 Versuchsgruppen

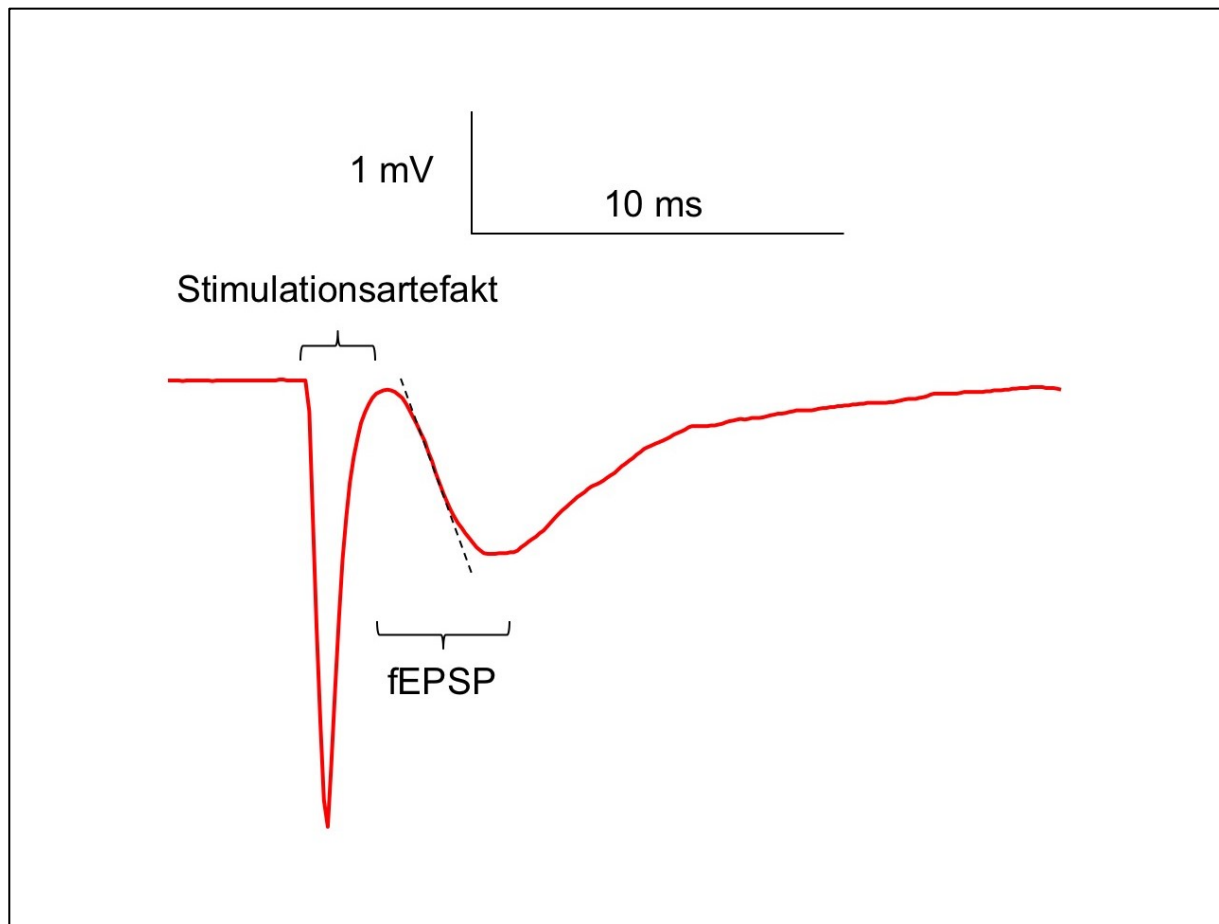
In allen Versuchsgruppen wurde der Betrag der induzierten LTP quantifiziert (siehe Kapitel 2.9). Die Hirnschnitte früh-postnataler Tiere wurden grundsätzlich unter 1  $\mu$ M Gabazin untersucht.

Zu den Versuchsgruppen wurden Kontroll-Versuche durchgeführt, in denen kein Protokoll zur LTP-Induktion appliziert wurde.

<i>Gruppe</i>	<i>Beschreibung</i>
Kontrolle P9–15	Es wurden keine weiteren Pharmaka appliziert.
L-NAME P9–15	Blockade der NO-Synthase im früh-postnatalen Gewebe
L-NAME + 8-Br-cGMP P9–15	Rettungsversuch des NO/cGMP-Signalwegs im früh-postnatalen Gewebe
L-NAME + 8-Br-cGMP + ZD7288 P9–15	Untersuchung der HCN-Kanäle als mögliches Ziel des NO/cGMP-Signalwegs im früh-postnatalen Gewebe
Kontrolle P30–150	Es wurden keine Pharmaka appliziert.
L-NAME P30–150	Blockade der NO-Synthase im adulten Gewebe

## 2.9 Auswertung

### 2.9.1 Analyse der fEPSPs



**Abbildung 8. Beispiel einer Messung eines fEPSP an den Körnerzell-Synapsen des MPP**

Dargestellt ist das elektrische Potential  $U$  in mV über die Zeit  $t$  in ms. Es ist eine Nulllinie zu erkennen, gefolgt vom Stimulationsartefakt. Hierauf folgt in charakteristischer Weise das fEPSP der Synapsen, die sich zwischen Stimulations- und Ableitelektrode befinden. Anschließend erfolgt die Repolarisation bis zurück auf die Nulllinie. Steilheit = steilster negativer Anstieg; gestrichelte Linie.

Zur Aufbereitung der einzelnen Versuche wurden in der Software Signal 2.16 zunächst je 2 aufeinanderfolgende Messungen eines fEPSPs gemittelt (siehe Abbildung 8). Alle Messungen des dBS-Protokolls wurden ausgeschlossen. Die verbliebenen Messungen wurden zur besseren Auswertbarkeit einer 5-Punkt-Glättung unterzogen. Anschließend wurden alle Messungen differenziert, wodurch sich eine Darstellung des Anstiegs des Potentials ergab. Hieraus wurde der größte negative Anstieg (Steilheit) ausgelesen. Dieser wurde mittels Excel 2010 im zeitlichen Verlauf des Experiments grafisch dargestellt.

Wurde ein Doppelpuls abgegeben, so wurde das zweite fEPSP auf gleiche Weise analysiert.

## 2.9.2 Grafische Darstellung der Versuche

Fixpunkt der einzelnen Messungen einer Versuchsgruppe war der Startpunkt 10 Minuten vor Beginn der LTP-Induktion ( $t = -9$  min). Der Zeitpunkt  $t = 1$  min wurde als Zeitpunkt 1 min nach dBS-Protokoll festgelegt. Als Ausgangswert eines Versuches wurde der Mittelwert der Steilheit im Intervall  $t = [-9;0]$  min definiert. Alle Messungen eines Versuches wurden auf diesen Mittelwert normiert. Dies gilt auch für die jeweiligen Kontrollgruppen, die keiner LTP-Induktion unterzogen wurden. In jeder Versuchsgruppe wurde die Steilheit zu jedem Versuchszeitpunkt  $t$  gemittelt. Diese Mittelwerte wurden mit der jeweiligen Standardabweichung des Mittelwertes (*engl. standard error of the mean, SEM*) dargestellt.

Aus der Darstellung der Kontrollgruppen wurde eine Linearfunktion errechnet. Die auf ihre Ausgangsteilheit normierten dBS-Versuche wurden weiterhin auf diese Funktion normiert und die Mittelwerte anschließend in gleicher Weise wie die der Kontrollgruppen dargestellt.

Zur Quantifizierung der LTP in den einzelnen Versuchsgruppen wurden die Werte im Intervall  $t = [55;60]$  gemittelt, also die der letzten 6 Minuten eines Versuchs. Für jede Versuchsgruppe wurde daraus ein Mittelwert errechnet, der mit der SEM angegeben wurde.

Zur Untersuchung des Doppelpulsverhältnisses (*engl. paired pulse ratio, PPR*) wurden die Steilheiten von 2. und 1. Potential direkt ins Verhältnis gesetzt.

$$PPR = \frac{\text{Steilheit (2)}}{\text{Steilheit (1)}}$$

So wurde zu verschiedenen Versuchszeitpunkten  $t$  die PPR ermittelt. Für Beginn und Ende eines Versuchs wurde jeweils ein Mittelwert der PPR gebildet. Diese wurden innerhalb einer Versuchsgruppe gemittelt und als Mittelwert mit SEM dargestellt, sodass in jeder Versuchsgruppe die PPR vor und nach LTP-Induktion angegeben werden konnte.

### **2.9.3 Prüfung auf signifikante Unterschiede**

Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurde ein t-Test durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied wurde angenommen bei Werten von  $p \leq 0,05$ . Diese wurden durch ein Sternchen (\*) gekennzeichnet.

Waren die Werte einer Versuchsgruppe nicht normalverteilt, wurde der Rangsummentest nach Wilcoxon-Mann-Whitney durchgeführt. Unterschiede zwischen solchen Gruppen wurden bei Werten von  $p \leq 0,05$  als signifikant betrachtet. Ein signifikanter Unterschied wurde durch 2 Sternchen (\*\*) gekennzeichnet.



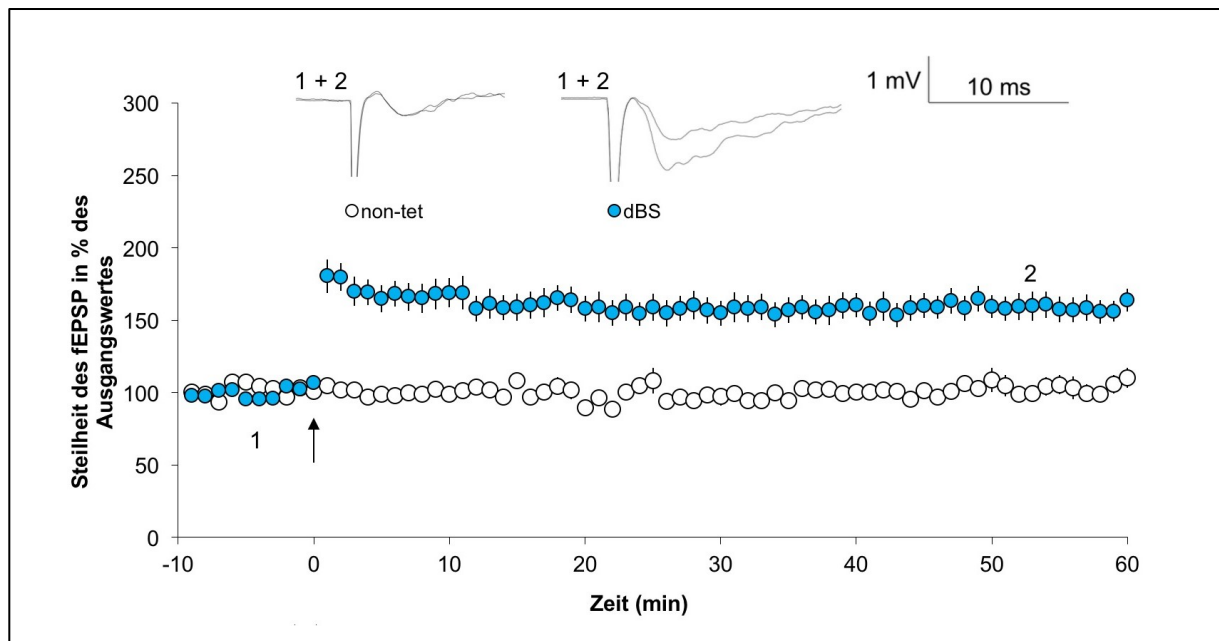
### 3 Ergebnisse

Alle Daten werden als Mittelwert der Versuchsgruppe angegeben. Sie werden in Relation gesetzt zur Ausgangsteilheit der fEPSP und mit der SEM angegeben.

#### 3.1 Der Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die LTP am MPP

##### 3.1.1 Die LTP früh-postnataler Ratten unter Gabazin (Kontrollversuche)

Durch Durchführung eines dBS-Protokolls (siehe Abbildung 7) wurde eine Langzeitpotenzierung (LTP) am medialen Tractus perforans (MPP) induziert. Diese Applikation ist im Diagramm zum Zeitpunkt  $t = 0 \text{ min}$  durch einen Pfeil gekennzeichnet. Nach Abschluss der Stimulation kam es zu einer kurzen post-tetanischen Potenzierung der Synapsen, welche anschließend in eine LTP überging. Diese betrug  $(156 \pm 8) \%$  der Ausgangsteilheit. In einer Kontrollgruppe ohne dBS-Applikation (nicht tetanisiert, non-tet) wurde die Konstanz des fEPSP über den gesamten Versuch gezeigt. Es wurden 16 Versuche mit dBS-Applikation und 11 Kontroll-Versuche durchgeführt (siehe Abbildung 9).



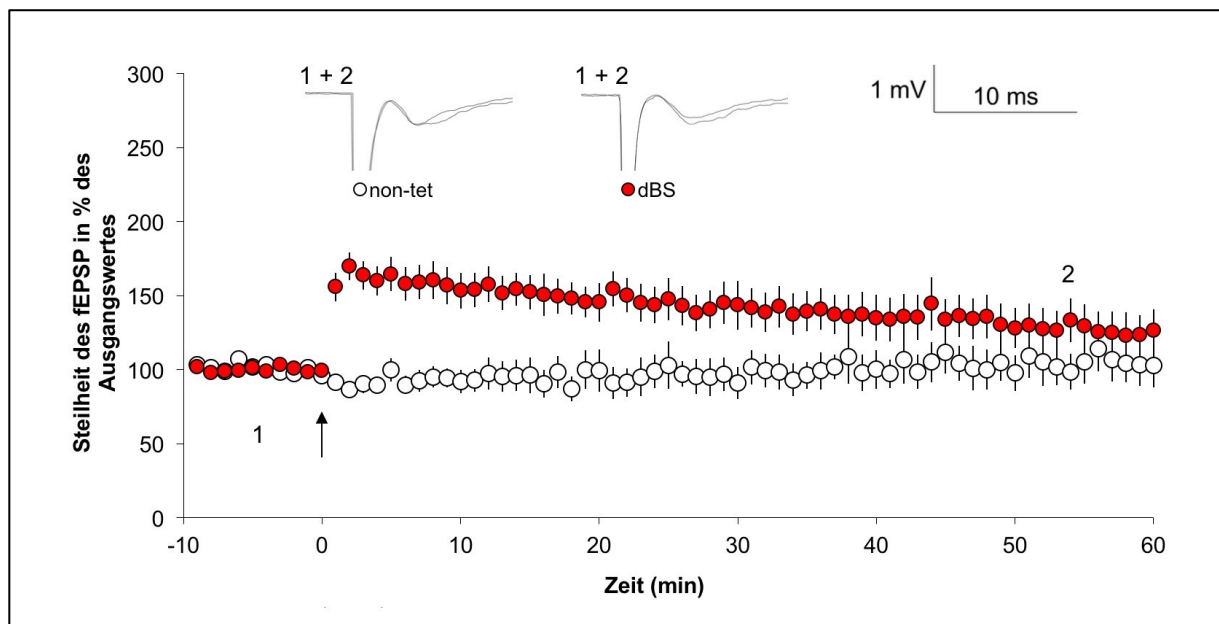
**Abbildung 9. Die Kontroll-LTP am MPP (P9-15)**

Darstellung der fEPSP-Steilheit in % der Steilheit des Ausgangs-fEPSP über die Zeit  $t$  in Minuten. Weiße Kreise: Versuchsgruppe ohne dBS-Applikation (nicht tetanisiert, non-tet). Blaue Kreise: dBS-Applikation (Zeitpunkt durch Pfeil markiert). Oben: Beispiel-fEPSPs zu den Zeitpunkten (1) und (2). Oben rechts: Maßstab der Zeit-Achse in ms sowie der Spannungs-Achse in mV. Fehlerbalken: SEM.

