

**Der Einfluss von SynCAM1 auf die
Stabilisierung synaptischer Spines –
eine *in vivo* Analyse**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Nils Körber

aus

Berlin

Bonn 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Valentin Stein

2. Gutachter: Prof. Walter Witke

Tag der Promotion: 10.12.2015

Erscheinungsjahr: 2016

An Eides statt versichere ich, dass die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln – persönlich, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde, die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht sind, die vorgelegte Arbeit oder ähnliche Arbeiten nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist bzw. sind.

Nils Körber

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xi
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Der Neocortex	3
2.2 Dendritische Spines	5
2.3 Synaptic Cell Adhesion Molecule - SynCAM	9
2.4 Prinzip der Zwei-Photonen-Mikroskopie	11
3 Material und Methoden	15
3.1 Konstruktion eines Zwei-Photonen-Mikroskops	15
3.1.1 Aufbau	15
3.1.2 Steuerung	18
3.1.3 Messung der Punktspreizfunktion	20
3.2 Methoden	21
3.2.1 Mausmodelle	21
3.2.2 Implantation des kranialen Fensters	22
3.2.3 <i>In vivo</i> Zwei-Photonen-mikroskopische Aufnahmen von dendritischen Spines	23
3.2.4 Analyse von dendritischen Spines	25
3.2.5 Statistik	28
3.2.6 Western Blot	28
3.3 Material	31
3.3.1 Bauteile für das Zwei-Photonen-Mikroskop	31
3.3.2 Pharmaka	32
3.3.3 Chemikalien	32

4	Ergebnisse	33
4.1	Induzierte SynCAM1 ^{flag} Überexpression	33
4.1.1	Untersuchung des induzierten SynCAM1 ^{flag} Expressionslevels	34
4.1.2	Erhöhter Zuwachs neuer Spines und Anstieg der Spinedichte durch induzierte SynCAM1 ^{flag} Überexpression	35
4.1.3	Zunahme stabiler Spines bei induzierter SynCAM1 ^{flag} Überexpression	39
4.2	Induzierte SynCAM1 ^{flag} Langzeitüberexpression	40
4.3	Dauerhafte SynCAM1 ^{flag} Überexpression	44
4.3.1	Verringerter Spineumsatz als Folge dauerhafter SynCAM1 ^{flag} Überexpression	45
4.3.2	Dauerhafte SynCAM1 ^{flag} Überexpression führt zur Erhöhung der Stabilität von Spines	47
4.3.3	Verlängerte Lebensdauer und fortgeschrittener Reifestatus von Spines bei dauerhafter SynCAM1 ^{flag} Überexpression	49
4.4	Der SynCAM1 Knockout	51
4.4.1	Die Abwesenheit von SynCAM1 führt zu einem erhöhten Spineumsatz	52
4.4.2	Verringerte Stabilität von Spines in SynCAM1 Knockout-Tieren . . .	54
4.4.3	Verringerter Reifestatus und reduzierte Lebensdauer von Spines in SynCAM1 Knockout-Tieren	56
5	Diskussion	59
5.1	Die Funktion von SynCAM1 in der Entwicklung und Stabilität dendritischer Spines	59
5.2	Die Rolle SynCAMs im Vergleich zu anderen Adhäsionsproteinen	65
5.3	Der Zusammenhang von Lernen, Gedächtnis, SynCAM und Spines	73
5.4	Methodische Aspekte der gewonnenen Ergebnisse	80
6	Abschließende Betrachtung und Ausblick	85
	Abkürzungsverzeichnis	87

Abbildungsverzeichnis	90
Tabellenverzeichnis	92
Literatur	93
Anhang	115
Danksagung	125

Zusammenfassung

Die Verknüpfung von Nervenzellen durch Synapsen ist essentiell für die Funktion des Gehirns. Unnatürliche synaptische Strukturen sind dabei ein Merkmal neurodegenerativer Erkrankungen. Für therapeutische Ansätze und zum Verständnis der Arbeitsweise des Gehirns sind Untersuchungen zur Entstehung und Stabilität von Synapsen unerlässlich, da der zugrundeliegende Mechanismus nur unvollständig verstanden ist.

Zelladhäsionsproteine wie das Immunglobulin-Protein SynCAM1 (Synaptic cell adhesion molecule 1) sind mögliche Regulatoren für die Entwicklung und Stabilität von Synapsen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von SynCAM1 auf die Bildung und Stabilität von dendritischen Spines untersucht.

Mit Hilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie wurden *in vivo* Aufnahmen von Spines im Cortex im Abstand von einigen Tagen bis zu Monaten durchgeführt, um den Lebenszyklus einzelner Spines zu verfolgen. Dazu wurde ein Zwei-Photonen-Mikroskop konzipiert und aufgebaut, mit dem anschließend die *in vivo* Aufnahmen durchgeführt wurden.

Um zu untersuchen, ob das Zelladhäsionsmolekül SynCAM1 einen Einfluss auf die Bildung und Stabilität von Synapsen hat, wurden sowohl SynCAM1^{flag} überexprimierende als auch SynCAM1 Knockout-Mäuse analysiert. Dieses Vorgehen erlaubt die Betrachtung von Spines unter einem erhöhten SynCAM1 Proteinlevel sowie in Abwesenheit von SynCAM1. In beiden Mauslinien wurde die dynamische Änderung der dendritischen Spines ermittelt und verglichen. Dazu wurde die Anzahl der neugebildeten Spines, der Verlust bestehender Spines sowie die Stabilität von Spines mit Hilfe selbstgeschriebener Software ausgewertet.

In den SynCAM1^{flag} Überexpressionstieren zeigte sich dabei, dass Spines stabiler sind und eine verlängerte Lebensdauer haben. Der Anteil Filopodia-ähnlicher Spines wird außerdem durch die Überexpression von SynCAM1^{flag} verringert. Gleichzeitig haben neugebildete Spines infolge der SynCAM1^{flag} Überexpression eine erhöhte Überlebenschance. Letztendlich führt die Überexpression von SynCAM1^{flag} zum Anstieg der Spinedichte. Interessanterweise verbleibt die Spinedichte erhöht auch nachdem die SynCAM1^{flag} Überexpression wieder abgeschaltet wurde.

Die SynCAM1 Knockout-Mäuse liefern dazu komplementäre Ergebnisse. Die Spines der SynCAM1 Knockout-Tiere sind deutlich instabiler und haben eine verminderte Lebensdauer. Der Anteil Filopodia-ähnlicher Spines der Knockout-Tiere ist ferner stark erhöht. Weiterhin ist die Überlebensrate von neugebildeten Spines vermindert. Überdies ist die Spinedichte der SynCAM1 Knockout-Tiere verringert.

Aus den gemachten Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass SynCAM1 eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und Stabilität von Spines übernimmt. Es konnte in dieser Arbeit der direkte Zusammenhang vom Expressionslevel eines synaptischen Adhäsionsproteins mit der Stabilität von dendritischen Spines *in vivo* nachgewiesen werden.

Zusammenfassend belegen die vorgestellten Ergebnisse einen starken Einfluss von SynCAM1 auf die Lebensdauer und Entwicklung von Spines. Damit konnte SynCAM1 als wichtiger Mediator für die Bildung und den Erhalt von Synapsen im Gehirn identifiziert werden.

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Fähigkeit des Gehirns, sich auf ständig neue Situationen einzustellen benötigt ein variables neuronales Netzwerk. Die Bildung und Erhaltung von Synapsen ist dabei entscheidend, um Fähigkeiten zu erlernen und Erfahrungen zu speichern. In der Großhirnrinde ist der Großteil der exzitatorischen Postsynapsen in Spines lokalisiert. Die morphologische Untersuchung der dynamischen Veränderung von Spines spiegelt also die Bildung und Elimination von Synapsen wider. Der Mechanismus der Spinebildung ist nur unvollständig verstanden. Aufgrund der grundlegenden Eigenschaften von Spines als funktionelle Einheit des Gehirns wurden Veränderungen in ihrer Bildung, Morphologie oder Beständigkeit mit zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen darunter Alzheimer, Schizophrenie oder Autismus in Verbindung gebracht (Fiala et al., 2002; Penzes et al., 2011; Phillips und Pozzo-Miller, 2015). Die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen und beteiligten Proteine ist bedeutend, um Therapiemöglichkeiten zu entwickeln und die generelle Funktionsweise des Gehirns genauer beschreiben zu können.