### 3.1.2 L-NAME verringert die LTP am MPP früh-postnataler Ratten

Die oben beschriebenen Versuche wurden unter Zugabe des NO-Synthase-Blockers L-NAME (100  $\mu$ M) wiederholt. Nach dBS-Applikation (durch Pfeil gekennzeichnet) kam es auch hier zu einer kurzen post-tetanischen Potenzierung, die in eine LTP überging. Diese betrug lediglich ( $125 \pm 15$ ) % der Steilheit der Ausgangs-fEPSPs. In einer Kontrollgruppe ohne dBS-Applikation wurde wieder die Konstanz des fEPSPs gezeigt. Es wurden 11 Versuche mit dBS-Applikation und 6 Kontroll-Versuche durchgeführt (siehe Abbildung 10).

Die Werte der Versuchsgruppe mit dBS-Applikation sind nicht normalverteilt, sodass signifikante Unterschiede zu dieser Gruppe mit dem Rangsummentest nach Wilcoxon-Mann-Whitney untersucht wurden.



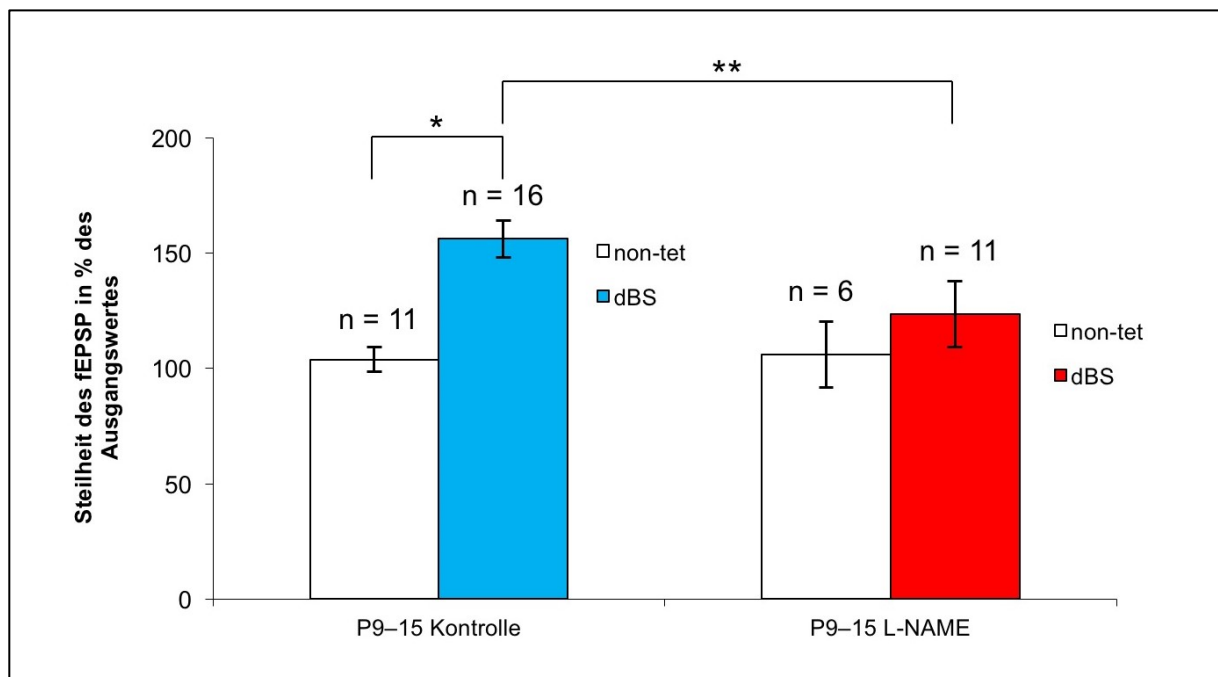
**Abbildung 10. L-NAME verringert die LTP am MPP früh-postnataler Ratten**

Darstellung der fEPSP-Steilheit in % der Steilheit des Ausgangs-fEPSP über die Zeit  $t$  in Minuten. Weiße Kreise: Versuchsgruppe ohne dBS-Applikation (non-tet). Rote Kreise: dBS-Applikation (Zeitpunkt durch Pfeil markiert). Oben: Beispiel-fEPSPs zu den Zeitpunkten (1) und (2). Oben rechts: Maßstab der Zeit-Achse in ms sowie der Spannungs-Achse in mV. Fehlerbalken: SEM.

Während sich unter Kontrollbedingungen im t-Test ein signifikanter Unterschied zwischen Versuchen mit und ohne dBS-Applikation zeigte, konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Versuchen mit und ohne dBS-Applikation unter L-NAME gefunden werden.

In den Versuchen ohne dBS-Applikation zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der fEPSP-Steilheit zu Beginn und Ende der Versuche.

Wie im folgenden Diagramm dargestellt, konnte eine deutlich niedrigere LTP an den Körnerzell-Synapsen des MPP der früh-postnatalen Ratten beobachtet werden, wenn die NO-Synthese durch L-NAME geblockt war. Dieser Unterschied ist im Rangsummen-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney signifikant (siehe Abbildung 11).

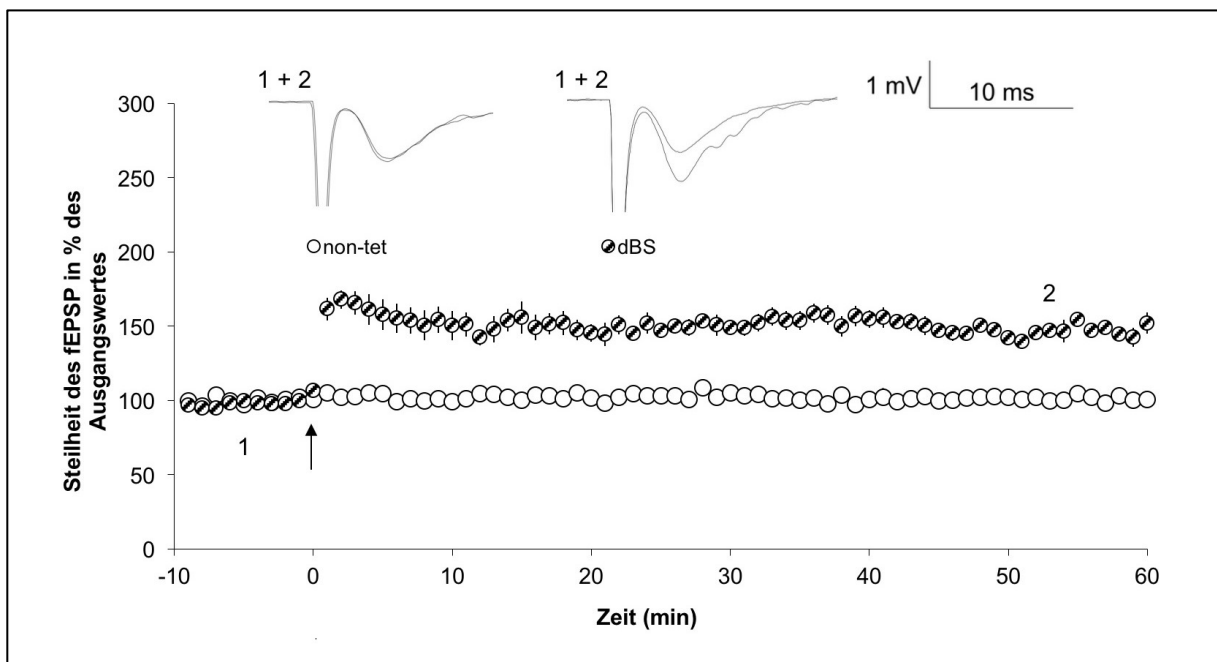


**Abbildung 11. Übersicht des L-NAME-Effekts am MPP früh-postnataler Ratten**

Die durchschnittliche Steilheit des fEPSP in den letzten 6 Minuten ist in % der Steilheit des AusgangsfEPSP dargestellt. Weiß: Versuche ohne dBS-Applikation (non-tet). Farbige: dBS-Applikation. Links: Kontrolle ohne L-NAME. Rechts: Versuche unter L-NAME. Signifikanter Unterschied im t-Test: (\*). Signifikanter Unterschied im Rangsummen-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney: (\*\*). Fehlerbalken: SEM.

### 3.1.3 Die Wirkung von L-NAME am MPP ist altersabhängig

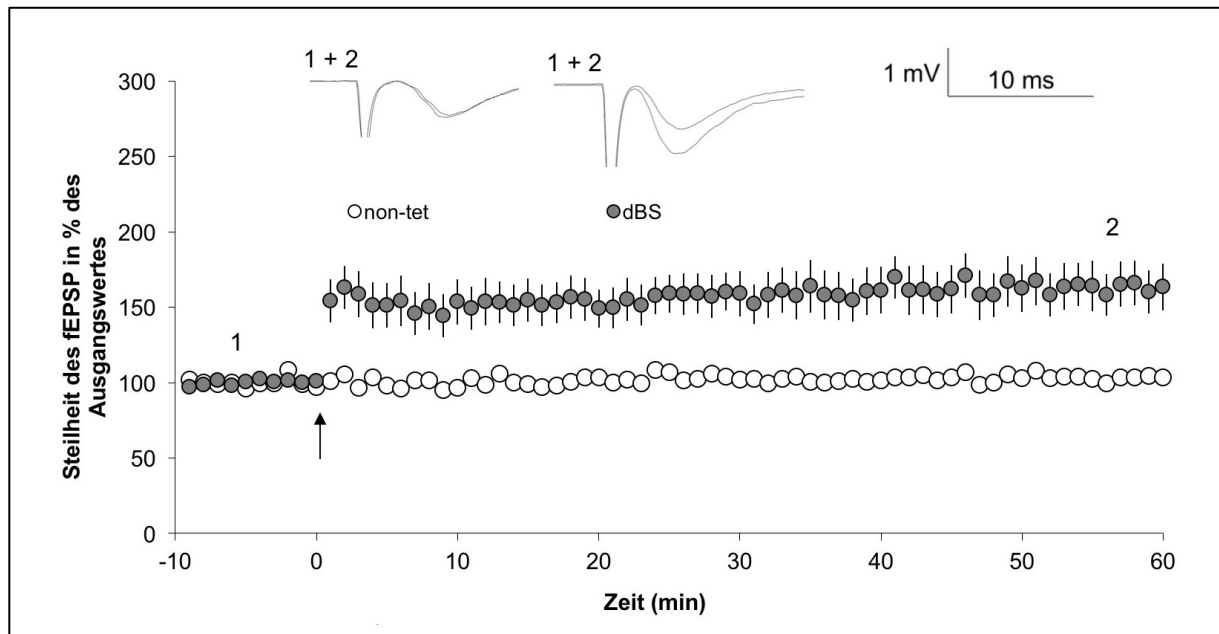
Um die Altersabhängigkeit der L-NAME-Wirkung zu untersuchen, wurden die oben beschriebenen Versuchsreihen mit adulten Tieren (P30–150) wiederholt. Nach dBS-Applikation konnte eine post-tetanische Potenzierung beobachtet werden, die unter Kontroll-Bedingungen in eine LTP überging. Diese betrug  $(148 \pm 4) \%$  der Steilheit der Ausgangs-fEPSPs. Es wurden 6 Kontroll-Versuche ohne dBS-Applikation und 8 Versuche mit dBS-Applikation durchgeführt (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12. Die Kontroll-LTP am MPP adulter Ratten (P30–150)**

Darstellung der fEPSP-Steilheit in % der Steilheit der Ausgangs-fEPSPs über die Zeit  $t$  in Minuten. Weiße Kreise: Versuchsgruppe ohne dBS-Applikation (non-tet). Gestreifte Kreise: dBS-Applikation (Zeitpunkt durch Pfeil markiert). Oben: Beispiel-fEPSPs zu den Zeitpunkten (1) und (2). Oben rechts: Maßstab der Zeit-Achse in ms sowie der Spannungs-Achse in mV. Fehlerbalken: SEM.

Bei Wiederholung der Versuche an Hippocampus-Schnitten von adulten Tieren (P30–150) unter L-NAME zeigte sich wieder eine LTP, welche unter L-NAME ( $157 \pm 15$ ) % der Steilheit der Ausgangs-fEPSPs betrug. Es wurden 8 Versuche mit sowie 6 Kontrollversuche ohne dBS-Applikation durchgeführt (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13. Die LTP unter L-NAME am MPP adulter Ratten**

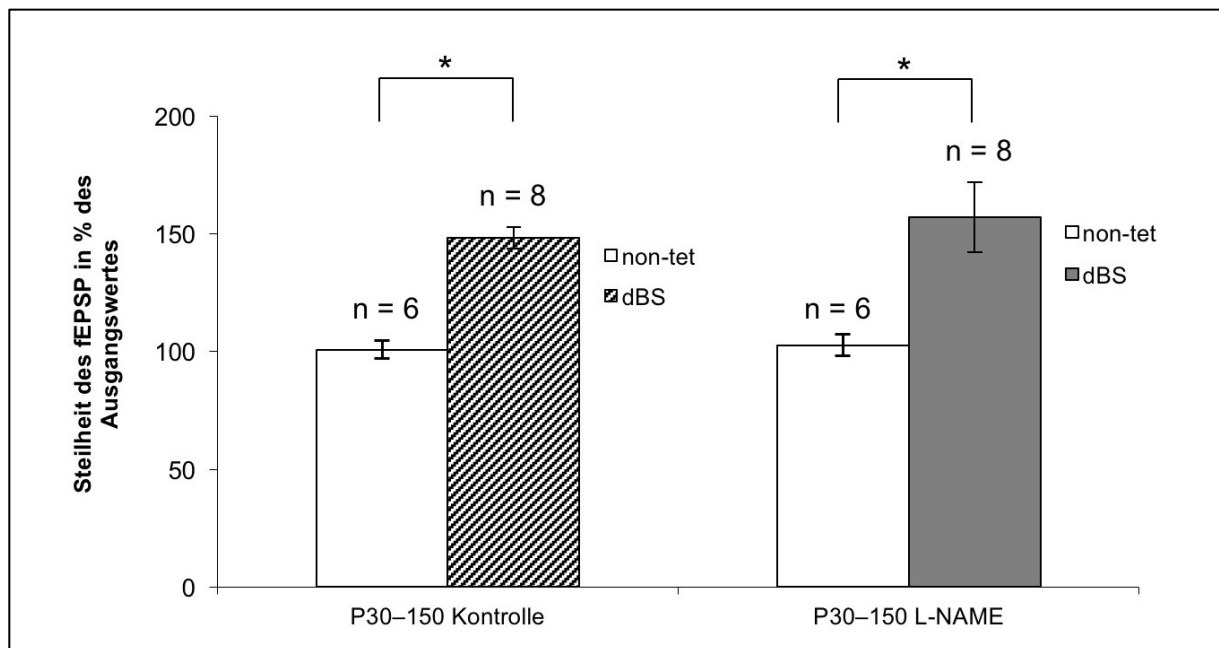
Darstellung der fEPSP-Steilheit in % der Steilheit des Ausgangs-fEPSP über die Zeit  $t$  in Minuten. Weiße Kreise: Versuchsgruppe ohne dBS (non-tet). Graue Kreise: dBS-Applikation (Pfeil). Oben: Beispiel-fEPSPs zu den Zeitpunkten (1) und (2). Oben rechts: Maßstab der Zeit-Achse in ms sowie der Spannungs-Achse in mV. Fehlerbalken: SEM.

Der Vergleich der Versuchsgruppen adulter Tiere mit und ohne den NO-Synthase-Blocker L-NAME zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den dBS-Applikationen. Die Beträge der induzierten LTP unterscheiden sich im t-Test signifikant von den Kontroll-Versuchen ohne dBS-Applikation (siehe Abbildung 14).

In den Versuchen ohne dBS-Applikation zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem fEPSP-Steilheit zu Beginn und Ende der Versuche.

Auch zwischen den Beträgen der LTP bei früh-postnatalen und adulten Tieren fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Applikation des NO-Synthase-Blockers L-NAME bei adulten Versuchstieren, im Gegensatz zu früh-postnatalen Tieren (siehe Abbildung 11), keinen Einfluss auf die Ausbildung der Langzeitpotenzierung hat.



**Abbildung 14. Zusammenfassung des L-NAME-Effekts am MPP adulter Ratten**

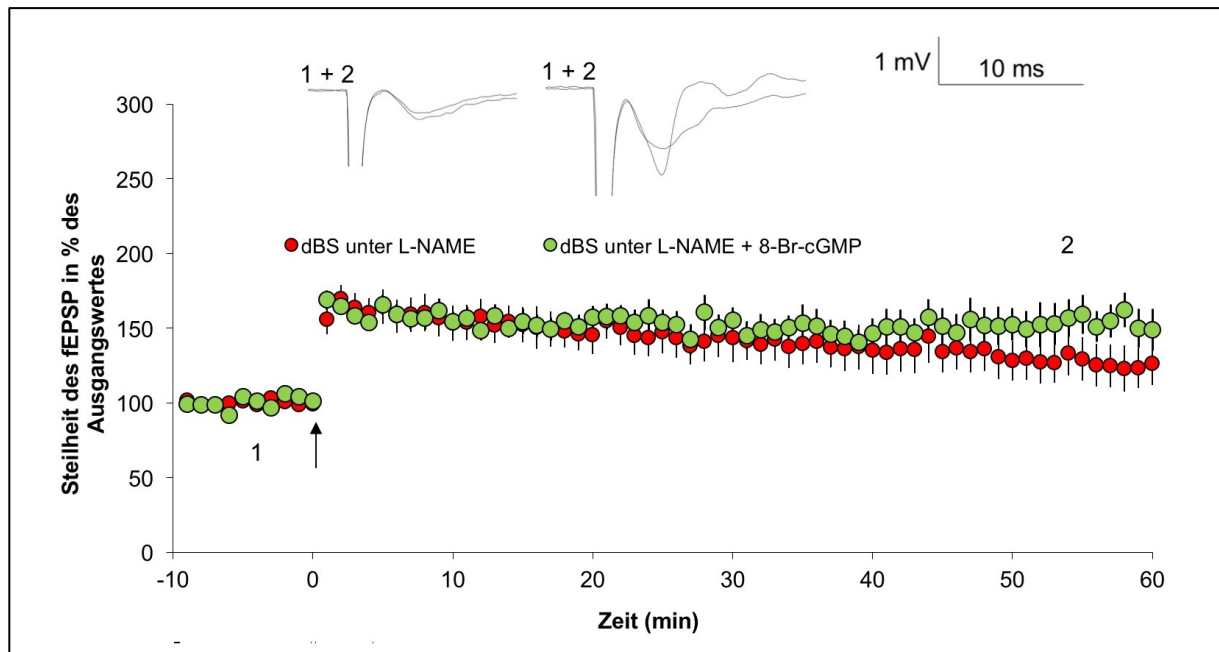
Die durchschnittliche Steilheit des fEPSP in den letzten 6 Minuten ist in % der Steilheit des AusgangsfEPSP dargestellt. Weiße Balken: keine dBS-Applikation (non-tet). Gefüllte Balken: dBS-Applikation. Links: Kontrolle ohne L-NAME. Rechts: Versuche unter L-NAME. Signifikanter Unterschied im t-Test: (\*). Fehlerbalken: SEM. Beachte: kein signifikanter Unterschied zwischen den dBS-Applikationen.

## 3.2 Die Kaskade des früh-postnatalen NO-Signalwegs

### 3.2.1 cGMP ist der Vermittler der NO-Wirkung am MPP

Die oben beschriebenen Versuche wurden mit Gewebe früh-postnataler Tiere wiederholt, wobei der Versuchslösung das cGMP-Analogon 8-Br-cGMP mit einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  hinzugegeben wurde. Es wurden 11 Versuche mit dBS-Applikation durchgeführt.

Sollte das NO-Signal über cGMP vermittelt werden, so wäre hier eine Steigerung der Langzeitpotenzierung (LTP) auf das ursprüngliche Niveau zu erwarten. Es zeigte sich eine LTP von  $(154 \pm 11) \%$  der Steilheit der Ausgangs-fEPSPs, welche sich nicht signifikant von der LTP unter Kontrollbedingungen ohne L-NAME unterscheidet (siehe Abbildung 15).

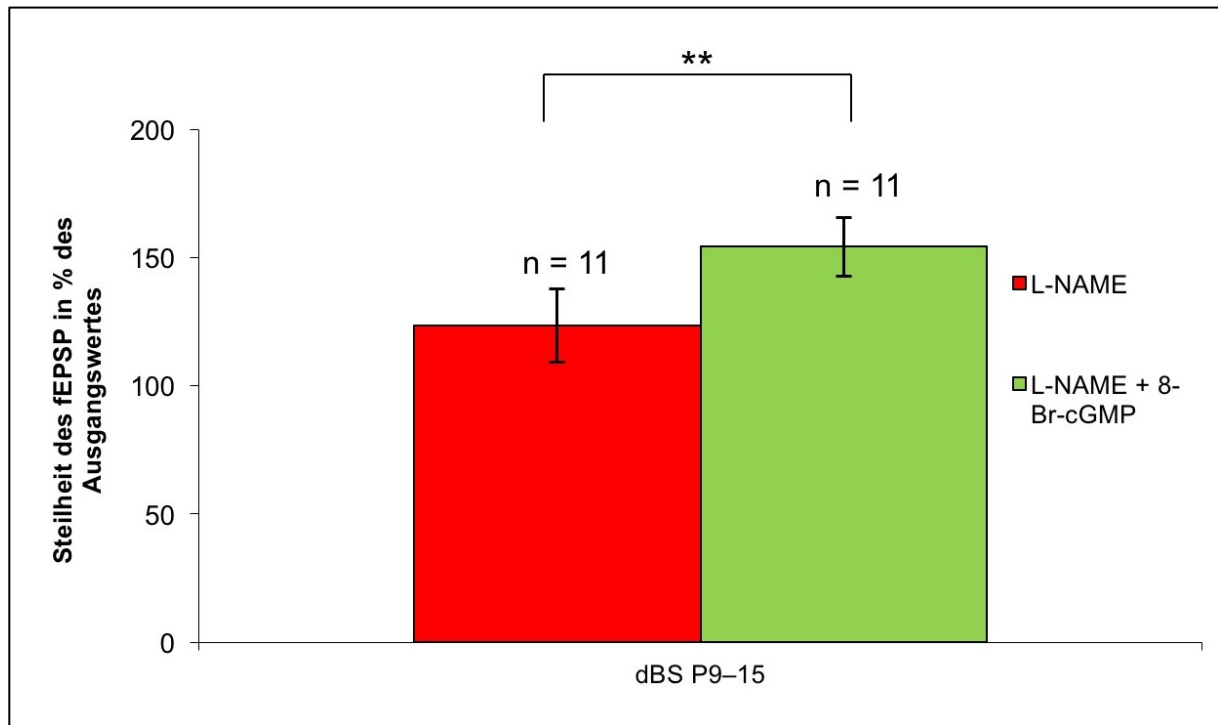


**Abbildung 15. Die LTP unter L-NAME + 8-Br-cGMP (P9–15)**

Darstellung der fEPSP-Steilheit in % der Steilheit des Ausgangs-fEPSP über die Zeit  $t$  in Minuten. Rote Kreise: dBS-Applikation (Pfeil) unter L-NAME (siehe Abbildung 10). Grüne Kreise: dBS-Applikation (Pfeil) unter L-NAME + 8-Br-cGMP. Oben: Beispiel-fEPSPs zu den Zeitpunkten (1) und (2). Oben rechts: Maßstab der Zeit-Achse in ms sowie der Spannungs-Achse in mV. Fehlerbalken: SEM. Versuchstiere: P9–15.

Im Vergleich der Versuchsgruppen unter L-NAME und unter L-NAME + 8-Br-cGMP zeigt sich ein im Rangsummentest nach Wilcoxon-Mann-Whitney signifikanter Unterschied. Zwischen der Langzeitpotenzierung unter Kontrollbedingungen und unter L-NAME + 8-Br-cGMP findet sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

8-Br-cGMP hebt den L-NAME-Effekt im vorliegenden Versuch also auf (siehe Abbildung 16, vergleiche Abbildung 11).



**Abbildung 16. 8-Br-cGMP hebt den L-NAME-Effekt auf**

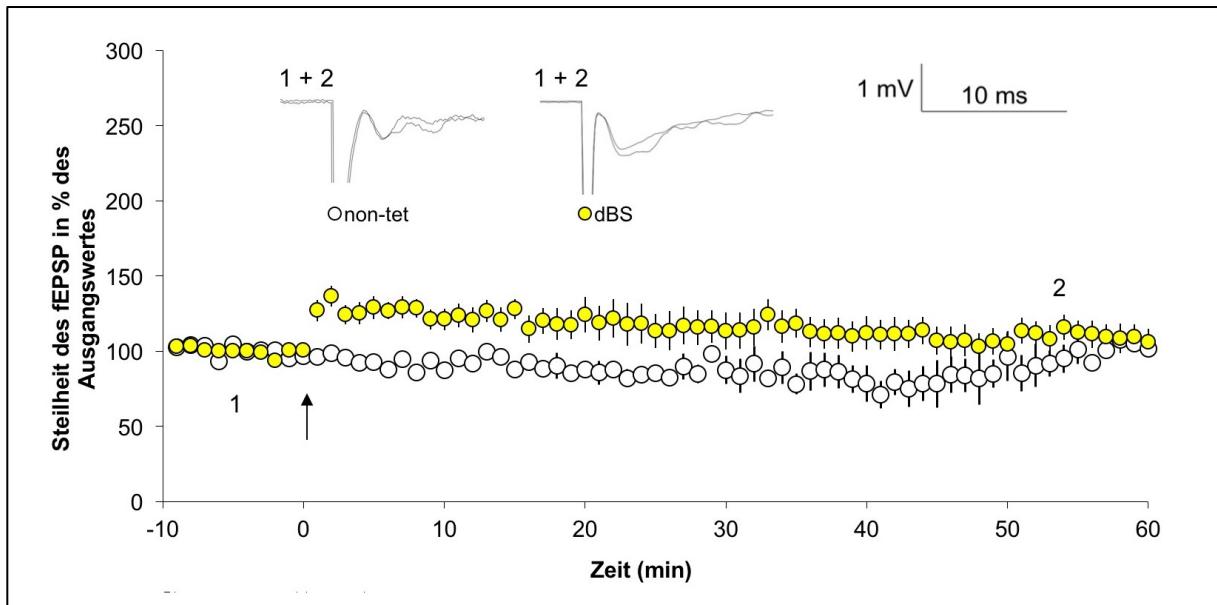
Die durchschnittliche Steilheit des fEPSP in den letzten 6 Minuten ist in % der Steilheit des AusgangsfEPSP dargestellt. Rot: dBS-Applikation unter L-NAME (siehe Abbildung 11). Grün: dBS-Applikation unter L-NAME + 8-Br-cGMP. Signifikanter Unterschied im Rangsummentest nach Wilcoxon-Mann-Whitney: (\*\*). Fehlerbalken: SEM. Beachte: Das zugegebene 8-Br-cGMP bringt die LTP auf Kontroll-Niveau (siehe Abbildung 11).



### 3.2.2 HCN-Kanäle sind ein Effektor des NO/cGMP-Signalwegs

Um die Kaskade des NO/cGMP-Signalwegs weiterzuverfolgen, wurden die obigen Versuche unter weiterer Zugabe des HCN-Kanal-Blockers ZD7288 (10  $\mu$ M) wiederholt. Es wurden 10 Versuche mit dBS-Applikation und 2 Kontroll-Versuche ohne LTP-Induktion durchgeführt.

Sollte der NO/cGMP-Signalweg über HCN-Kanäle die LTP beeinflussen, wäre hier eine erneute Reduktion der LTP zu erwarten. Tatsächlich beobachtet man nach einer kurzen post-tetanischen Potenzierung eine LTP, die sich statistisch nicht signifikant von der Steilheit der Ausgangs-fEPSPs unterscheidet. Sie beträgt  $(109 \pm 8) \%$  der Steilheit der Ausgangs-fEPSPs (siehe Abbildung 17).

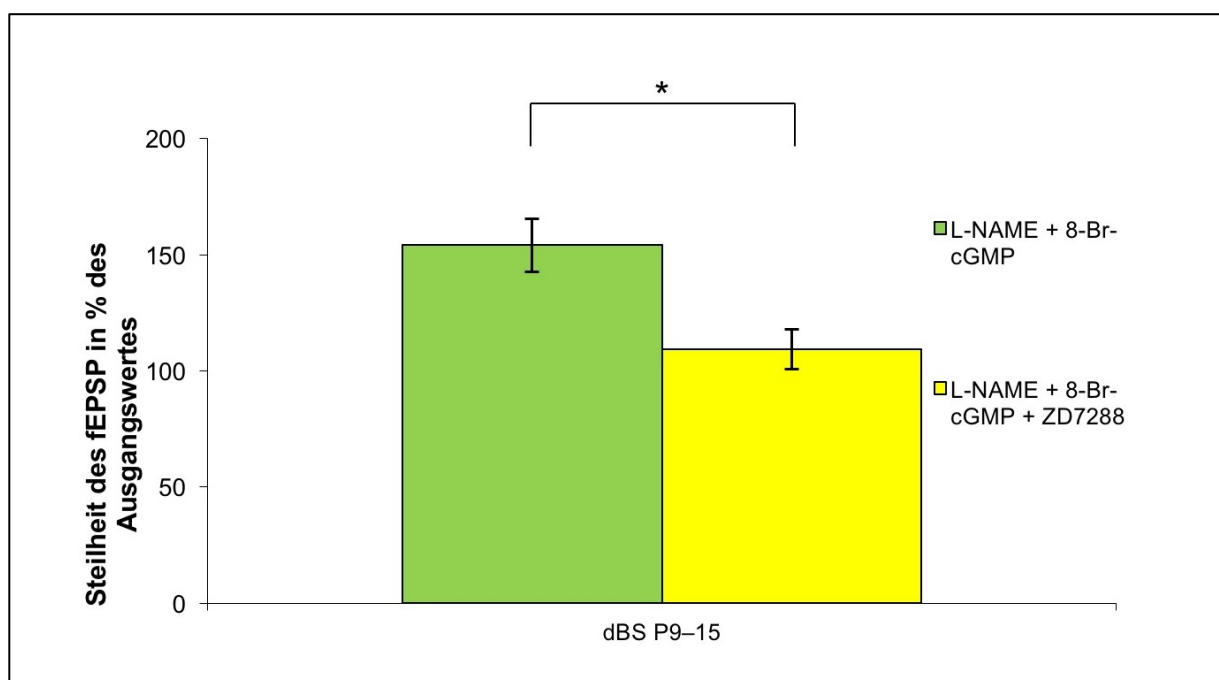


**Abbildung 17. Die LTP unter L-NAME + 8-Br-cGMP + ZD7288 (P9–15)**

Darstellung der fEPSP-Steilheit in % der Steilheit des Ausgangs-fEPSP über die Zeit  $t$  in Minuten. Weiße Kreise: Versuchsgruppe ohne dBS (non-tet). Gelbe Kreise: dBS-Applikation (Pfeil). Oben: Beispiel-fEPSPs zu den Zeitpunkten (1) und (2). Oben rechts: Maßstab der Zeit-Achse in ms sowie der Spannungs-Achse in mV. Fehlerbalken: SEM.