Adhäsionsproteine vermitteln den Zell-Zell Kontakt und regulieren damit den Zusammenhalt und die Signaltransduktion; synaptische Zelladhäsionsproteine verbinden die Präsynapse mit der Postsynapse. Sie sind somit maßgebend für den Erhalt und die Bildung von Synapsen. Für das synaptische Zelladhäsionsprotein SynCAM1 (synaptic cell adhesion molecule 1) konnte eine synaptogene Wirkung nachgewiesen werden (Biederer et al., 2002).

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel die Funktion von SynCAM1 auf die Spinedynamik im lebenden Gehirn zu untersuchen. Dabei wurde mit Hilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie analysiert, ob SynCAM1 die Bildung, Entwicklung oder Stabilität von dendritischen Spines der Pyramidenzellen beeinflusst. So wäre denkbar, dass die adhäsive Wirkung von SynCAM1 zur Neubildung von Spines führt, die Spinereifung fördert oder die Stabilität von Spines erhöht. Zwei parallele Ansätze wurden dazu gewählt. Erstens die konditionelle Überexpression von SynCAM1^{flag}. Zweitens der konstitutionelle Knockout von SynCAM1. Zusammen kann so die Verstärkung der Funktion durch die SynCAM1^{flag} Überexpression mit dem Verlust der Funktion durch den SynCAM1 Knockout verglichen werden. In beiden Fällen wurde der

Einfluss von SynCAM1 auf die Bildung, Entwicklung und Stabilität von Spines untersucht.

Die Untersuchung *in vivo* hat den Vorteil, dass die direkte Wirkung des Proteins im Organismus untersucht werden kann. Ein weiterer Vorteil gegenüber vereinfachten Systemen wie Zellkulturen oder Hirnschnitten besteht darin, dass Experimente über mehrere Tage oder Monate unter realen Bedingungen durchgeführt werden können. Die Zwei-Photonen-Mikroskopie ermöglicht Bildaufnahmen im Gewebe bei geringer Phototoxizität und eignet sich somit hervorragend, um über mehrere Zeitpunkte morphologische *in vivo* Studien durchzuführen. Dafür wurde im Zuge der Arbeit ein Zwei-Photonen-Mikroskop entworfen und gebaut.

Insgesamt umfasste die Arbeit den Bau des Zwei-Photonen-Mikroskops, die Planung und Durchführung der *in vivo* Experimente und schlussendlich die Analyse der Daten inklusive der Entwicklung und Umsetzung der dafür notwendigen Software.

2 Theoretische Grundlagen

Das menschliche Gehirn besteht aus ca. 100 Milliarden Nervenzellen, die mit 100 Billionen Synapsen untereinander verbunden sind. Die Bildung neuer und der Erhalt bestehender Synapsen ermöglicht kognitive Fähigkeiten wie Lernen und das Gedächtnis. Verschiedene Proteine wurden identifiziert, die die Verbindung zwischen der prä- und postsynaptischen Membran vermitteln und so die Neubildung und Beständigkeit von Synapsen regulieren.

2.1 Der Neocortex

Die Großhirnrinde (*cortex cerebri*) wird anatomisch in Allocortex und Neocortex unterteilt. Der Neocortex oder Isocortex bedeckt die beiden Hemisphären und dient der Verarbeitung sensorischer Eingänge und ist verantwortlich für höhere kognitive Funktionen wie geplante Bewegung, Bewusstsein oder abstraktes Denken. Der Neocortex von Säugetieren wird in der Regel in sechs Schichten, Lamina I-VI, gegliedert und ist so einzigartig in der Tierwelt (Abbildung 2.1). Weiterhin ist der Neocortex in Säulen (*Columnae*) organisiert, die grundlegende Verarbeitungseinheiten bilden. Die Neurone einer cortikalen Säule arbeiten dabei funktionell zusammen. Vor allem durch die Arbeit von David Hubel und Torsten Wiesel konnten für den visuellen Cortex funktionelle Einheiten für die Orientierung, Bewegung, Farbe oder rezeptive Felder identifiziert werden (Hubel und Wiesel, 1968, 1962). Der visuelle Cortex ist dabei retinotop aufgebaut, also ein topologisches Abbild der Retina.

Die Vernetzung der Neurone im Neocortex ist hochkomplex (Thomson und Bannister, 2003; Binzegger et al., 2004; Douglas und Martin, 2007). Der Großteil der sensorischen Information wird dabei aus dem Thalamus zu Lamina IV projiziert, von wo sie nach Lamina II und III propagiert wird und von dort schließlich nach Lamina V und VI gelangt.

Pyramidenzellen, deren Somata vorwiegend in Lamina III und V liegen, bilden den mit Abstand größten Teil der Neurone im Neocortex. Pyramidenzellen sind vergleichsweise große Neurone und verdanken ihren Namen dem pyramidenförmigen Soma. Die Dendriten der Pyramidenzellen haben viele Spines mit exzitatorischen Synapsen. Die Mehrheit der synaptischen Eingänge kommt dabei von anderen cortikalen Neuronen. Die hier untersuchten Spines liegen