In der Darstellung als Balkendiagramm erkennt man die geringe Langzeitpotenzierung unter Zugabe des HCN-Kanal-Blockers ZD7288, welche im t-Test einen statistisch signifikanten Unterschied zu den Versuchen unter L-NAME + 8-Br-cGMP zeigt. Kein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den dBS-Applikationen unter L-NAME und unter L-NAME + 8-Br-cGMP + ZD7288. Somit sind neben der NO-Synthase und cGMP auch HCN-Kanäle an der Ausbildung der an diesen Synapsen beschriebenen LTP beteiligt (siehe Abbildung 18, vergleiche Abbildung 16).

Zwischen Beginn und Ende der Kontroll-Versuche unter L-NAME + 8-Br-cGMP + ZD7288 zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

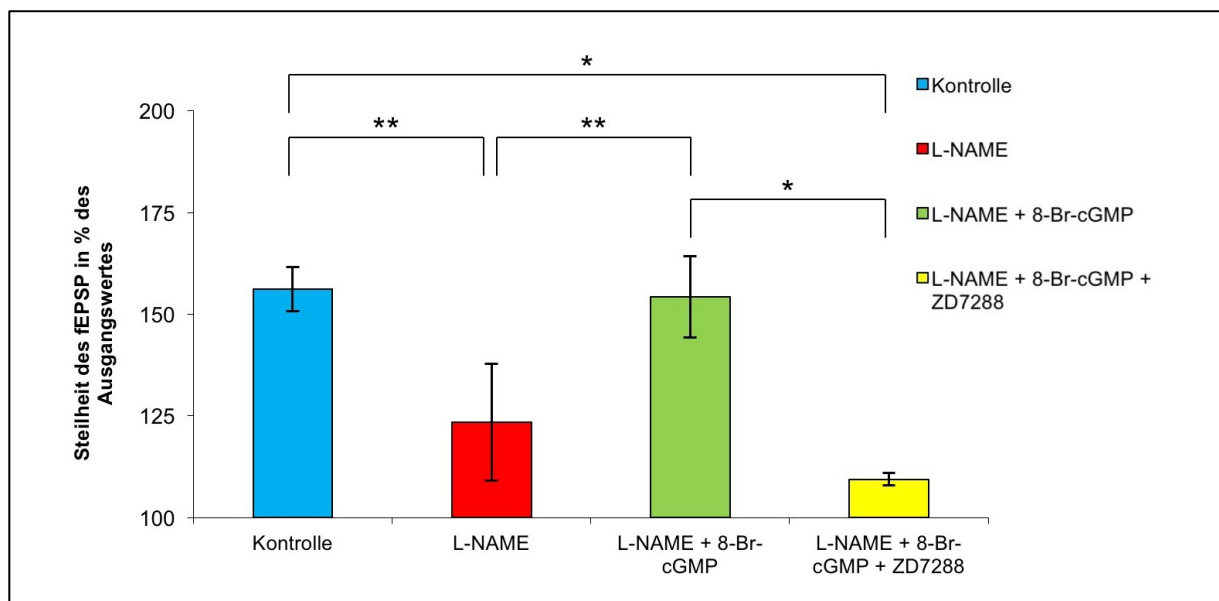


**Abbildung 18. ZD7288 hebt den 8-Br-cGMP-Effekt auf**

Die durchschnittliche Steilheit des fEPSP in den letzten 6 Minuten ist in % der Steilheit des AusgangsfEPSP dargestellt. Grün: dBS-Applikation unter L-NAME + 8-Br-cGMP. Gelb: dBS-Applikation unter L-NAME + 8-Br-cGMP + ZD7288. Fehlerbalken: SEM. Signifikanter Unterschied im t-Test: (\*).

### 3.2.3 Übersicht der Ergebnisse der dBS-Versuche (P9–15)

Fasst man die oben beschriebenen Versuche zusammen, ergibt sich folgendes Bild: An den Körnerzell-Synapsen adulter Versuchstiere hat der NO-Synthase-Blocker L-NAME keinen Einfluss auf die LTP. Hingegen kann an früh-postnatalen Körnerzell-Synapsen des MPP ein statistisch signifikant niedrigerer Betrag der LTP durch L-NAME beobachtet werden. Dies kann durch die Zugabe des cGMP-Analogons 8-Br-cGMP verhindert werden. Bei Wiederholung der Versuche mit dem HCN-Kanal-Blocker ZD7288 wird hingegen ein statistisch signifikant niedrigerer Betrag der LTP gemessen. Dieser Betrag ist im Vergleich zum Kontrollversuch und auch im Vergleich zum Rettungsversuch (L-NAME + 8-Br-cGMP) niedriger (siehe Abbildung 19). Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Versuchen unter L-NAME und unter L-NAME + 8-Br-cGMP + ZD7288. Ebenso konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Beträgen der LTP unter Kontrollbedingungen und unter L-NAME + 8-Br-cGMP ermittelt werden.



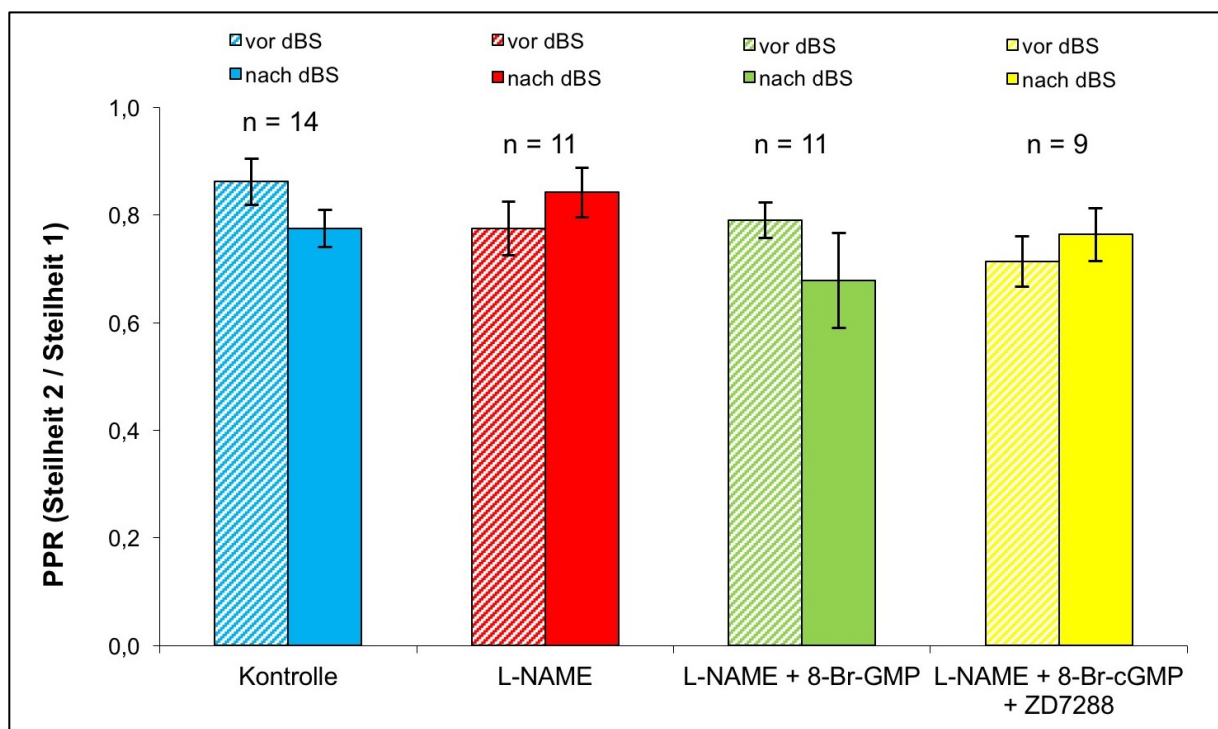
**Abbildung 19. Übersicht der dBS-Versuche (P9–15)**

Die durchschnittliche Steilheit des fEPSP in den letzten 6 Minuten ist in % der Steilheit des AusgangsfEPSP dargestellt. Von links nach rechts: Kontrolle; L-NAME; L-NAME + 8-Br-cGMP; L-NAME + 8-Br-cGMP + ZD7288. Signifikanter Unterschied im t-Test: (\*). Signifikanter Unterschied im Rangsummentest nach Wilcoxon-Mann-Whitney: (\*\*). Fehlerbalken: SEM.

### 3.3 Keine signifikante Änderung der PPR durch dBS

Während eine Änderung der PPR für einen präsynaptischen Prozess spricht, zeigt eine konstante PPR eher einen postsynaptischen Prozess an. Eine Modulation der Vesikelausschüttung wird die Verarbeitung eines zweiten, kurz darauffolgenden Stromimpulses mit größerer Wahrscheinlichkeit verändern als eine Modulation der postsynaptischen Übertragung dies täte (siehe Kapitel 1.2.2).

In keiner der vorliegenden Versuchsgruppen zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der PPR vor und nach dBS-Applikation. Somit konnte kein präsynaptischer Mechanismus bei der Expression der LTP nachgewiesen werden.



**Abbildung 20. Übersicht der PPR vor und nach dBS**

Dargestellt ist das Doppelpulsverhältnis (PPR) vor und nach dBS-Applikation in den einzelnen Versuchsgruppen. Gestreift: vor dBS-Applikation. Einfarbig: nach dBS-Applikation. Von links nach rechts: Kontrolle; L-NAME; L-NAME + 8-Br-cGMP; L-NAME + 8-Br-cGMP + ZD7288. Fehlerbalken: SEM. Beachte: keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen PPR vor und nach LTP-Induktion.

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, einen Teil der Mechanismen der synaptischen Plastizität der Körnerzell-Synapsen am medialen Tractus perforans in Abhängigkeit vom Alter der Versuchstiere aufzudecken. Obwohl die allgemeinen Prinzipien von synaptischer Plastizität heute gesichert sind (21,40), gibt es doch weiterhin Debatten um die tieferliegenden zellulären Mechanismen (25). Gerade die Rolle von Stickstoffmonoxid bei der neuronalen Homöostase konnte – im Gegensatz zu dessen Rolle im Gefäßsystem – noch nicht abschließend bestimmt werden (2,41,59). Noch weniger klar ist die Bedeutung der HCN-Kanäle für die Funktion der synaptischen Plastizität (69). Die altersabhängige Expression dieser Kanäle am medialen Tractus perforans (MPP) (15) ist jedoch ein Hinweis, den diese Arbeit aufgreifen soll.

### 4.1 Das in-vitro-Modell der synaptischen Plastizität

Trotz jahrzehntelanger Forschung sind noch nicht alle Funktionsmechanismen des Hippocampus aufgeklärt. Da dieser aber eine so zentrale Rolle in der Funktion des Gedächtnisses spielt, wird dieses Gebiet nach wie vor intensiv erforscht. Dies geschieht in der Hoffnung, dass ein umfassendes Verständnis des Hippocampus auch zu einem tieferen Verständnis der Gedächtnis-Funktion und ihrer Störungen beiträgt (25,108). Obwohl die Morphologie des Hippocampus sich zwischen Nagetieren und Menschen durchaus unterscheidet, ist die histologische Struktur dieser Formation über die beiden Spezies stark konserviert und im prinzipiellen Aufbau gleich (1). So lassen sich grundlegende Funktionen des Hippocampus im Tiermodell gut untersuchen (109).

Die Mechanismen der synaptischen Plastizität werden im Experiment vor allem mit dem Modell der Langzeitpotenzierung untersucht (32). Der Vorteil dieser Methode ist, dass Ergebnisse standardisiert darstellbar sind und eine quantitative Auswertung erlauben. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Quantifizierung der Wert der Steilheit gewählt, durch den die Kinetik der fEPSPs am besten abgebildet ist. Weiterhin lassen sich durch Doppelpuls-Stimulation sofort der mediale und laterale Anteil des Tractus perforans differenzieren (15), was für die vorliegenden Untersuchungen unverzichtbar war.

Im Vergleich zu anderen Mechanismen neuronaler Plastizität, wie zum Beispiel dendritischer Integration, astrozytärer Modulation oder zellweiten Veränderungen zur

Speicherung von Informationen, ist die Langzeitpotenzierung ein Untersuchungsgegenstand, der leicht zu standardisieren ist (110–114). Auch die Fähigkeit hippocampaler Neurone zur adulten Neurogenese trägt möglicherweise zur Gedächtnisleistung bei (6). Somit ist klar, dass Langzeitpotenzierung nur einer von mehreren zellulären Mechanismen zur Ausbildung von Gedächtnis ist (25).

In der Kontroll-Versuchsgruppe P9–15 sollte die LTP der Körnerzell-Synapsen am MPP von früh-postnatalen Versuchstieren quantifiziert werden. Bei der Wiederholung der Versuche unter Hinzugabe von Blockern und Analoga der Effektoren des vermuteten Signalwegs wurde ein quantitativer Unterschied herausgearbeitet, der Aufschluss geben soll über die Funktion der NO-Synthase an diesen Synapsen.

Durch Normierung der Versuche wurden Unterschiede zu anderen Versuchsaufbauten auf ein Minimum reduziert. Auch die ermittelte LTP unter Kontrollbedingungen mit  $(156 \pm 8) \%$  ist gut mit der Literatur vereinbar (25).

## **4.2 Die NOS-Blockade am medialen Tractus perforans**

Um auf die Funktion der NO-Synthase an den Körnerzell-Synapsen des MPP zu schließen, wurde diese in einer Versuchsgruppe (P9–15, L-NAME) blockiert. Durch identischen Versuchsaufbau und identische Auswertung wurde gewährleistet, dass quantitative Unterschiede der Langzeitpotenzierung tatsächlich auf die Blockade der NO-Synthase zurückgehen. Die Konzentration von L-NAME in der Versuchslösung lag mit  $100 \mu\text{M}$  ausreichend über der mittleren inhibitorischen Konzentration von  $70 \mu\text{M}$ . Die durchgeführten Versuche zeigten, dass die Synthese von Stickstoffmonoxid durch die NO-Synthase unerlässlich ist für die Ausbildung der Langzeitpotenzierung an diesen Synapsen.

Dass Stickstoffmonoxid am medialen Tractus perforans eine Wirkung auf die synaptische Plastizität hat, wurde bereits gezeigt (98). Es wurde unter anderem die Langzeitdepression (LTD) untersucht, wobei sich herausstellte, dass NO den Betrag der LTD signifikant verringerte. Dieser Effekt zeigte sich, wie in der vorliegenden Arbeit, nur bei früh-postnatalen Tieren (P9–15) (98). Der Wirkort des neuronal synthetisierten Stickstoffmonoxids ist nicht auf eine Seite der Synapse festgelegt. Doch die Aktivierung der neuronalen NO-Synthase (nNOS) erfolgt in der Regel über den NMDAR-abhängigen Calcium-Influx an der postsynaptischen Membran (115). Da dieses Signal auch die Transduktion der LTP vermittelt (40), ist ein Zusammenhang dieser Prozesse nicht unwahrscheinlich. Tatsächlich wurde beschrieben, dass

postsynaptisch gebildetes NO mittels präsynaptisch gebildetem cGMP zur LTP kultivierter hippocampaler Synapsen beiträgt (62,64,104). Synthese-Geschwindigkeit und Effekt-Radius lassen solch eine Rolle von Stickstoffmonoxid durchaus zu (48,56). Allerdings wurde unabhängig von der NMDAR-Aktivierung eine Aktivität der NO-Synthase nachgewiesen, die zwar auch an der präsynaptischen Membran wirkt, aber eher homöostatischen Charakter hat (46,65). Ebenso wurde ein NO-Effekt auf die NMDA-Rezeptoren beobachtet, der abhängig von postsynaptischen HCN-Kanälen war (73). Auch wenn die Wirkung von NO im Nervensystem bei weitem noch nicht vollständig beschrieben ist, konnte seine Einbindung in grundlegende neurophysiologische Prozesse schon gezeigt werden. Die beschriebenen Effekte über HCN-Kanäle sprächen hier in erster Linie für eine Regulation der passiven Membraneigenschaften, sei es an der prä- oder an der postsynaptischen Membran (siehe Kapitel 1.4.2).

Es konnte in der vorliegenden Arbeit klar herausgearbeitet werden, dass an den Körnerzell-Synapsen des MPP früh-postnataler Ratten ohne die Synthese von Stickstoffmonoxid keine signifikante Langzeitpotenzierung mehr möglich ist (siehe Kapitel 3.1). Bei adulten Tieren findet man diesen Effekt nicht mehr. Das ist ein erster Hinweis auf die möglichen Ursachen. Da nur die früh-postnatalen Tiere HCN-Kanäle an den Körnerzell-Synapsen des MPP exprimieren und auch nur diese Tiere von der NO-Blockade betroffen sind, müssen die HCN-Kanäle als möglicher Effektor des NO-Signals genauer untersucht werden.

### **4.3 Rekonstruktion des NO-Signalwegs**

Die Wirkung von Stickstoffmonoxid (NO) im Gefäßsystem ist weitgehend bekannt und hat seit langem einen festen Platz in der Therapie von Krankheitsbildern wie dem der Angina pectoris (50). Von dort und aus Studien an Hirngewebe ist bekannt, dass NO in erster Linie über die Aktivierung der Guanylatcyclase und die Bildung von cGMP seine Wirkung vermittelt (2,58). Mittels eines sogenannten Rettungsversuches wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern dieser Signalweg auch der NO-Wirkung auf die synaptische Übertragung zugrundeliegt. Zu diesem Zweck wurden die Versuche unter Hinzugabe des cGMP-Analogons 8-Bromoguanosin-3',5'-Cyclomonophosphat (8-Br-cGMP) wiederholt. Sollte NO seine Wirkung auf die LTP an den untersuchten Synapsen über cGMP vermitteln, so wäre in Anwesenheit des NO-

Synthase-Blockers L-NAME und des cGMP-Analogons 8-Br-cGMP ein Betrag der LTP wie unter Kontroll-Bedingungen zu erwarten.

Wie in Kapitel 3 beschrieben, kann genau dieser Effekt beobachtet werden. Durch Blockade der NOS ist der Betrag der LTP statistisch signifikant niedriger, und unterscheidet sich nicht mehr vom Ausgangswert der fEPSP-Steilheit. Zwischen dem Betrag der LTP unter Kontrollbedingungen und dem Betrag der LTP unter NOS-Blockade und cGMP-Analogen findet sich hingegen kein statistisch signifikanter Unterschied. Daraus lässt sich folgern, dass der Effekt der NOS-Blockade durch Zugabe eines cGMP-Analogons ganz aufgehoben wird und NO seine Wirkung über die Bildung von cGMP vermittelt. Sollten andere Zweige des NO-Signalwegs vorliegen, wären diese jedenfalls nicht durch die eingesetzte Versuchsanordnung zu registrieren. Diese Zweige würden die Modulation präsynaptischer Proteine umfassen, wie SNAP25, munc18 oder VAMP, welche über die Bildung von Nitrosothiol-Gruppen erfolgt (55).

NO kann seine Wirkung auf beiden Seiten der Synapse entfalten, da sein Diffusionsradius groß genug ist, um den synaptischen Spalt zu überwinden (56). Aus diesem Grund wurde schon früh die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass Stickstoffmonoxid als retrogrades Sekundärsignal (*engl. retrograde second messenger*) fungieren könnte (51,62). An CA1-Neuronen des Hippocampus wurde dann auch eine NO-Wirkung auf die LTP beschrieben, indem durch Einbringen von NO-Blockern ins präsynaptische Axon die Expression der LTP verhindert (62) sowie durch die Applikation eines cGMP-Analogons ins präsynaptische Axon die LTP induziert werden konnte (64,104). An den CA1-Neuronen konnten später auch sowohl ein präsynaptischer Effekt von HCN-Kanälen auf die Glutamat-Ausschüttung (65) als auch ein postsynaptischer Effekt von HCN-Kanälen auf die NMDA-Rezeptor-Ströme (73) beobachtet werden, die beide vom NO/cGMP-Signalweg abhängen und an der Expression der LTP an diesen Synapsen mitwirken.

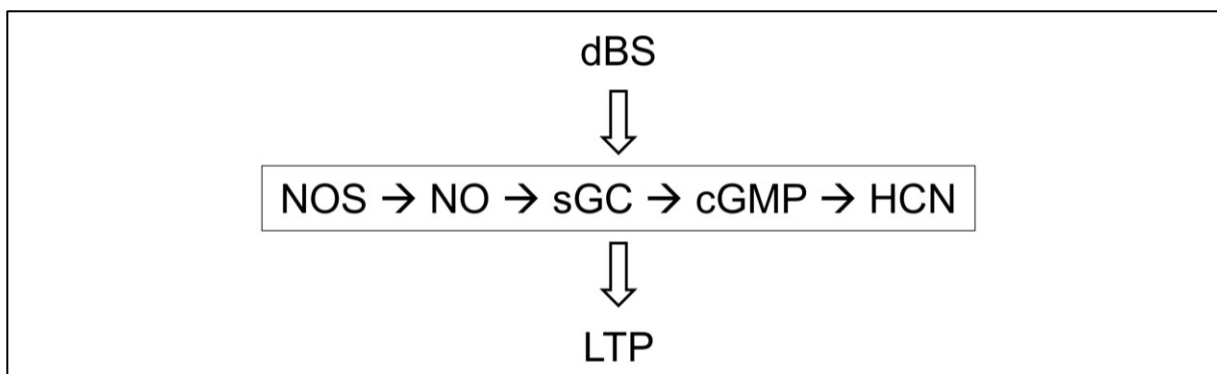
Für die Körnerzell-Synapsen des MPP, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, gab es dagegen noch keine elektrophysiologischen Untersuchungen bezüglich dieses Mechanismus (15). Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass HCN-Kanäle an diesen Synapsen eine besondere Rolle spielen, da sie nur im früh-postnatalen Stadium der Entwicklung, und nur präsynaptisch nachweisbar sind (15). Es lag also nahe, einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem oben



beschriebenen NO/cGMP-Signalweg und den präsynaptischen HCN-Kanälen des MPP zu untersuchen.

Nachdem in den ersten Versuchsgruppen der NO/cGMP-Signalweg als Transduktor der LTP bei früh-postnatalen Tieren beobachtet werden konnte, wurde in einem nächsten Schritt geprüft, ob präsynaptische HCN-Kanäle ein Effektor des cGMP-Signals sind. Hierzu wurde zusätzlich zur Pharmaka-Applikation im Rettungsversuch (siehe Kapitel 3.2.1) der HCN-Kanal-Blocker ZD7288 in die Versuchslösung gegeben. An den Körnerzell-Synapsen des MPP adulter Tiere hatte ZD7288 keinerlei Effekte, sodass eine akzidentelle Blockade von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen oder Glutamat-Rezeptoren sehr unwahrscheinlich ist.

Sollte cGMP beispielsweise über Proteinkinasen noch auf anderen Wegen als dem beschriebenen zur LTP beitragen, wäre trotz dieser weiteren Blockade eine LTP mit einem signifikanten Betrag über dem Ausgangs-fEPSP zu erwarten. Stattdessen aber zeigte sich unter der zusätzlichen Applikation des HCN-Kanal-Blockers eine vollständige Verhinderung der LTP-Expression (siehe Kapitel 3.2.2). In der statistischen Auswertung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Blockade der NO-Synthase und der Blockade der HCN-Kanäle gefunden werden. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten eine Signalkaskade von der NO-Synthase über cGMP bis zu den HCN-Kanälen (siehe Kapitel 3.2.3).



**Abbildung 21. Schema der Signalkaskade am MPP**

dBS: *delta burst stimulation*, NOS: NO-Synthase, NO: Stickstoffmonoxid, sGC: lösliche Guanylatcyclase (*engl. soluble guanylyl cyclase*), cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat, HCN: HCN-Kanäle (*engl. hyperpolarization activated, cyclic nucleotide gated, non-selective cation channels*), LTP: Langzeitpotenzierung (*engl. long-term potentiation*).

#### 4.4 Differenzierung prä- und postsynaptischer Prozesse

Die durchgeführten Versuche allein zeigen nicht, welcher Schritt der oben beschriebenen Kaskade wo lokalisiert ist. Die Literatur jedoch beschreibt die HCN-

Kanäle als präsynaptisch (15), während die NO-Synthase in der Regel postsynaptisch liegt (115).

Die Differenzierung von prä- und postsynaptischen Prozessen erfolgt über die Analyse des Doppelpulsverhältnisses (*eng. paired pulse ratio*, PPR). Eine Änderung der PPR zeigt hierbei eine Veränderung der Freisetzungswahrscheinlichkeit der präsynaptischen Transmitter an (siehe Kapitel 1.2.2).

Wie aus der Auswertung der dBS-Versuche unter Kontrollbedingungen hervorgeht, findet keine signifikante Änderung der PPR statt, obwohl eine LTP exprimiert wird. Es handelt sich bei der Expression der LTP an den Körnerzell-Synapsen des früh-postnatalen Gyrus dentatus also wahrscheinlich um einen postsynaptischen Prozess. Aufgrund der präsynaptischen Lokalisation der HCN-Kanäle würde man in den folgenden Versuchsreihen eine Änderung der PPR als Zeichen präsynaptischer Prozesse erwarten. Stattdessen findet sich jedoch auch hier keine signifikante Änderung der PPR. Hierfür gibt es zwei verschiedene Erklärungen: 1) Entweder der NO-Signalweg vermittelt seinen Effekt an der postsynaptischen Membran oder 2) er ist nicht an der Expression, sondern an der Induktion der LTP beteiligt.

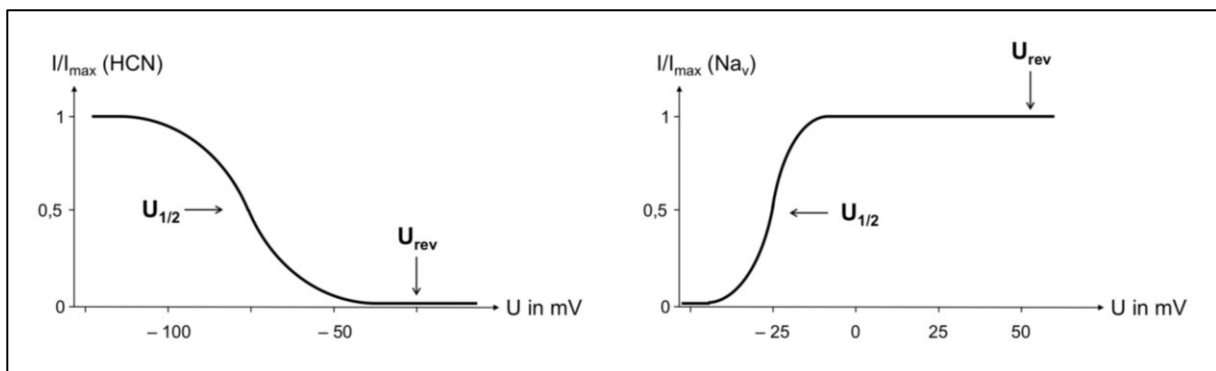
#### **4.5 Die Rolle der HCN-Kanäle bei der Langzeitpotenzierung**

In den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass an den Körnerzell-Synapsen im Gyrus dentatus früh-postnataler Tiere die Expression der Langzeitpotenzierung von den HCN-Kanälen abhängt (siehe Kapitel 3.2.2). Für weitere Aussagen wären intrazelluläre Messungen der applizierten Protokolle wünschenswert (116). Hierbei könnten prä- und postsynaptische Prozesse noch weiter aufgeschlüsselt werden.

Ungeachtet dessen muss jedoch beachtet werden, dass die im Versuch blockierten HCN-Kanäle nur präsynaptisch nachgewiesen wurden (15). Man muss hier also davon ausgehen, dass die beobachtete Signalkaskade (siehe Abbildung 21) ihren Effekt an der präsynaptischen Membran vermittelt. Da die Expression der LTP aber postsynaptisch erfolgt (siehe Kapitel 4.4), hat der beobachtete Effekt wahrscheinlich nur einen permissiven Charakter, indem er die Transduktion der LTP ermöglicht. Hierbei gilt es auch zu beachten, dass in adulten Tieren mit der Expression der präsynaptischen HCN-Kanäle auch die Abhängigkeit der LTP von der NO-Synthase fehlt (siehe Kapitel 3.1.3). Durch welche Veränderungen die Synapsen im adulten Gewebe dazu in der Lage sind, ohne HCN-Kanäle und NO/cGMP-Signalweg eine LTP

zu exprimieren, wird diese Arbeit nicht klären können. Die besonderen Eigenschaften der früh-postnatalen Synapse werden im Folgenden erörtert.

An Kulturen embryonaler Hippocampus-Neurone wurde ein retrograder NO-Signalweg beschrieben, der durch postsynaptische NMDA-Rezeptoren initiiert wird und präsynaptisch die Vesikel-Endozytose verstärkt (60). Hieraus resultiert eine Erhöhung der zur Verfügung stehenden Menge des Neurotransmitters und damit eine Verstärkung des elektrischen Signals an der postsynaptischen Membran. Zwar ist die Analogie dieses NO/cGMP-Signalwegs zum vorliegenden Versuch offensichtlich, jedoch ist der Effektor des dort beschriebenen Signalwegs das PIP2-Molekül (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat), welches die Vesikel-Endozytose auf mehreren Ebenen reguliert (60). Diese Regulierung umfasst die an der Endozytose mitwirkenden Proteine Clathrin (117–119), Dynamin (120,121), Synaptojanin (122), und Aktin (123) sowie die Regulierung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle (124). Letztere seien aber nicht für den beobachteten NO- und damit PIP2-Effekt verantwortlich (60). Es zeigt sich dort, dass NO – vor allem in unreifen hippocampalen Neuronen – durchaus an der Homöostase der synaptischen Tätigkeit mitwirkt, und zwar als retrogrades interzelluläres Signal. Die Experimente der hier vorliegenden Arbeit legen für die untersuchten Synapsen nahe, dass NO seine Wirkung zu einem nicht unerheblichen Teil über HCN-Kanäle vermittelt.