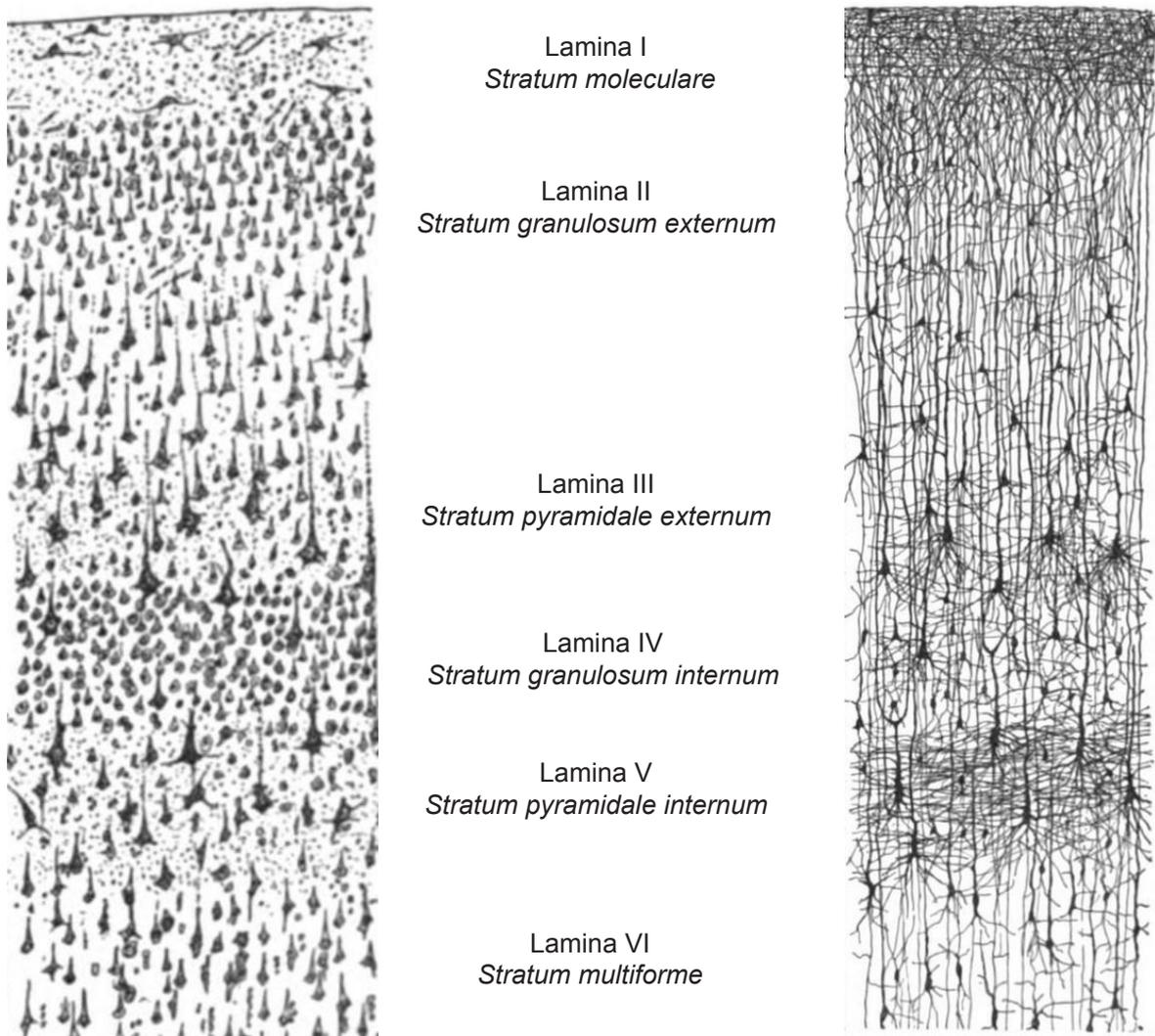


Abbildung 2.1: Laminarer Aufbau des Neocortex. Nissl-Färbung (links) und Golgi-Färbung (rechts) des menschlichen Neocortex mit der Einteilung in die 6 Schichten (mitte). Zeichnungen von Cajal (1899).

in Lamina I und gehören zu Lamina V Pyramidenzellen des visuellen Cortex. Sie besitzen Synapsen zu höheren kortikalen Regionen, die als Feedback dienen (Sjostrom und Hausser, 2006). Dieser Feedback-Mechanismus gilt als entscheidend für Aufmerksamkeit, Erwartung, Wahrnehmung und Lernen (Gilbert und Sigman, 2007). Es konnten jedoch auch thalamische Eingänge in Lamina I gezeigt werden (Rubio-Garrido et al., 2009). Die untersuchten Lamina V Pyramidenzellen sind die einzigen neocortikalen Zellen mit Dendriten in allen sechs Schichten und sind damit entscheidend für die kolumnare Organisation des Cortex (Shai et al.,

2015). Ihre weitverzweigten Axone projizieren auch in subcortikale Regionen und bilden so den Hauptausgang des Cortex.

2.2 Dendritische Spines

Von Santiago Ramón y Cajal wurden 1888 „Espinass“ das erste Mal als Fortsätze oder Dornen von den Dendriten von Purkinjezellen benannt und beschrieben (Yuste, 2015). Der Name Spine hat sich daraufhin in der englischsprachigen Literatur durchgesetzt. Im Deutschen wird häufig auch von Dornen gesprochen. In Anlehnung an die englische Originalliteratur werden sie in dieser Arbeit auch als Spines bezeichnet.

Seit ihrer ursprünglichen Entdeckung wurden zahlreiche Erkenntnisse über Spines gewonnen. Der Großteil der exzitatorischen Synapsen des Gehirns befindet sich am Kopf von Spines. Sie sind variabel in Größe und Form, wobei der Kopf ein Volumen von 0,001-1 μm^3 einnehmen kann (Zito und Murthy, 2002). Die Form und Größe kann sich dabei auch über die Zeit verändern. Für gewöhnlich werden Spines als *Stubby*, *Mushroom* oder *Thin* klassifiziert (Harris et al., 1992; Hering und Sheng, 2001). Die Kriterien zur Klassifikation werden in Abschnitt 3.2.4 behandelt (Abbildung 3.5).

Der Spinekopf beinhaltet den postsynaptischen Teil der Synapse und ist über den Spinehals mit dem Dendriten verbunden. Die präsynaptische Axonterminale (Bouton) ist über Adhäsionsmoleküle mit dem Spine verbunden. Zwischen Prä- und Postsynapse befindet sich der synaptische Spalt in den die Neurotransmitter von der aktiven Zone entlassen werden. Im Spinekopf ist die postsynaptische Dichte lokalisiert, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen abgebildet werden kann. Sie beinhaltet das postsynaptische Gerüst mit den Rezeptoren. Dort wird das präsynaptische Signal erstmals verarbeitet. Es handelt sich um eine ganze Signalverarbeitungsmechanik an der zahlreiche Proteine beteiligt sind, die so eine feine Regulierung der synaptischen Transmission ermöglichen (Kennedy, 2000).

Die Entstehung von Spines ist nicht endgültig geklärt und es existieren im wesentlichen drei Modelle (Yuste und Bonhoeffer, 2004) (Abbildung 2.2):

Das Sotelo Modell: Nach Constantino Sotelo bildet sich der Spine unabhängig vom prä-

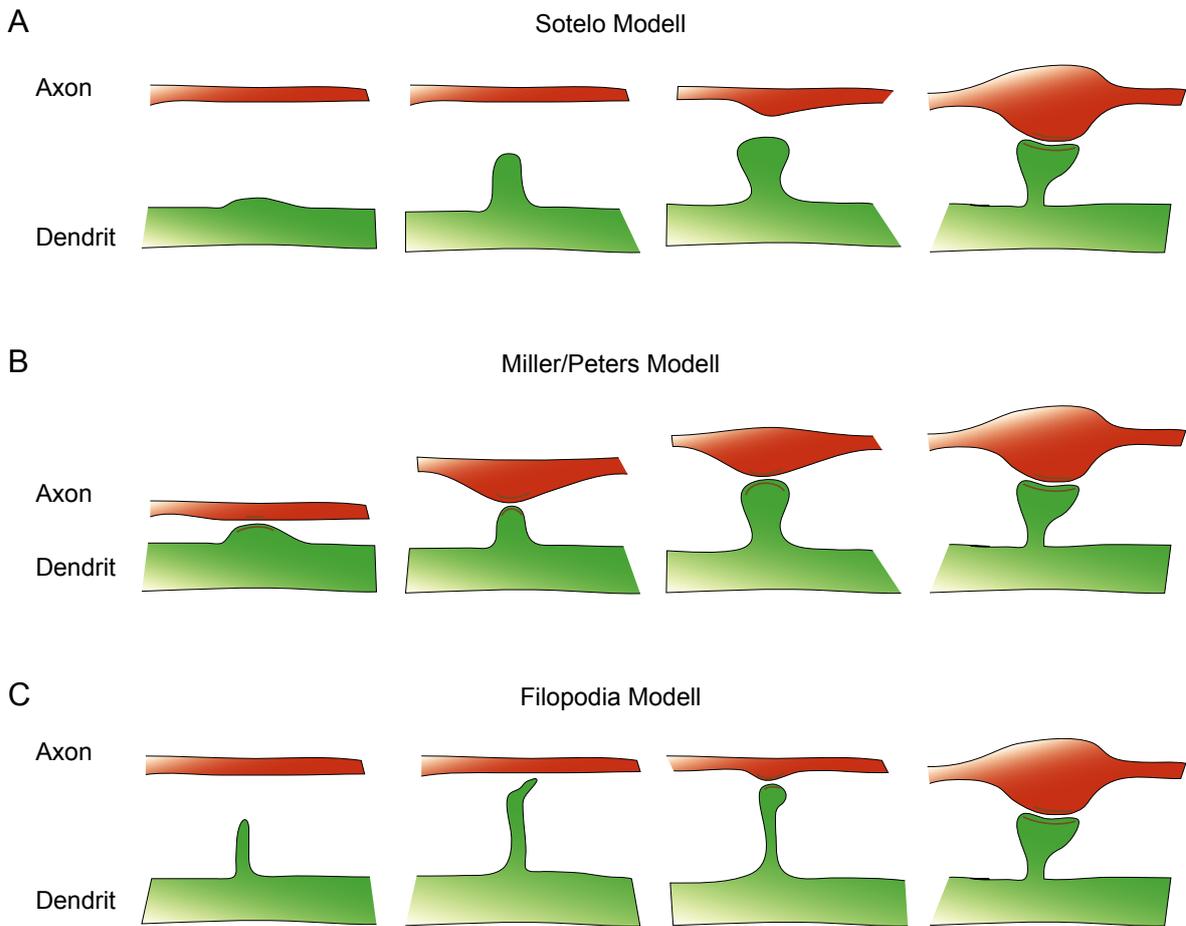


Abbildung 2.2: Drei Modelle zur Entstehung von Spines. **A)** Sotelo Modell: Der Spine entwickelt sich unabhängig vom Axon. **B)** Miller/Peters Modell: Es kommt zur synaptischen Verbindung am Schaft, wodurch die Ausbildung des Spines induziert wird. **C)** Filopodia Modell: Ein postsynaptisches Filopodium sucht einen axonalen Kontakt und entwickelt sich zum Spine. Abgewandelt nach (Yuste und Bonhoeffer, 2004).

synaptischen Axon. Die Axonterminale kontaktiert anschließend den Spine und es kommt zur Bildung der Synapse. Die Idee für diese Entwicklung kommt aus den Beobachtungen von Purkinjezellen des Cerebellums, an denen normalentwickelte Spines ohne präsynaptischen Verbindungen beobachtet werden konnten (Sotelo, 1975; Rakic und Sidman, 1973; Mariani et al., 1977).

Das Miller/Peters Modell: Nach dem Modell von Michael Miller und Alan Peters formt das Axon zunächst eine Verbindung mit dem dendritischen Schaft. Der dendritische Schaft wölbt sich nun und formt über die Zwischenstufe des *Stubby Spines* einen fertig entwickelten

Mushroom Spine (Miller und Peters, 1981). Diese Erkenntnisse stützen sich auf Beobachtungen aus der neuronalen Entwicklung, bei der eine morphologische Veränderung von Spines stattfindet, die mit einer Verschiebung von Synapsen auf dem dendritischen Schaft zu Synapsen auf Spines einhergeht.

Das Filopodia Modell: Die Entstehung von Spines über Filopodia besagt, dass dünne dendritische Fortsätze, sog. Filopodia, nach einem präsynaptischen Partner suchen, mit dem sie schließlich eine Synapse bilden. Filopodia weisen eine hohe Motilität auf, die ihrer explorativen Natur entspricht. Weiterhin werden sie seltener in reifen Neuronen beobachtet und ihre Beteiligung an der Synapsen- und Spinebildung konnte nachgewiesen werden (Jontes und Smith, 2000; Ziv und Smith, 1996).

Es ist gut möglich, dass jeder Spine eine individuelle Entwicklung durchläuft oder dass für unterschiedliche Neurone auch die Spinebildung unterschiedlich reguliert wird.

Mit der Entwicklung und Bildung von Spines einhergehend ist die Entwicklung der Synapse. So wird nach den verschiedenen Modellen auch die Synapse zu unterschiedlichen Zeitpunkten gebildet. In Pyramidenzellen haben nicht alle Spines eine funktionelle Synapse. Das Vorhandensein und die Größe der Synapse ist dabei mit der Spinestabilität korreliert (Cane et al., 2014; Knott et al., 2006; Kasai et al., 2003). Im Zuge der Synapsenbildung kommt es zur Rekrutierung einer Vielzahl an synaptischen Proteinen für die Signalübertragung sowie zum Zell-Zell-Kontakt durch Adhäsionsproteine (Choquet und Triller, 2013; Shen und Scheiffele, 2010). Der zeitliche Ablauf des Prozesses bleibt ungewiss.

Ferner ist die Aktivität der Synapse für den Erhalt und die Remodellierung des Spines verantwortlich (Benson et al., 2001; Yoshihara et al., 2009; Nagerl et al., 2007). So konnte durch die lichtinduzierte Aktivierung von inaktivem Glutamat (glutamate uncaging) die Bildung von neuen Spines induziert werden (Kwon und Sabatini, 2011). Das bedeutet, dass der Neurotransmitter Glutamat alleine ausreicht, um die Spineneubildung zu veranlassen.

Dennoch sind die genauen biochemischen Faktoren und die biologischen Prozesse, die eine Spinebildung auslösen weitestgehend unbekannt, auch wenn für einige Proteine wie SynCAM eine synaptogene Fähigkeit beschrieben wurde (Biederer et al., 2002; Washbourne et al., 2004;

Dalva et al., 2007; Waites et al., 2005). Prinzipiell kann ein Strukturprotein den Lebenszyklus von Spines auf drei verschiedene Arten beeinflussen, sodass dadurch die Spinedichte reguliert wird. 1. Die Bildungsrate von Vorläuferspines, aus denen sich ein reifer Spine entwickelt, wird verändert. 2. Die Wahrscheinlichkeit mit der ein Vorläuferspines sich zu einem reifen Spine weiterentwickelt wird modifiziert. 3. Die Stabilität von reifen Spines wird beeinflusst.

Während der neuronalen Entwicklung des Neocortex kommt es in den ersten postnatalen Wochen zu einem starken Anstieg der Spinedichte, auf die eine Periode folgt in der ein großer Teil der Spines eliminiert wird (Holtmaat et al., 2005; Zuo et al., 2005b). Dieser erfahrungsabhängigen neuronalen Remodellierung wird große Bedeutung in der Entwicklung zugeschrieben.

Abschließend bleibt die generelle Frage, was die Funktion von Spines ist und zu welchem Zweck sie gebildet werden. Die Funktion von Spines wird zum ersten in der Vergrößerung der Dendritenoberfläche gesehen. So können mehr Synapsen gebildet werden und der postsynaptische Teil kann zum Axon hinwachsen, wodurch die Vernetzung erleichtert wird. Die zweite, vorherrschende Meinung zur Funktion sieht den funktionellen Vorteil in der Kompartimentierung durch den Spine (Hering und Sheng, 2001). Die Verbindung zum dendritischen Schaft über den Spinehals ist dabei die limitierende Größe, wodurch es zur lokalen Abgrenzung kommt (Grunditz et al., 2008). So kann es durch Aktivität zum lokalen Anstieg der Calcium-Konzentration im Spine kommen, der regulatorische Veränderungen wie synaptische Plastizität zur Folge hat (Murakoshi und Yasuda, 2012; Sala und Segal, 2014). Der Spine stellt somit eine grundlegende Einheit für die Signalverarbeitung dar und ist damit auch am Lernen und Gedächtnis beteiligt (Roberts et al., 2010; Xu et al., 2009).

Aufgrund der enormen Bedeutung der Spines für die Funktion des Gehirns ist eine pathologische Veränderung in neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Autismus oder Schizophrenie nicht verwunderlich (Phillips und Pozzo-Miller, 2015; Penzes et al., 2011).

2.3 Synaptic Cell Adhesion Molecule - SynCAM

Synaptische Adhäsionsproteine sind für die Funktion der Synapse entscheidend, da sie die Verbindung zwischen Prä- und Postsynapse vermitteln und dadurch die Signalübertragung ermöglichen. Ihre Interaktion kann zur Synapsenbildung führen oder die Funktion der Synapse modulieren. Die Spinemorphologie kann ebenso wie die synaptische Transmission oder Plastizität durch Adhäsionsproteine reguliert werden (Dalva et al., 2007).

Die synaptogene Wirkung von SynCAM wurde von Biederer et al. (2002) das erste Mal beschrieben. Die Expression von SynCAM in nicht-neuronalen Zellen reichte dabei aus, um in Kokulturen mit Neuronen präsynaptische Kontakte zu bilden.

SynCAM1-4 bilden eine Proteinfamilie, die zur Immunglobulin Superfamilie (IgSF) gezählt wird, deren Gemeinsamkeit die Immunglobulin-Domäne (Ig) darstellt. SynCAMs wurden ausschließlich in Vertebraten identifiziert und haben die gleiche modulare Organisation (Biederer, 2006). Sie haben drei extrazelluläre Ig-Domänen eine transmembran Domäne und einen kurzen zytosolischen Rest. Die humanen SynCAMs haben hochkonservierte Mausorthologe mit 95-99 % Aminosäureidentität (Biederer, 2006). Untereinander weisen die SynCAMs ebenfalls eine hohe Aminosäureidentität von 36-50 % auf (Biederer, 2006).