**Abbildung 22. Aktivierungskurven von  $I_h$  und  $I_{Na}$**

Links: Der Strom  $I_h$  wird durch Depolarisation inaktiviert. Die Nähe des Umkehrpotentials  $U_{rev}$  zum Umkehrpunkt der Kurve  $U_{1/2}$  begründet die ambivalenten Eigenschaften dieses Stroms. Rechts: Die Aktivierungskurve der spannungsabhängigen Natrium-Kanäle. Das Umkehrpotential  $U_{rev}$  liegt weit entfernt vom physiologischen Membranpotential. Hierdurch ist der Strom  $I_{Na}$  per definitionem depolarisierend. Modifiziert nach (68).

HCN-Kanäle erfüllen an der Zellmembran im Wesentlichen zwei Funktionen. Sie steuern einerseits die elektrische Erregung der Zelle, wie beispielsweise im Sinusknoten des Herzens, und kontrollieren andererseits die Reaktion einer Synapse

auf erregende Signale (68). Da letzteres in den vorliegenden Untersuchungen der Fall ist, verdient besonders dieser Aspekt eine tiefergehende Betrachtung.

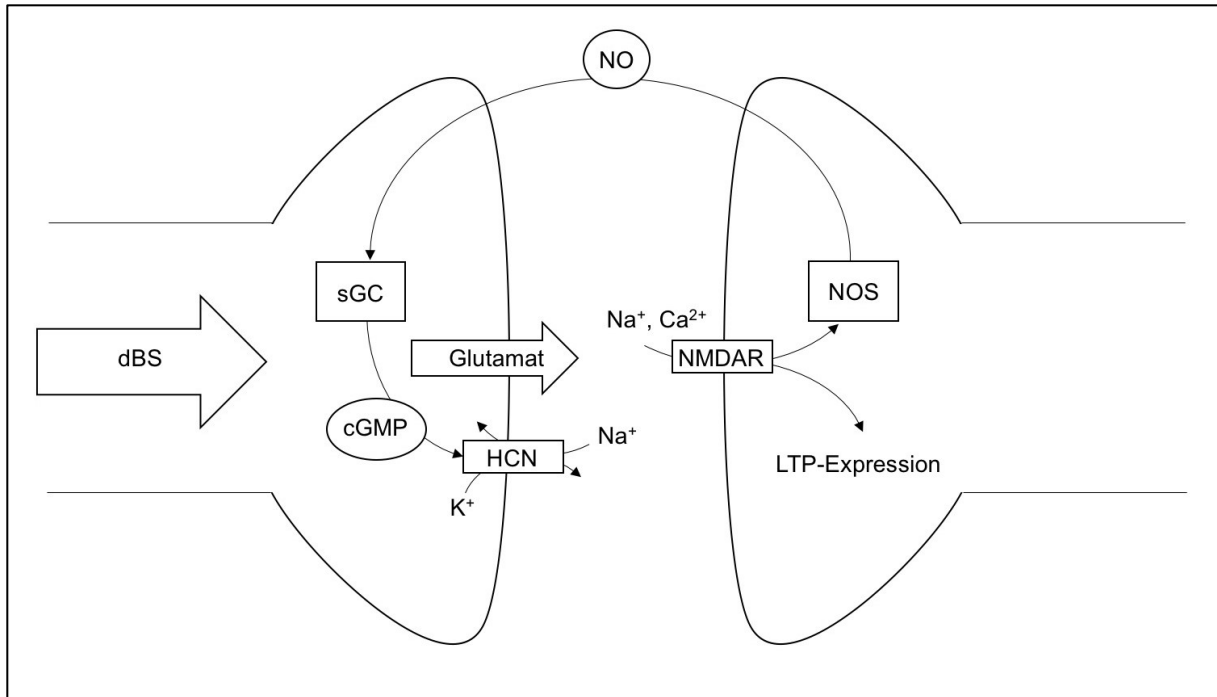
Im Gegensatz zu anderen depolarisierenden Strömen, wie dem Natrium-Strom des Aktionspotentials der Neurone und dem Calcium-Strom des Aktionspotentials der Myozyten, liegt das Umkehrpotential des  $I_h$  relativ nah am Ruhemembranpotential und dem Median seiner Aktivierungskurve  $U_{1/2}$  (68,125) (siehe Abbildung 22). Während  $U_{1/2}$  etwa  $-80$  mV beträgt (109,126), liegt das Umkehrpotential  $U_{rev}$  bei etwa  $-25$  mV (68,125). Bei einem typischen Ruhemembranpotential eines Neurons von  $-70$  mV sind die HCN-Kanäle also teilweise geöffnet und erzeugen einen depolarisierenden Strom  $I_h$ . Eine Hyperpolarisation der Zellmembran geht entsprechend der Aktivierungskurve mit einer Aktivierung der Kanäle einher, wodurch das Membranpotential wieder in Richtung ihres Umkehrpotentials und des Ruhemembranpotentials depolarisiert wird. Diesen Vorgang kann man als depolarisierende Aussackung des Potentials (*engl. "depolarizing voltage sag"*) im Experiment beobachten (127). Wird die Zellmembran hingegen depolarisiert, werden die HCN-Kanäle deaktiviert und der Wegfall ihres depolarisierenden Stroms  $I_h$  führt zur Hyperpolarisation in Richtung des Ruhemembranpotentials, welche als hyperpolarisierende Aussackung des Potentials (*engl. "hyperpolarizing voltage sag"*) bezeichnet wird (127). Durch diese repolarisierenden Eigenschaften tragen die HCN-Kanäle zur Stabilisierung des Membranpotentials bei (128). Es mag diese negative Rückkopplung (68) sein, deretwegen eine Löschung des HCN1-Gens zu einer Verstärkung der LTP an den Synapsen zwischen Tractus perforans und CA1-Region des Hippocampus führt (16). Auch wurde eine reduzierte Expression von HCN-Kanälen an postiktalen Synapsen beobachtet, die mit einer erhöhten Erregbarkeit einherging (129). An den Synapsen der Schaffer-Kollateralen auf die CA1-Region vermitteln die HCN-Kanäle hingegen eine Steigerung der Glutamat-Ausschüttung, die vom NO/cGMP-Signalweg abhängig ist (65). Als Grund hierfür könnte die depolarisierende Funktion des Stromes  $I_h$  in Frage kommen. Unter welchen Umständen aber die beschriebenen Eigenschaften die synaptische Übertragung eher verstärken oder eher hemmen, bleibt trotz vieler Untersuchungen offen (73,98,130–132).

Der permissive Charakter des  $I_h$  für die LTP wurde bereits an neuromuskulären Synapsen von Flusskrebse gezeigt (133). Ähnlich wie in den Experimenten dieser Arbeit war dort der Strom der präsynaptischen HCN-Kanäle entscheidend für die Transduktion der LTP, ohne jedoch direkt an der Expression teilzunehmen. An

anderen Synapsen wirken präsynaptische HCN-Kanäle auch an der Expression der LTP mit (134). Es gibt einige Eigenschaften des Stroms  $I_h$ , die dies erklären können. So senken die HCN-Kanäle den Eingangswiderstand einer Membran (109,125), indem sie durch ihre Offenwahrscheinlichkeit den Gesamtstrom über die Membran erhöhen (68). Dieser *Shunt* führt zu einer verminderten Erregbarkeit der Zellmembran, wodurch diese stabilisiert wird und das schnelle Entstehen von fEPSPs ermöglicht wird (109).

Weiterhin regulieren HCN-Kanäle durch ihre ambivalenten Eigenschaften die Eigenfrequenz einer Synapse, wie unter anderem im Hippocampus gezeigt wurde (135). Während die Kanäle bei niedrigen Frequenzen genug Zeit zum Öffnen haben und so Potentialänderungen entgegenwirken, ist dies bei höheren Frequenzen nicht der Fall, sodass diese eher übertragen werden (68). Indem gleichzeitig die Membranzeitkonstante als Tiefpassfilter fungiert, entsteht eine bevorzugte Frequenz zur Reizweiterleitung (136). Dies spielt für die Funktion des Hippocampus eine entscheidende Rolle (137). Allerdings wurde in Untersuchungen der Körnerzell-Synapsen an humanem epileptischem Gewebe trotz des Hochpassfilters der HCN-Kanäle keine solche bevorzugte Frequenz gefunden (109). Die dort untersuchten HCN-Kanäle lagen allerdings postsynaptisch, sodass ein direkter Vergleich mit den vorliegenden Untersuchungen nicht möglich ist.

Überträgt man diese Überlegungen auf die vorliegenden Ergebnisse, so drängt sich die Schlussfolgerung auf, dass es gerade die passiven Eigenschaften der präsynaptischen Membran sind, die zu den hier beobachteten Effekten führten. Sollte die Expression der HCN-Kanäle und ihre Aktivierung durch NO/cGMP zur Homöostase von Ruhemembranpotential, Eingangswiderstand und eventuell Eigenfrequenz beitragen, würde sich erklären, warum sie für die LTP nötig sind, ohne an ihrer Expression teilzunehmen. Gleichzeitig erscheint es möglich, dass die Synapsen früh-postnataler Tiere gesondert durch HCN-Kanäle reguliert werden müssen, wenn die passiven Eigenschaften der präsynaptischen Membran erst im adulten Gewebe stabilisiert werden. In diesem Zusammenhang geben auch oben genannte Experimente derselben Synapse in epileptischem Hirngewebe erwachsener Patienten weitere Hinweise (109). Dort wurde beschrieben, wie der vermehrte Strom von HCN1-Kanälen die postsynaptische Membran vor überschießenden Depolarisationen schützt, wie sie eben auch im Rahmen epileptischer Anfälle auftreten.



**Abbildung 23. Schematischer Vorschlag eines Modells der LTP-Induktion in Abhängigkeit von NO, cGMP und HCN-Kanälen an den Körnerzell-Synapsen des früh-postnatalen MPP**  
dBS: *delta-burst stimulation*, NMDAR: NMDA-Rezeptor, NOS: NO-Synthase, NO: Stickstoffmonoxid, sGC: lösliche Guanylatcyclase (*engl. soluble guanylyl cyclase*), cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat, HCN: HCN-Kanal, LTP: Langzeitpotenzierung (*engl. long-term potentiation*). Vergleiche Abbildung 4 zur LTP-Expression.

Damit ergibt sich ein Bild von der Funktion der HCN-Kanäle, welche die unreife präsynaptische Membran in ihren passiven Eigenschaften stabilisiert und so die Transduktion der LTP bis zur postsynaptischen Membran erst möglich macht (siehe Abbildung 23). Dass dies vermutlich gerade durch die hemmenden Funktionen des  $I_h$  geschieht, nämlich als Hochpassfilter und elektrischer Shunt, ergibt auch in Hinblick auf die gesteigerte Erregbarkeit früh-postnatalen Hirngewebes Sinn. So könnte dieser Strom die Synapse vor übermäßiger Erregung schützen und dadurch die Übertragung des depolarisierenden Signals auf die postsynaptische Membran gewährleisten.

Die Expression der LTP an den untersuchten Synapsen erfolgt aller Wahrscheinlichkeit nach analog zu den Prozessen, die in der CA1-Region umfangreich experimentell nachgewiesen wurden (siehe Kapitel 1.2.2). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch ein weiterer Prozess experimentell beschrieben werden, der bereits während der Induktion der LTP durch die *delta-burst stimulation* (dBS) und unter Einfluss von NO stattfindet.

## 4.6 Ausblick

Nachdem in der vorliegenden Arbeit viele theoretische Überlegungen über die physiologischen Grundlagen der beschriebenen Ergebnisse angestellt werden

konnten, könnten zukünftige Studien weitergehende Aussagen über die zugrundeliegenden Mechanismen treffen. Hierzu wären intrazelluläre Messungen in Verbindung mit den verwendeten Stimulationsprotokollen nötig, die die elektrische Funktion der HCN-Kanäle an den Körnerzell-Synapsen des medialen Tractus perforans genauer wiedergeben würden. Ebenso könnte die getrennte Untersuchung von prä- und postsynaptischen Potentialen und Strömen die Lokalisation der beteiligten Signalstoffe eindeutig klären. Bis dahin ist die schematische Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 23 nur als vorläufige Arbeitshypothese anzusehen.

Darüberhinaus bleibt die vollständige Charakterisierung weiterer Gruppen von Synapsen, die auch HCN-Kanäle exprimieren, ausstehend.

Die membranstabilisierenden Eigenschaften der HCN-Kanäle könnten sich auch als antikonvulsiv herausstellen, womit eine gewisse klinische Implikation gegeben ist.

Nicht zuletzt weil im klinischen Alltag HCN-Kanal-Blocker wie Ivabradin bereits Teil der kardiologischen Therapie sind, ist ein tiefergehendes Verständnis der HCN-Kanäle im ZNS von Bedeutung. Solch ein Verständnis wird ebenso tiefere Einblicke in das komplexe Zusammenspiel zentralnervöser Aktivität ermöglichen.

## Zusammenfassung

Die Bedeutung des Hippocampus als zentrale anatomische Formation für die Gedächtnisfunktion des Gehirns ist schon lange bekannt. Trotz seines einfachen Aufbaus, der von Nagetieren bis zum Menschen stark konserviert ist, bleibt die Aufdeckung der grundlegenden neurophysiologischen Mechanismen im Hippocampus bis heute eine noch unvollständig gelöste Aufgabe. So ist die Verschaltung der verschiedenen Neuronengruppen gut bekannt, ihr konkretes Zusammenspiel jedoch oft nicht vollkommen klar.

Ein Prozess, der in der CA1-Region des Hippocampus musterhaft und detailliert für die allgemeine Funktionsweise der chemischen Synapse beschrieben wurde, ist die Langzeitpotenzierung. Diese ist ein praktikables Maß für die physiologische Plastizität bestehender Synapsen. So ist die Langzeitpotenzierung ein klares Modell zellulärer Gedächtnisbildung, welches auch im Lernmodell *in vivo* beschrieben wurde. Obwohl Stickstoffmonoxid im Allgemeinen schon lange als mögliches interzelluläres, retrogrades Signal im Rahmen der Langzeitpotenzierung diskutiert wurde, gibt es noch keinen experimentellen Nachweis für diesen Prozess an den Körnerzell-Synapsen im Gyrus dentatus.

Während in der früh-postnatalen Phase an den Körnerzell-Synapsen im Gyrus dentatus die präsynaptische Expression von HCN-Kanälen gezeigt wurde, konnten diese Ionenkanäle bei adulten Tieren nicht nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde der Funktion der HCN-Kanäle an diesen Synapsen und damit dem möglichen Grund für deren altersabhängige Expression nachgegangen.