SynCAMs kommen sowohl prä- als auch postsynaptisch vor. Es kann dabei zu homophilen als auch zu heterophilen transsynaptischen Adhäsion kommen, wobei die heterophile Interaktion bevorzugt wird (Fogel et al., 2007). SynCAMs haben unterschiedlich starke Affinitäten für die einzelnen Verbindungen. Es kommt zu starken heterophilen Interaktionen von SynCAM1 und SynCAM2 sowie zwischen SynCAM3 und SynCAM4 (Fogel et al., 2007). Schwächere heterophile Interaktionen wurden zwischen SynCAM1 und SynCAM3 beobachtet. SynCAM1-3 gehen darüber hinaus homophile Bindungen ein. Neben der transsynaptischen Wechselwirkung kommt es zur lateralen Interaktion, durch die die Stärke der Adhäsion reguliert wird (Fogel et al., 2011).

Die ersten beiden Ig-Domänen vermitteln dabei die adhäsive Wirkung an der Synapse (Fogel et al., 2007). Im zytosolischen Teil des Proteins ist ein PDZ Typ II Interaktionsmotiv (postsynaptic density-95/discs large/zona occludens-1) sowie eine Protein 4.1 Interaktions-

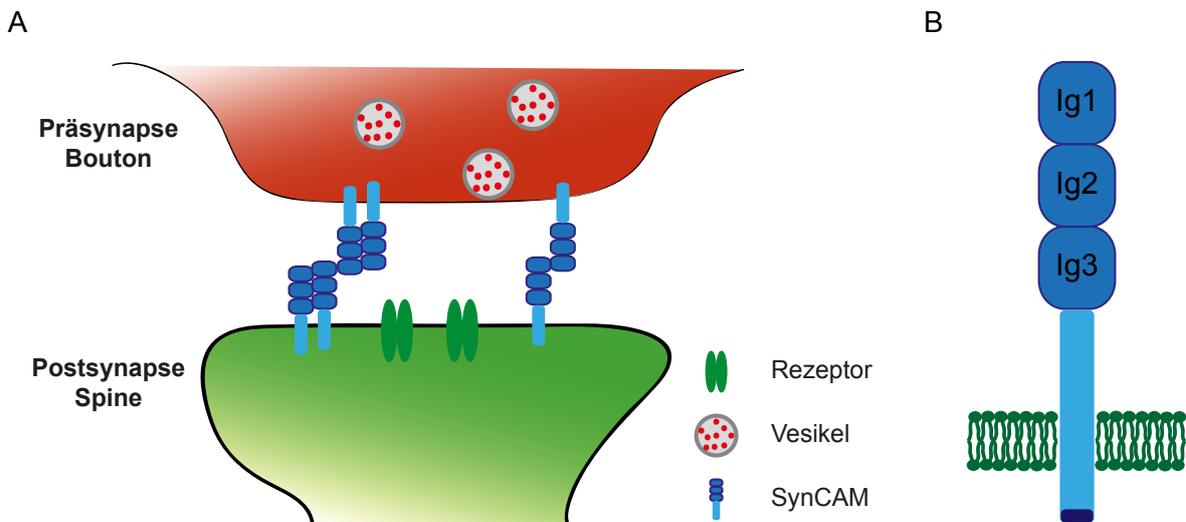


Abbildung 2.3: Struktur und transsynaptische Verbindung von SynCAM. A) Die laterale Anordnung sowie die transsynaptische Verbindung von SynCAM führt zur Adhäsion von präsynaptischem Axon und postsynaptischem Spine. **B)** Struktur von SynCAM mit den drei extrazellulären Ig-Domänen, der Transmembrandomäne und dem zytosolischen Anteil, an dem die Interaktionen mit anderen synaptischen Proteinen über die Protein 4.1 und PDZ Interaktionsstellen stattfinden.

stelle (Biederer, 2006). Über diese Interaktionsmotive kommt es zur Wechselwirkung mit anderen synaptischen Proteinen wie CASK (Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) oder Syntenin (Syndecan binding protein) (Biederer et al., 2002). Alle SynCAM Isoformen werden großflächig im Gehirn in inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen exprimiert (Biederer, 2006).

SynCAM1, das auch IgSF4a (Immunoglobulin Superfamily member 4a), necl-2 (nectin-like molecule 2), CADM1 (Cell adhesion molecule 1) TsLC1 (Tumor suppressor in lung cancer 1) oder RA175 (retinoic acid inducible protein 175), ist das am besten charakterisierte Familienmitglied. Das Gen, das SynCAM1 kodiert besteht in der Maus aus 11 (aus 12 beim Menschen) Exonen, für das 5 alternative Splice-Produkte existieren (Biederer, 2006).

Die adhäsiven Eigenschaften von SynCAM1 führen dazu, dass die Überexpression die Synapsendichte erhöht und der Knockout die Anzahl der Synapsen verringert (Robbins et al., 2010). Die basalen synaptischen Eigenschaften bleiben dabei unverändert, allerdings wird die synaptische Plastizität beeinflusst. So ist die LTD (Langzeit-Depression) in den Knockout-Mäusen verstärkt und konnte in Überexpressionstieren nicht ausgelöst werden. Diese einschnei-

denden Veränderungen auf die Synapsen durch das veränderte SynCAM1-Level führte auch zu veränderten Lernfähigkeiten der Mäuse. SynCAM1^{flag} Mäuse hatten Lerndefizite und die SynCAM1 Knockouts schnitten sogar besser ab als die Kontrollgruppe (Robbins et al., 2010).

Neben SynCAM gibt es zahlreiche weitere Adhäsionsproteine, die an der Synapsenbildung beteiligt sind (Dalva et al., 2007; Washbourne et al., 2004). In Abschnitt 5.2 wird die Funktion von SynCAM1 im Vergleich zu anderen Adhäsionsproteinen diskutiert.

Außer den genannten Funktionen von SynCAM an der Synapse wurden darüber hinausgehende neuronale Funktionen von SynCAMs beschrieben. So ist SynCAM4 an der Interaktion zwischen Axonen und Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem beteiligt und essentiell für die Myelinisierung (Spiegel et al., 2007; Maurel et al., 2007). Außerdem wurde für SynCAM eine wichtige Rolle in der Axon Führung des sich entwickelnden Rückenmarks nachgewiesen (Niederkofler et al., 2010; Frei und Stoeckli, 2014).

2.4 Prinzip der Zwei-Photonen-Mikroskopie

Zur Untersuchung neuronaler Strukturen wie Spines bietet die Fluoreszenzmikroskopie ein wichtiges Werkzeug. Durch die Markierung einzelner Zellen können so morphologische Unterschiede verglichen werden. Für die Verwendung von lebenden Zellen oder gar *in vivo* Aufnahmen stößt die gewöhnliche oder konfokale Fluoreszenzmikroskopie allerdings schnell an ihre Grenzen. So ist es kaum möglich Bilder tiefer als 80 μm im Gewebe aufzunehmen. Die oftmals nötige hohe Laserleistung bei der konfokalen Mikroskopie führt zum Bleichen des Farbstoffes oder Schädigung des Gewebes. Für *in vivo* Aufnahmen über einen längeren Zeitraum ist es nötig hochauflösende Bilder zu machen, die nicht dazu führen, dass die lebenden Zellen geschädigt werden. Die Zwei-Photonen-Mikroskopie eignet sich für derartige Experimente, weil sie Aufnahmen mit geringer Phototoxizität tief im Gewebe ermöglicht.

Bereits 1931 beschrieb Maria Göppert-Mayer theoretisch die gleichzeitige Absorption zweier Lichtquanten (Göppert-Mayer, 1931). Von Denk et al. (1990) wurde schließlich die Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie erstmalig realisiert.

Um fluoreszierende Farbstoffe in einen höheren energetischen Zustand anzuregen, muss ein

bestimmtes Energieniveau überwunden werden. Die Ein-Photonen-Anregung erfolgt durch die Absorption eines einzelnen Photons (Abbildung 2.4A). Es kann jedoch auch zur Anregung durch die gleichzeitige Absorption von zwei Photonen kommen, die gemeinsam die benötigte Energie aufbringen (Abbildung 2.4B). Der angeregte Farbstoff emittiert schließlich ein Photon mit einer Energie kleiner der eingestrahnten. Die Abnahme der Energie erfolgt durch Relaxation und die daraus resultierende Verschiebung der Wellenlänge des emittierten Photons wird Stokes-Verschiebung genannt.

Nach der Zwei-Photonen-Anregung der Fluorophors, emittiert dieses Licht mit der Wellenlänge des Emissionsspektrums. Das emittierte Licht wird über das Objektiv des Mikroskops eingesammelt und anschließend mit Photomultipliern detektiert. Das eingestrahlte Laserlicht wird durch Spiegel ausgelenkt und die zu untersuchende Probe wird so schrittweise abgescannt. Durch die Intensität des detektierten Lichtes für jeden Pixel an dem die Probe beleuchtet wurde entsteht ein Intensitätsbild.

Zur Absorption von zwei Photonen wird eine extrem hohe Photonendichte benötigt, die für die Zwei-Photonen-Mikroskopie durch gepulste Laser erzeugt wird. Die dazu verwendeten Laser erzeugen Pulse mit einer Dauer von circa 100 fs, sodass eine Spitzenleistung von einigen 100 kW bei einer geringen Durchschnittsleistung entsteht, wodurch die gleichzeitige Absorption von mehreren Photonen ermöglicht wird.

Durch die hohe benötigte Anregungsintensität kommt es nur im Fokuspunkt zur Anregung; die Anregungswahrscheinlichkeit ist proportional zum Quadrat der Anregungsintensität. So kommt es außerhalb der Fokusebene nicht zur fluoreszenten Anregung, einem Hauptvorteil der Zwei-Photonen-Mikroskopie. Im Gegensatz zum Konfokalmikroskop, bei dem Licht außerhalb der Fokusebene ausgeblendet wird, kann das gesamte emittierte Licht detektiert werden.

Um die Sensitivität weiter zu erhöhen, können die Photomultiplier zur Lichtdetektion möglichst nah hinter dem Objektiv platziert werden (non-descanned detection), sodass nur wenig Licht verloren geht. Da es zur gezielten Anregung nur im Fokus kommt kann alles emittierte Licht verwendet werden, also auch gestreutes Licht, weil es nur aus dem Fokuspunkt kommen kann und damit die entscheidende Information trägt. Durch die effektive Detektion im

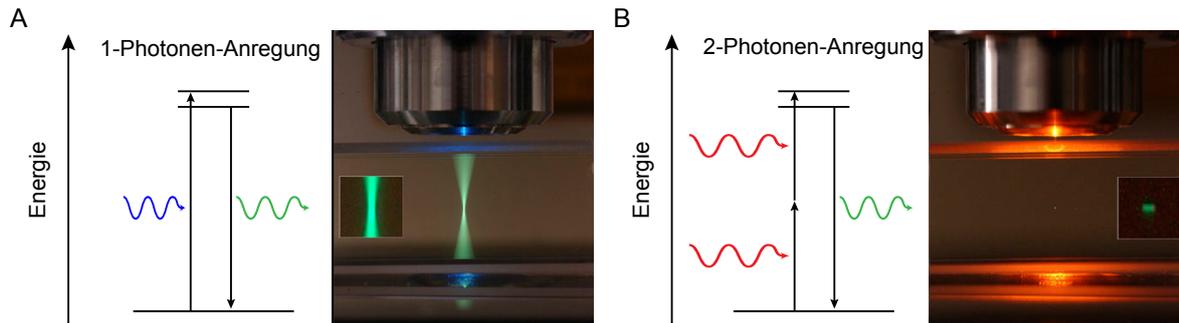


Abbildung 2.4: Vergleich von Ein-Photonen-Anregung und Zwei-Photonen-Anregung. A) Jablonski-Diagramm der Anregung eines Fluorophors durch ein einzelnes Photon (links). Es kommt in einer fluoreszierenden Probe durch Ein-Photon-Anregung zur Emission entlang des Strahlengangs (rechts). **B)** Jablonski-Diagramm der Anregung eines Fluorophors durch zwei Photonen (links). Es kommt in einer fluoreszierenden Probe durch Zwei-Photonen-Anregung nur im Fokuspunkt zur Emission. Photos von Steve Ruzin und Holly Aaron, UC Berkeley von <http://microscopy.berkeley.edu> - 2015

Verhältnis zur Anregung kann eine geringe Laserleistung verwendet werden, wodurch Photo-bleichung und Photoschaden minimiert werden. Insbesondere für lebendes Gewebe stellt das einen erheblichen Vorteil dar.

In biologischem Gewebe kann die Absorption gegenüber der Streuung für Wellenlängen vom Sichtbaren bis zum nahen Infrarot vernachlässigt werden (Helmchen und Denk, 2005). Die Streuung dagegen hat einen großen Einfluss auf die Penetrationstiefe des Lichtes und limitiert damit die Auflösung. Die Streuung im Gewebe (hier v. a. Rayleigh- und Mie-Streuung) ist stark wellenlängenabhängig. Durch die langwellige Anregung bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie kann dementsprechend eine deutlich höhere Penetrationstiefe erreicht werden (Oheim et al., 2001). Für *in vivo* Aufnahmen stellt das einen weiteren wichtigen Vorteil dar, da mit geringem Intensitätsverlust auch tiefer liegende Strukturen mit gutem Signal-Rausch-Verhältnis untersucht werden können.

Die Auflösung eines Mikroskops ergibt sich aus der sog. Punktspreizfunktion (PSF), die angibt wie ein punktförmiges Objekt, das also deutlich kleiner als das Auflösungsvermögen ist, durch das System dargestellt wird. Das vom Mikroskop erzeugte Bild ergibt sich aus der Faltung des realen Bildes mit der Punktspreizfunktion. Die Halbwertsbreite (FWHM, full width half maximum) der Punktspreizfunktion ist also maßgeblich für die Auflösung zweier

getrennter Punkte verantwortlich. Die Punktspreizfunktion des Zwei-Photonen-Mikroskops ergibt sich aus dem Quadrat der Anregungspunktspreizfunktion (Sheppard und Gu, 1990; Zipfel et al., 2003; Helmchen und Denk, 2005). Daraus folgt eine theoretisch approximierte Halbwertsbreite der Punktspreizfunktion von:

$$\text{PSF}_{\text{FWHM}} = 0,5 * \lambda / (\sqrt{2} * \text{NA}) \quad (1)$$

in lateraler Richtung, wobei NA der numerischen Apertur des Objektivs entspricht und λ der Anregungswellenlänge.

Theoretisch ist durch die längere verwendete Wellenlänge die Auflösung geringer als im Konfokalmikroskop. Die bessere Auflösung im Konfokalmikroskop beruht allerdings auf der Annahme einer unendlich kleinen Lochblende, sodass in der Praxis die Auflösung vom Konfokalmikroskop vergleichbar mit der vom Zwei-Photonen-Mikroskop ist (Cox und Sheppard, 2004).

3 Material und Methoden

3.1 Konstruktion eines Zwei-Photonen-Mikroskops

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein Zwei-Photonen-Mikroskop konzipiert. Das Mikroskop wurde für die geplanten Aufgaben entworfen, aufgebaut und die Software integriert. Einzelne, nicht standardisierte Bestandteile wurden konstruiert und von der Werkstatt des Instituts speziell angefertigt.

3.1.1 Aufbau

Der Strahlengang mit allen wichtigen Komponenten ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Ein Chameleon Vision S (Coherent) Ti:sapphire Laser wurde verwendet. Der Laser erzeugt 75 fs breite Pulse mit einer Frequenz von 80 MHz und kommt dabei auf eine Durchschnittsleistung von 2,3 W mit einer Spitzenleistung von über 380 kW. Die Wellenlänge des Lasers ist zwischen 690-1050 nm einstellbar.

Die Wellenlänge eines Ultrakurzzeitpulses ist nicht fest, sondern eine Normalverteilung um die Hauptwellenlänge, deren Breite antiproportional zur Länge des Pulses ist. Beim Durchgang des Lichtes durch den optischen Aufbau wird der Puls durch Dispersion, also der Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit im Medium von der Wellenlänge, verbreitert. Die Aufweitung des Pulses kann durch den verwendeten Laser minimiert werden, weil dieser über eine Kompensation verfügt, die es ermöglicht die Wellenlängen des Pulses beim Austritt aus dem Laser so anzuordnen, dass sie beim Eintreffen auf der Probe die minimale Pulsbreite ergeben.