Durch die Untersuchung von Feldpotentialen konnte in dieser Arbeit nicht nur nachgewiesen werden, dass die Ausbildung der Langzeitpotenzierung vom NO/cGMP-Signalweg abhängig ist, der unter anderem bereits am Gefäßendothel beschrieben wurde. Darüberhinaus legen die vorliegenden Ergebnisse auch nahe, dass dieser Signalweg ebenjene präsynaptischen HCN-Kanäle aktiviert und hierdurch die Langzeitpotenzierung ermöglicht. Bei adulten Tieren konnte dies nicht beobachtet werden, was im Einklang mit den anatomischen Beobachtungen steht.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen in Anbetracht der Literatur vermuten, dass die präsynaptisch gelegenen HCN-Kanäle einen permissiven Charakter für die Expression der Langzeitpotenzierung haben. Ebenso wird nahegelegt, dass NO während der



Induktion der Langzeitpotenzierung postsynaptisch gebildet wird und anschließend zum präsynaptischen Axon diffundiert, um dort die lösliche Guanylatcyclase und sukzessive die HCN-Kanäle zu aktivieren.

So zeigt sich deutlich die Komplexität der Integration neuronaler Signale, da im vorliegenden Fall eine Kaskade von chemischen Signalen die elektrischen Eigenschaften einer anatomisch spezifischen Gruppe von Synapsen altersabhängig moduliert. Damit konnte in der vorliegenden Arbeit ein Beitrag geleistet werden, die grundlegende Funktionsweise der chemischen Synapsen noch genauer aufzuschlüsseln, um die Dynamik sich entwickelnder neuronaler Netzwerke in Zukunft besser erfassen zu können.

## Thesen zur Dissertation

- 1) Der Hippocampus hat als anatomische Formation eine zentrale Bedeutung für die Gedächtnisfunktion des Gehirns. Viele Mechanismen seiner Funktion sind noch nicht vollständig beschrieben.
- 2) Ein neurophysiologischer Mechanismus der Gedächtnisbildung ist die Langzeitpotenzierung an der chemischen Synapse. Die Langzeitpotenzierung wurde beispielhaft in der CA1-Region des Hippocampus beschrieben.
- 3) An den Körnerzell-Synapsen des medialen Tractus perforans im Gyrus dentatus finden sich präsynaptisch altersabhängig exprimierte HCN-Kanäle, deren genaue Funktion noch nicht klar ist.
- 4) Mit einer *delta-burst stimulation* kann an den Körnerzell-Synapsen des MPP eine Langzeitpotenzierung induziert werden.
- 5) Seit langem wird die Rolle von Stickstoffmonoxid als retrogrades Sekundärsignal bei der Ausbildung der Langzeitpotenzierung von chemischen Synapsen diskutiert. Der typische Effektor auf diesem Signalweg ist cGMP. Cyclische Nukleotide wie cGMP aktivieren HCN-Kanäle.
- 6) Die Langzeitpotenzierung an den Körnerzell-Synapsen des MPP früh-postnataler Ratten ist abhängig von der NO-Synthase. Diese findet sich typischerweise postsynaptisch.
- 7) Der Strom über die HCN-Kanäle hat einen permissiven Charakter für die Induktion der Langzeitpotenzierung.
- 8) Es konnte für die Körnerzell-Synapsen am MPP früh-postnataler Ratten ein zusätzlicher Mechanismus der Langzeitpotenzierung beschrieben werden. Postsynaptisch gebildetes Stickstoffmonoxid diffundiert zum präsynaptischen Axon und aktiviert dort über die Bildung von cGMP die HCN-Kanäle.
- 9) Durch diese Ergebnisse wird die Frage aufgeworfen, warum dieser Mechanismus früh-postnatal notwendig ist, und ob er in adulten Tieren ersetzt oder überflüssig wird. Darüberhinaus zeigen sie die Komplexität sich entwickelnder neuronaler Netzwerke und bilden einen Beitrag, diese in Zukunft besser zu erfassen.

## Literaturverzeichnis

1. Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI, 2014. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience* 15(10), 655–69. doi: 10.1038/nrn3785
2. Garthwaite J, 2008. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *European Journal of Neuroscience* 27(11), 2783–802. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06285.x
3. Scoville WB, Milner B, 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 20(11), 11–21.
4. Duvernoy HM, 2005. *The Human Hippocampus. Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI*. 3rd edition. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 217 pages. doi: 10.1007/b138576
5. Herculano-Houzel S, 2009. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in Human Neuroscience* 3, 31. doi: 10.3389/neuro.09.031.2009
6. Stuchlik A, 2014. Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8, 106. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00106
7. Nicholson E, Kullmann DM, 2014. Long-term potentiation in hippocampal oriens interneurons: postsynaptic induction, presynaptic expression and evaluation of candidate retrograde factors. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 369(1633), 20130133. doi: 10.1098/rstb.2013.0133
8. Gurunluoglu R, Shafighi M, Gurunluoglu A, Cavdar S, 2011. Giulio Cesare Aranzio (Arantius) (1530-89) in the pageant of anatomy and surgery. *Journal of Medical Biography* 19(2), 63–9. doi: 10.1258/jmb.2010.010049
9. Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P, 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research* 163, 3–22. doi: 10.1016/S0079-6123(07)63001-5
10. Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T, 2006. Anatomical

- Organization of the Parahippocampal-Hippocampal Network. *Annals of the New York Academy of Sciences* 911(1), 1–24. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06716.x
11. Kesner RP, 2013. An analysis of the dentate gyrus function. *Behavioural Brain Research* 254, 1–7. doi: 10.1016/j.bbr.2013.01.012
  12. Morris AM, Weeden CS, Churchwell JC, Kesner RP, 2013. The role of the dentate gyrus in the formation of contextual representations. *Hippocampus* 23(2), 162–8. doi: 10.1002/hipo.22078
  13. Weeden CSS, Hu NJ, Ho LUN, Kesner RP, 2014. The role of the ventral dentate gyrus in olfactory pattern separation. *Hippocampus* 24(5), 553–9. doi: 10.1002/hipo.22248
  14. Weeden CSS, Roberts JM, Kamm AM, Kesner RP, 2015. The role of the ventral dentate gyrus in anxiety-based behaviors. *Neurobiology of Learning and Memory* 118, 143–9. doi: 10.1016/j.nlm.2014.12.002
  15. Bender RA et al., 2007. Localization of HCN1 channels to presynaptic compartments: novel plasticity that may contribute to hippocampal maturation. *Journal of Neuroscience* 27(17), 4697–706. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4699-06.2007
  16. Nolan MF et al., 2004. A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Cell* 119(5), 719–32. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.020
  17. Harris EW, Cotman CW, 1985. Effects of synaptic antagonists on perforant path paired-pulse plasticity: differentiation of pre- and postsynaptic antagonism. *Brain Research* 334(2), 348–53. doi: 10.1016/0006-8993(85)90230-6
  18. Dietrich D, Beck H, Kral T, Clusmann H, Elger CE, Schramm J, 1997. Metabotropic glutamate receptors modulate synaptic transmission in the perforant path: pharmacology and localization of two distinct receptors. *Brain Research* 767(2), 220–7. doi: 10.1016/S0006-8993(97)00579-9
  19. Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF, 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313(5790), 1093–7. doi: 10.1126/science.1128134

20. Tokay T et al., 2009. HCN1 channels constrain DHPG-induced LTD at hippocampal Schaffer collateral-CA1 synapses. *Learning and Memory* 16(12), 769–76. doi: 10.1101/lm.1556009
21. Bliss TVP, Lomo T, 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology* 232(2), 331–56. doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010273
22. Kullmann DM, Lamsa KP, 2007. Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nature Reviews Neuroscience* 8(9), 687–99. doi: 10.1038/nrn2207
23. Bi G, Poo M, 2001. Synaptic modification by correlated activity: Hebb's postulate revisited. *Annual Review of Neuroscience* 24, 139–66. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.139
24. Hebb DO, 1949. *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. New York: John Wiley & Sons;
25. Volianskis A, France G, Jensen MS, Bortolotto ZA, Jane DE, Collingridge GL, 2015. Long-term potentiation and the role of N-methyl-d-aspartate receptors. *Brain Research Elsevier*; 1621, 5–16. doi: 10.1016/j.brainres.2015.01.016
26. Luscher C, Malenka RC, 2012. NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP / LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, 1–16. doi: 10.1101/cshperspect.a005710
27. Buzsáki G, 2002. Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron* 33(3), 325–40. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00586-X
28. Larson J, Wong D, Lynch G, 1986. Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. *Brain Research* 368(2), 347–50. doi: 10.1016/0006-8993(86)90579-2
29. Larson J, Lynch G, 1986. Induction of synaptic potentiation in hippocampus by patterned stimulation involves two events. *Science* 232(4753), 985–8. doi: 10.1126/science.3704635
30. Tokay T, Kirschstein T, Rohde M, Zschorlich V, Köhling R, 2014. NMDA Receptor-Dependent Metaplasticity by High-Frequency Magnetic Stimulation. *Neural Plasticity* 2014, 1–8. doi: 10.1155/2014/684238

31. Harris EW, Ganong AH, Cotman CW, 1984. Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Research* 323, 132–7. doi: 10.1016/0006-8993(84)90275-0
32. Bliss TVP, Collingridge GL, 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407), 31–9. doi: 10.1038/361031a0
33. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A, 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307(5950), 462–5. doi: 10.1038/307462a0
34. Collingridge GL, Herron CE, Lester RA, 1988. Synaptic activation of N-methyl-D-aspartate receptors in the Schaffer collateral-commissural pathway of rat hippocampus. *The Journal of Physiology* 399, 283–300. doi: 10.1016/0006-8993(88)90011-X
35. Lisman J, Schulman H, Cline H, 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature Reviews Neuroscience* 3(3), 175–90. doi: 10.1038/nrn753
36. Barria A, Derkach V, Soderling T, 1997. Identification of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 272(52), 32727–30. doi: 10.1074/jbc.272.52.32727
37. Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JDB, Molnar E, Somogyi P, 1998. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21(3), 545–59. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80565-6
38. Barco A, Alarcon JM, Kandel ER, 2002. Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell* 108(5), 689–703. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00657-8
39. Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J, 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences Elsevier Ltd*; 33(3), 121–9. doi: 10.1016/j.tins.2010.01.001
40. Bliss TVP, Collingridge GL, 2013. Expression of NMDA receptor-dependent LTP

- in the hippocampus: bridging the divide. *Molecular Brain* 6, 5. doi: 10.1186/1756-6606-6-5
41. Padamsey Z, Emptage N, 2013. Two sides to long-term potentiation: a view towards reconciliation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369(1633), 20130154–20130154. doi: 10.1098/rstb.2013.0154
  42. Dolphin AC, Errington ML, Bliss TVP, 1982. Long-term potentiation of the perforant path in vivo is associated with increased glutamate release. Vol. 297, *Nature*. p. 496–7. doi: 10.1038/297496a0
  43. Malgaroli A et al., 1995. Presynaptic component of long-term potentiation visualized at individual hippocampal synapses. *Science* 268, 1624–8. doi: 10.1126/science.7777862
  44. Kullmann DM, Erdemli G, Asztély F, 1996. LTP of AMPA and NMDA receptor-mediated signals: Evidence for presynaptic expression and extrasynaptic glutamate spill-over. *Neuron* 17(3), 461–74. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80178-6
  45. Schulz PE, Cook EP, Johnston D, 1994. Changes in paired-pulse facilitation suggest presynaptic involvement in long-term potentiation. *Journal of Neuroscience* 14(9), 5325–37.
  46. Taqatqeh F, Mergia E, Neitz A, Eysel UT, Koesling D, Mittmann T, 2009. More than a retrograde messenger: nitric oxide needs two cGMP pathways to induce hippocampal long-term potentiation. *Journal of Neuroscience* 29(29), 9344–50. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1902-09.2009
  47. Phillips KG, Hardingham NR, Fox K, 2008. Postsynaptic Action Potentials Are Required for Nitric-Oxide-Dependent Long-Term Potentiation in CA1 Neurons of Adult GluR1 Knock-Out and Wild-Type Mice. *Journal of Neuroscience* 28(52), 14031–41. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3984-08.2008
  48. Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S, 1989. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(13), 5159–62. doi: 10.1073/pnas.86.13.5159

49. Zhuo M, Small SA, Kandel ER, Hawkins RD, 1993. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science* 260(June), 1946–50. doi: 10.1126/science.8100368
50. Münzel T, Steven S, Daiber A, 2014. Organic nitrates: update on mechanisms underlying vasodilation, tolerance and endothelial dysfunction. *Vascular Pharmacology* 63(3), 105–13. doi: 10.1016/j.vph.2014.09.002
51. O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O, 1991. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(24), 11285–9. doi: 10.1073/pnas.88.24.11285
52. Haley JE, Wilcox GL, Chapman PF, 1992. The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 8(2), 211–6. doi: 10.1016/0896-6273(92)90288-O
53. Bon CLM, Garthwaite J, 2003. On the Role of Nitric Oxide in Hippocampal Long-Term Potentiation. *The Journal of Neuroscience* 23(5), 1941–8.
54. Montalescot G et al., 2013. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease. *European Heart Journal* 34(38), 2949–3003. doi: 10.1093/eurheartj/eh296
55. Hardingham N, Dachtler J, Fox K, 2013. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7, 190. doi: 10.3389/fncel.2013.00190
56. Hall CN, Garthwaite J, 2009. What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric Oxide The Authors*; 21(2), 92–103. doi: 10.1016/j.niox.2009.07.002
57. Duport S, Garthwaite J, 2005. Pathological consequences of inducible nitric oxide synthase expression in hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 135, 1155–66. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.035
58. Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F, 2004. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Research Bulletin* 62, 505–15. doi: 10.1016/S0361-9230(03)00102-3
59. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R, 1988. Endothelium-derived



- relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336(6197), 385–8. doi: 10.1038/336385a0
60. Micheva KD, Buchanan J, Holz RW, Smith SJ, 2003. Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Nature Neuroscience* 6(9), 925–32. doi: 10.1038/nn1114
61. Mizutani A, Saito H, Abe K, 1993. Involvement of nitric oxide in long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *Brain Research* 605(2), 309–11. doi: 10.1016/0006-8993(93)91756-i
62. Arancio O, 1996. Nitric Oxide Acts Directly in the Presynaptic Neuron to Produce Long-Term Potentiation in Cultured Hippocampal Neurons. *Cell* 87(6), 1025–35. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81797-3
63. Williams JH, Li YG, Nayak A, Errington ML, Murphy KPSJ, Bliss TVP, 1993. The suppression of long-term potentiation in rat hippocampus by inhibitors of nitric oxide synthase is temperature and age dependent. *Neuron* 11(5), 877–84. doi: 10.1016/0896-6273(93)90117-a
64. Arancio O et al., 2001. Presynaptic role of cGMP-dependent protein kinase during long-lasting potentiation. *Journal of Neuroscience* 21(1), 143–9.
65. Neitz A, Mergia E, Eysel UT, Koesling D, Mittmann T, 2011. Presynaptic nitric oxide/cGMP facilitates glutamate release via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in the hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 33(9), 1611–21. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07654.x
66. Serulle Y, Arancio O, Ziff E, 2009. A role for cGMP-dependent protein kinase II in AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Channels (Austin)* 2(4), 230–2. doi: 10.4161/chan.2.4.6391
67. Wang HG et al., 2005. Presynaptic and postsynaptic roles of NO, cGK, and RhoA in long-lasting potentiation and aggregation of synaptic proteins. *Neuron* 45(3), 389–403. doi: 10.1016/j.neuron.2005.01.011
68. Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X, 2009. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiological Reviews* 89(3), 847–85. doi: 10.1152/physrev.00029.2008