Nach dem Austritt der elektromagnetischen Welle aus dem Laser passiert diese zunächst einen verschließbaren Shutter (SH), durch den das Laserlicht vollständig geblockt werden kann.

Anschließend passiert das Licht ein drehbares $\lambda/2$ -Plättchen ($\lambda/2$), das die Polarisationsrichtung des horizontal polarisierten Laserlichtes um einen wählbaren Winkel dreht. Das nachfolgende Bauteil ist ein Laserpolarisator (P), der nur Licht einer einzelnen Polarisations-

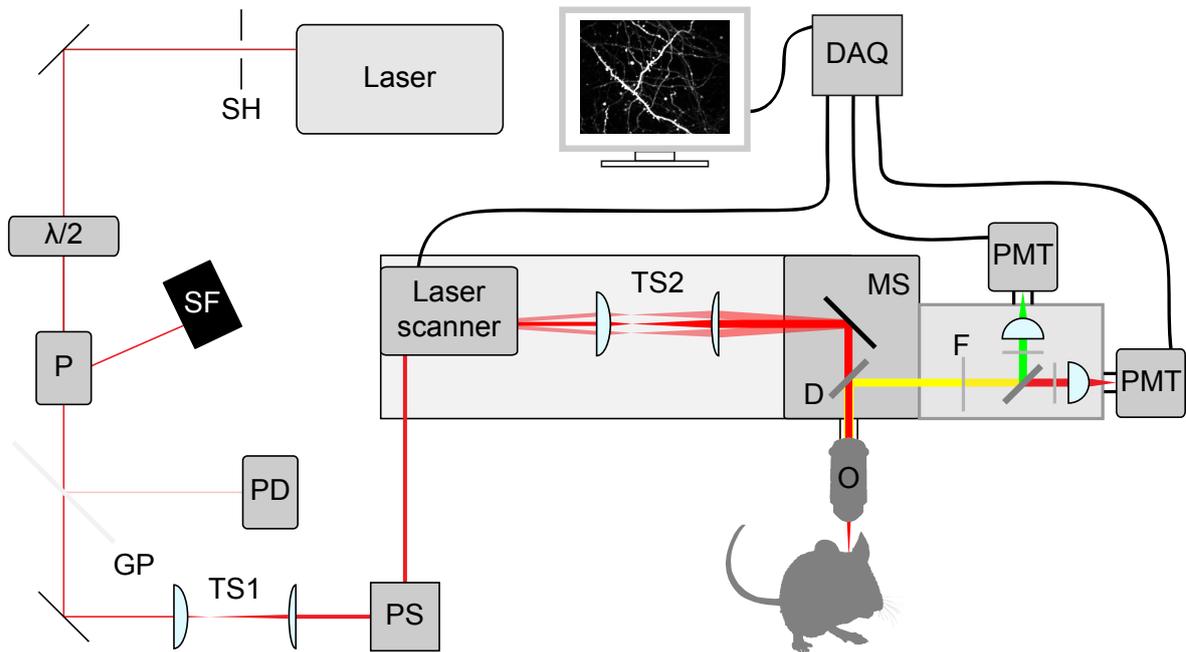


Abbildung 3.1: Strahlengang des Zwei-Photonen-Mikroskops. Das Laserlicht beim Durchgang durch das Mikroskop ist in rot dargestellt. Das emittierte Fluoreszenzlicht ist in gelb dargestellt und wird schließlich in einen roten und grünen Anteil aufgestellt. SH: Shutter, $\lambda/2$: $\lambda/2$ -Plättchen, P: Polarisator, SF: Strahlfalle, GP: Glasplättchen, PD: Photodetektor, TS: Teleskop, PS: Periskop, D: Dichroitischer Spiegel, F: Filter MS: Mikroskop, PMT: Photomultiplier, DAQ: Datenaquisition

richtung durchlässt. Das Licht, das nicht durchgelassen wird, wird auf die Strahlfalle (SF) abgelenkt. Je nachdem, um welchen Winkel die Polarisationsrichtung durch das $\lambda/2$ -Plättchen gedreht wird, verändert sich der Anteil, der durch den Polarisator durchgelassen wird. Somit lässt sich durch Drehung des $\lambda/2$ -Plättchens die Laserleistung einstellen. Nach dem Polarisator trifft das Licht auf ein Glasplättchen (GP), an dem ein kleiner Teil reflektiert wird, der am Photodetektor (PD) gemessen wird. So kann die Laserleistung indirekt über den reflektierten Strahl gemessen werden und über die Rotation des $\lambda/2$ -Plättchens entsprechend vorgegeben werden. Anschließend wird der Lichtstrahl durch ein Teleskop aufgeweitet (TS1). Die Aufweitung erfolgt durch zwei Linsen, die wie ein keplersches Fernrohr angeordnet sind, also im Abstand ihrer addierten Brennweiten stehen. Über ein Periskop (PS), bestehend aus zwei Spiegeln, wird der Strahl auf die erhöhte Ebene des Mikroskops gehoben, auf der er eingekoppelt wird. Zunächst passiert der Laserstrahl den Laserscanner. Der Laserscanner, bestehend aus zwei Spiegeln, lenkt den Strahl entsprechend aus, um die Probe schrittwei-

se mit dem Laserstrahl abzurastern. Für den Laserscanner wurde mit Solidworks (Dassault Systèmes) eine Scannerbox entworfen, in der der Laserscanner so positioniert wurde, dass die optische Achse mit der des Mikroskops übereinstimmt.

Nach dem Laserscanner wird der Strahl erneut durch ein weiteres keplersches Teleskop (TS2) aufgeweitet. Die Strahlaufweitung ist nötig, um die Rückapertur des Objektivs vollständig auszuleuchten und so idealerweise beugungslimitierte Auflösung zu erreichen (Helmchen und Denk, 2005). Insgesamt wird der Strahl um das Zwölfwache aufgeweitet.

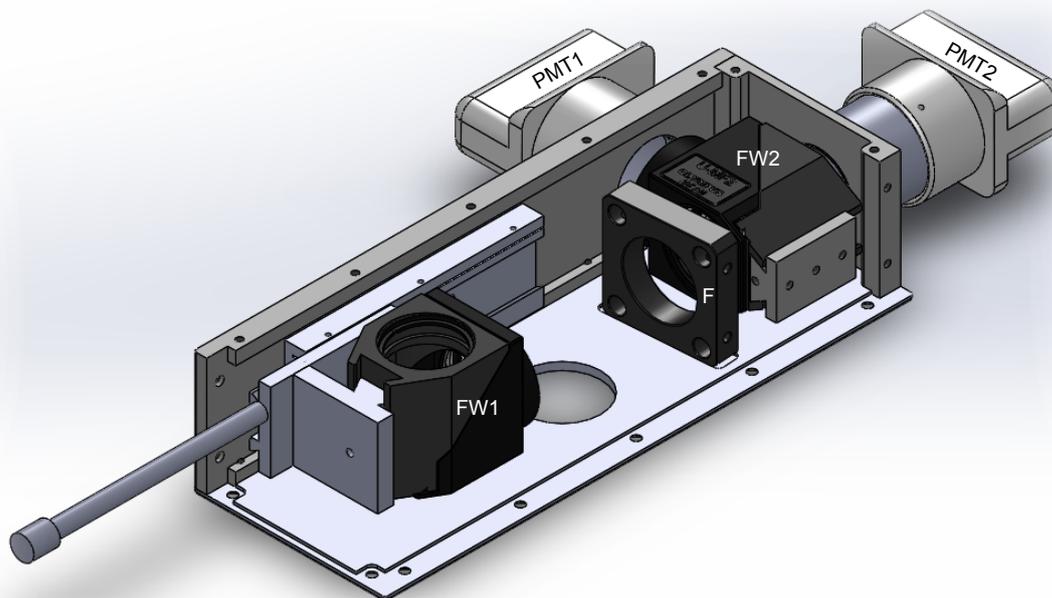


Abbildung 3.2: Modell der offenen Detektorbox. Der erste Filterwürfel (FW1) beinhaltet einen dichroitischen Spiegel und kann verschoben werden, sodass das emittierte Licht zu den Photomultiplier gelenkt wird. Das emittierte Licht passiert anschließend einen Kurzpassfilter (F) und wird am zweiten Filterwürfel (FW2) in rotes und grünes Licht mit Hilfe eines weiteren dichroitischen Spiegels und Bandpässen aufgeteilt und schließlich mit Linsen auf die Photomultiplier (PMT1, PMT2) fokussiert, mit denen es detektiert wird.