69. He C, Chen F, Li B, Hu Z, 2014. Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. *Progress in Neurobiology* 112, 1–23. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.10.001
70. Noma A, Irisawa H, 1976. Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* 364(1), 45–52. doi: 10.1007/bf01062910
71. Wahl-Schott C, Biel M, 2009. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(3), 470–94. doi: 10.1007/s00018-008-8525-0
72. Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M, 1998. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393(6685), 587–91. doi: 10.1038/31255
73. Neitz A et al., 2013. Postsynaptic NO/cGMP Increases NMDA Receptor Currents via Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels in the Hippocampus. *Cerebral Cortex*. doi: 10.1093/cercor/bht048
74. Matsuyoshi H et al., 2006. Expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels in rat dorsal root ganglion neurons innervating urinary bladder. *Brain Research* 1119(1), 115–23. doi: 10.1016/j.brainres.2006.08.052
75. Chaplan SR et al., 2003. Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience* 23(4), 1169–78. doi: 23/4/1169 [pii]
76. Noam Y, Bernard C, Baram TZ, 2011. Towards an integrated view of HCN channel role in epilepsy. *Current Opinion in Neurobiology* Elsevier Ltd; 21(6), 873–9. doi: 10.1016/j.conb.2011.06.013
77. Lewis AS, Chetkovich DM, 2011. HCN channels in behavior and neurological disease: too hyper or not active enough? *Molecular and Cellular Neurosciences* 46(2), 357–67. doi: 10.1016/j.mcn.2010.11.007
78. Kitayama M et al., 2003. Ih blockers have a potential of antiepileptic effects. *Epilepsia* 44(1), 20–4. doi: 10.1046/j.1528-1157.2003.22702.x
79. Chan CS et al., 2011. HCN channelopathy in external globus pallidus neurons

- in models of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience* Nature Publishing Group; 14(1), 85–92. doi: 10.1038/nn.2692
80. Macri V, Angoli D, Accili EA, 2012. Architecture of the HCN selectivity filter and control of cation permeation. *Scientific Reports* 2, 894. doi: 10.1038/srep00894
81. Männikkö R, Elinder F, Larsson HP, 2002. Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature* 419(2001), 837–41. doi: 10.1038/nature01038
82. Accili EA, Proenza C, Baruscotti M, DiFrancesco D, 2002. From funny current to HCN channels: 20 years of excitation. *News in Physiological Sciences* 17(0886–1714 SB–IM), 32–7.
83. Harzheim D et al., 2008. Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP. *The EMBO Journal* 27(4), 692–703. doi: 10.1038/emboj.2008.3
84. DiFrancesco D, Tromba C, 1988. Inhibition of the hyperpolarization-activated current (if) induced by acetylcholine in rabbit sino-atrial node myocytes. *The Journal of Physiology* 405(1988), 477–91.
85. Buzsaki G, Bickford RG, Ponomareff G, Thal LJ, Mandel R, Gage FH, 1988. Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. *The Journal of Neuroscience* 8(11), 4007–26.
86. McCormick DA, Contreras D, 2001. On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annual Review of Physiology* 63, 815–46. doi: 10.1146/annurev.physiol.63.1.815
87. Gray CM, Singer W, 1989. Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(5), 1698–702. doi: 10.1073/pnas.86.5.1698
88. Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ, 1993. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science (New York, NY)* 262(5134), 679–85. doi: 10.1126/science.8235588
89. McCormick DA, Bal T, 1997. Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annual Review of Neuroscience* 20, 185–215. doi: 10.1146/annurev.neuro.20.1.185

90. Pape H-C, Mager R, 1992. Nitric oxide controls oscillatory activity in thalamocortical neurons. *Neuron* 9(3), 441–8. doi: 10.1016/0896-6273(92)90182-d
91. Arnsten AFT, 2007. Catecholamine and second messenger influences on prefrontal cortical networks of “representational knowledge”: a rational bridge between genetics and the symptoms of mental illness. *Cerebral Cortex* 17 Suppl 1, i6-15. doi: 10.1093/cercor/bhm033
92. Ulrich D, 2002. Dendritic resonance in rat neocortical pyramidal cells. *Journal of Neurophysiology* 87(6), 2753–9.
93. Hutcheon B, Yarom Y, 2000. Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends in Neurosciences* 23(5), 216–22. doi: 10.1016/S0166-2236(00)01547-2
94. Nolan MF et al., 2003. The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell* 115(5), 551–64. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00884-5
95. Beaumont V, Zucker RS, 2000. Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic Ih channels. *Nature Neuroscience* 3(2), 133–41. doi: 10.1038/72072
96. Chevaleyre V, Castillo PE, 2002. Assessing the role of Ih channels in synaptic transmission and mossy fiber LTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(14), 9538–43. doi: 10.1073/pnas.142213199
97. Huang Z et al., 2011. Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses. *Nature Neuroscience* 14(4), 478–86. doi: 10.1038/nn.2757
98. Guli X, Tokay T, Rohde M, Bender RA, Kohling R, Kirschstein T, 2012. ZD7288 enhances long-term depression at early postnatal medial perforant path-granule cell synapses. *Neural Plasticity* 2012, 237913. doi: 10.1155/2012/237913
99. Bender RA, Galindo R, Mameli M, Gonzalez-vega R, Valenzuela F, Baram TZ, 2005. Synchronized network activity in developing rat hippocampus involves regional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel

- function. *European Journal of Neuroscience* 22(10), 2669–74. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04407.x
100. Lau YT et al., 2011. Effects of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel blockers on the proliferation and cell cycle progression of embryonic stem cells. *Pflügers Archiv (European Journal of Physiology)* 461(1), 191–202. doi: 10.1007/s00424-010-0899-9
101. Postea O, Biel M, 2011. Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery* 10(December), 903–14. doi: 10.1038/nrd3576
102. Wu X, Liao L, Liu X, Luo F, Yang T, Li C, 2012. Is ZD7288 a selective blocker of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel currents? *Channels (Austin)* 6(6), 438–42. doi: 10.4161/chan.22209
103. Chen C, 2004. ZD7288 inhibits postsynaptic glutamate receptor-mediated responses at hippocampal perforant path-granule cell synapses. *European Journal of Neuroscience* 19(3), 643–9. doi: 10.1111/j.0953-816X.2003.03174.x
104. Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD, 1995. Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. Vol. 376, *Nature*. p. 74–80. doi: 10.1038/376074a0
105. Ueno S, Bracamontes J, Zorumski C, Weiss DS, Steinbach JH, 1997. Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABA<sub>A</sub> receptor. *The Journal of Neuroscience* 17(2), 625–34.
106. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S, 1990. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *British Journal of Pharmacology* 101(3), 746–52.
107. Pfeiffer S, Leopold E, Schmidt K, Brunner F, Mayer B, 1996. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *British Journal of Pharmacology* 118(6), 1433–40. doi: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15557.x
108. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RGM, 2000. Synaptic plasticity and memory: An Evaluation of the Hypothesis. *Annual Review of Neuroscience* , 649–711. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.649
109. Stegen M, Kirchheim F, Hanuschkin A, Staszewski O, Veh RW, Wolfart J, 2012.

- Adaptive intrinsic plasticity in human dentate gyrus granule cells during temporal lobe epilepsy. *Cerebral Cortex* 22(9), 2087–101. doi: 10.1093/cercor/bhr294
110. Bliss TVP, Collingridge GL, Morris RGM, 2014. Synaptic plasticity in health and disease: introduction and overview. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 369(1633), 20130129. doi: 10.1098/rstb.2013.0129
111. Wang Z, Xu NL, Wu CP, Duan S, Poo MM, 2003. Bidirectional changes in spatial dendritic integration accompanying long-term synaptic modifications. *Neuron* 37(3), 463–72. doi: 10.1016/S0896-6273(02)01189-3
112. Sjöström PJ, Rancz E a, Roth A, Häusser M, 2008. Dendritic excitability and synaptic plasticity. *Physiological reviews* 88(2), 769–840. doi: 10.1152/physrev.00016.2007
113. Sean H, Ghetti A, Pinto-duarte A, Wang X, Dziewczapolski G, 2014. Astrocytes contribute to gamma oscillations and recognition memory. . doi: 10.1073/pnas.1410893111
114. Parri R, Crunelli V, 2007. Astrocytes target presynaptic NMDA receptors to give synapses a boost. *Nature Neuroscience* 10(3), 271–3. doi: 10.1038/nn0307-271
115. Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Bredt DS, 1999. PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *Journal of Biological Chemistry* 274(39), 27467–73. doi: 10.1074/jbc.274.39.27467
116. Würdemann T et al., 2016. Stereotactic injection of cerebrospinal fluid from anti-NMDA receptor encephalitis into rat dentate gyrus impairs NMDA receptor function. *Brain Research* 1633, 10–8. doi: 10.1016/j.brainres.2015.12.027
117. Gaidarov I, Keen JH, 1999. Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *Journal of Cell Biology* 146(4), 755–64. doi: 10.1083/jcb.146.4.755
118. Ford MG et al., 2001. Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science (New York, NY)* 291(5506), 1051–5. doi: 10.1126/science.291.5506.1051
119. Itoh T, Koshihara S, Kigawa T, Kikuchi A, Yokoyama S, Takenawa T, 2001. Role

- of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* (New York, NY) 291(5506), 1047–51. doi: 10.1126/science.291.5506.1047
120. Lin HC, Gilman AG, 1996. Regulation of dynamin I GTPase activity by G protein  $\beta\gamma$  subunits and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Journal of Biological Chemistry* 271(45), 27979–82. doi: 10.1074/jbc.271.45.27979
121. Zheng J, Cahill SM, Lemmon M a, Fushman D, Schlessinger J, Cowburn D, 1996. Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity. *Journal of molecular biology* 255(1), 14–21. doi: 10.1006/jmbi.1996.0002
122. Cremona O et al., 1999. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99(2), 179–88. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81649-9
123. Rozelle AL et al., 2000. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Current Biology* 10(6), 311–20. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00384-5
124. Wu L, Bauer CS, Zhen X, Xie C, Yang J, 2002. Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. *Nature* 419(6910), 947–52. doi: 10.1038/nature01118
125. Aponte Y, Lien C-C, Reisinger E, Jonas P, 2006. Hyperpolarization-activated cation channels in fast-spiking interneurons of rat hippocampus. *The Journal of Physiology* 574(Pt 1), 229–43. doi: 10.1113/jphysiol.2005.104042
126. Simeone TA, Rho JM, Baram TZ, 2005. Single channel properties of hyperpolarization-activated cation currents in acutely dissociated rat hippocampal neurones. *The Journal of Physiology* 568(2), 371–80. doi: 10.1113/jphysiol.2005.093161
127. Robinson RB, Siegelbaum SA, 2003. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annual Review of Physiology* 65, 453–80. doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142734
128. Nolan MF, Dudman JT, Dodson PD, Santoro B, 2007. HCN1 channels control resting and active integrative properties of stellate cells from layer II of the

- entorhinal cortex. *The Journal of Neuroscience* 27(46), 12440–51. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2358-07.2007
129. Shah MM, Anderson AE, Leung V, Lin X, Johnston D, 2004. Seizure-induced plasticity of h channels in entorhinal cortical layer III pyramidal neurons. *Neuron* 44(3), 495–508. doi: 10.1016/j.neuron.2004.10.011
130. Li B et al., 2012. Role of HCN channels in neuronal hyperexcitability after subarachnoid hemorrhage in rats. *Journal of Neuroscience* 32(9), 3164–75. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5143-11.2012
131. Fan Y et al., 2005. Activity-dependent decrease of excitability in rat hippocampal neurons through increases in I(h). *Nature Neuroscience* 8(11), 1542–51. doi: 10.1038/nn1568
132. Lupica CR, Bell J a, Hoffman a F, Watson PL, 2001. Contribution of the hyperpolarization-activated current (I(h)) to membrane potential and GABA release in hippocampal interneurons. *Journal of Neurophysiology* 86(1), 261–8.
133. Beaumont V, Zhong N, Froemke RC, Ball RW, Zucker RS, 2002. Temporal synaptic tagging by Ih activation and actin: Involvement in long-term facilitation and cAMP-induced synaptic enhancement. *Neuron* 33(4), 601–13. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00581-0
134. Weisskopf MG, Castillo PE, Zalutsky R a, Nicoll R a, 1994. Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science (New York, NY)* 265(5180), 1878–82. doi: 10.1126/science.7916482
135. Hu H, Vervaeke K, Storm JF, 2002. Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na<sup>+</sup> current in rat hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Physiology* 545(Pt 3), 783–805. doi: 10.1113/jphysiol.2002.029249
136. Cangiano L, Gargini C, Della Santina L, Demontis GC, Cervetto L, 2007. High-Pass Filtering of Input Signals by the Ih Current in a Non-Spiking Neuron, the Retinal Rod Bipolar Cell. *PLoS ONE* 2(12). doi: 10.1371/journal.pone.0001327
137. Pike FG, Goddard RS, Suckling JM, Ganter P, Kasthuri N, Paulsen O, 2000. Distinct frequency preferences of different types of rat hippocampal neurones in response to oscillatory input currents. *The Journal of physiology* 529 Pt 1, 205–



13. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00205.x

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "*Der altersabhängige Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die synaptische Plastizität am medialen Tractus perforans*" selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich versichere, dass ich lediglich die ausdrücklich aufgeführten Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

*Leipzig, 15. Januar 2018*

*Tim Wende*

## Danksagung

Ich danke zuvorderst meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer in meinen Vorhaben unterstützt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Diese Arbeit hätte nicht angefertigt werden können ohne die herausragende Arbeit der Mitarbeiter des Institutes für Physiologie. Mein Dank gilt Prof. Dr. med. habil. Rüdiger Köhling für Ratschläge und Diskussionen sowie Prof. Dr. med. habil. Timo Kirschstein für die umfassende Betreuung und Hilfsbereitschaft in praktischen und theoretischen Fragen.

Dr. rer. nat. Marco Rohde hat durch die exzellente Anleitung am Messplatz sehr viel zum Zustandekommen der Experimente beigetragen und war auch in theoretischen Überlegungen immer ein kompetenter Ansprechpartner.

Tursonjan Tokay, MD, PhD, leistete mir vor allem zu Beginn der Messungen unerlässliche Hilfe bei der technischen Einführung.

Mit Dr. rer. nat. Johannes Mayer, Dr. rer. hum. Xiati Guli und Felix Mader waren immer kompetente und angenehme Fachgespräche möglich.

Die Arbeit von Tina Sellmann und Katrin Porath war unerlässlich für den reibungslosen Ablauf der Versuche. Durch Fachwissen und eine hervorragende Organisation im Labor war stets ein problemloses Experimentieren garantiert. Besonderer Dank gilt noch einmal Tina Sellmann für das Anfertigen der Färbungen der Hippocampus-Schnitte.

Bei technischen Problemen waren Andreas Prestel und Bernd Memmner immer zur Stelle. Ebenso wurde durch Hanka Schmidt die Versorgung der Versuchstiere zu jeder Zeit sichergestellt, während Silvia Haase als Laborantin stets eine zuverlässige Hilfe war.

Die genannten und alle anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter beziehungsweise Doktorandinnen und Doktoranden des Oscar-Langendorff-Institutes schufen von Beginn an eine freundliche Atmosphäre, in der durch zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen wurde.