Schlussendlich wird der Strahl in das aufrechte Mikroskop (MS) eingekoppelt. Das Mikroskop wurde insofern modifiziert, dass ein Zwischenstück eingebaut wurde, das den Mikroskopaufsatz anhebt, sodass die Detektorbox mit den Photomultipliern eingefügt werden konnte. Innerhalb des Mikroskops gelangt der Strahl nun über einen Spiegel ins Objektiv (O), von wo

er auf die zu untersuchende Probe trifft. Der Tisch mit der fluoreszierenden Probe kann über Motoren (Luigs & Neumann) in 3 Dimensionen elektrisch bewegt werden. Das fluoreszente Licht, das vom Fluophor emittiert wird, gelangt durch das Objektiv wieder zurück in die Detektorbox. Die Detektorbox wurde mit SolidWorks (Dassault Systèmes) konstruiert und beinhaltet einen verschiebbaren dichroitischen Spiegel, mehrere Filter und Adapter zur Fixierung der Photomultiplier (Abbildung 3.2). Das Fluoreszenzlicht wird in der Detektorbox nun über einen weiteren dichroitischen Spiegel (D) und Filter (F) aufgetrennt und auf die Photomultiplier (PMT) gelenkt, die die Lichtintensität in ein elektrisches Signal umwandeln und zur Datenaquisition (DAQ) durch Steuerkarten weiterleiten.

Das Mikroskop kann auch wie ein gewöhnliches Fluoreszenzmikroskop benutzt werden, dazu ist es mit einer Fluoreszenzlampe (CoolLED), sowie einer Durchlichtlampe (Olympus), Filtersätzen (Chroma), einer CCD-Kamera (Till Photonics) und Okular (Olympus) ausgestattet. Über verschiedene Schieber kann zwischen Laserbetrieb und herkömmlicher Fluoreszenzmessung umgeschaltet werden. Der gesamte Strahlengang des Lasers ist abgeschirmt, sodass bei normalem Betrieb Laserlicht nur aus dem Objektiv austritt. Die Aufnahmekammer kann weiterhin gegen störendes Umgebungslicht mit einem Vorhang abgeschirmt werden. Die verwendeten Bauteile sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

3.1.2 Steuerung

Die Steuerung des Mikroskops erfolgt durch das Programm ScanImage (Pologruto et al., 2003). Einige Anpassungen der Software mussten für die verwendeten elektrischen Elemente vorgenommen werden. In Abbildung 3.3 sind die Ein- und Ausgänge für die Steuerung des Mikroskops dargestellt. Die Steuerung (Datenaquisition) erfolgt dabei im wesentlichen über zwei Steuerkarten. Der Laserscanner, bestehend aus zwei galvanisch verstellbaren Spiegeln, wird über je eine Kontrollkarte für die X- und Y-Richtung durch ein analoges Ausgangssignal gesteuert. Zur Aufnahme eines Bildes wird ein Spiegel schnell bewegt und der andere so langsam, dass der erste Spiegel einmal vollständig ausgelenkt wird, bis sich der zweite bewegt, sodass Zeile für Zeile die Fokusebene abgerastert wird. Weiterhin wird zu Beginn jeder Bild-

3.1.3 Messung der Punktstreiffunktion

In Abschnitt 2.4 wurde die Breite Punktstreiffunktion als Maß für die Auflösung eines Mikroskops eingeführt. Um die Punktstreiffunktion experimentell zu bestimmen, wurden fluoreszierende Kügelchen (engl. Beads) verwendet. Die verwendeten Kügelchen (Molecular Probes) hatten einen Durchmesser von 100 nm, der somit deutlich unter der theoretischen Auflösungsgrenze des Zwei-Photonen-Mikroskops lag. Es wurden Bilder der Kügelchen mit einer Anregungswellenlänge von 940 nm und einem 40X Objektiv (0,8 NA) aufgenommen. In Abbildung 3.4 ist das gemessene Bild eines Kügelchens dargestellt und das Intensitätsprofil abgebildet. In das gleiche Diagramm wurde auch die theoretisch berechnete Gauß-Verteilung der Punktstreiffunktion für die verwendete Wellenlänge und Apertur gestrichelt dargestellt. Die real gemessene Punktstreiffunktion unterscheidet sich optisch nur geringfügig von der theoretisch möglichen. Die real gemessene Halbwertsbreite wurde mit $\text{FWHM}_{\text{real}} = 472 \text{ nm}$ bestimmt und liegt damit weniger als 15 % über der theoretisch erreichbaren mit $\text{FWHM}_{\text{th}} = 415 \text{ nm}$. Das gebaute Mikroskop ist also in der Lage Bilder mit guter Auflösung nah an der Beugungslimitierung zu machen. Das gemessene Profil des Kü-

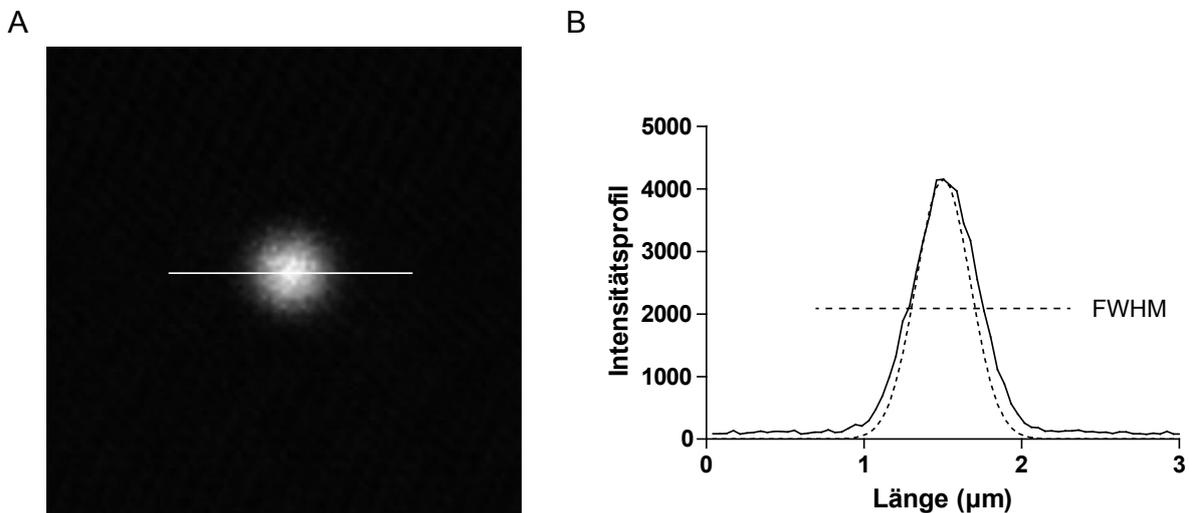


Abbildung 3.4: Experimentelle Bestimmung der Punktstreiffunktion. A) Aufnahme eines 100 nm großen fluoreszenten Kügelchens mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 940 \text{ nm}$ und einem 40X Objektiv (0,8 NA). **B)** Intensitätsprofil entlang der in (A) markierten Linie. Gestrichelt ist die theoretisch erreichbare Punktstreiffunktion dargestellt. FWHM = Halbwertsbreite

gelchen weist daneben ein rundes Profil auf, was für eine gute Ausrichtung des Laserstrahls entlang der optischen Achse spricht.

3.2 Methoden

3.2.1 Mausmodelle

Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW genehmigt und mit großer Sorgfalt unter Einhaltung der Richtlinien des Universitätsklinikums Bonn und des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland durchgeführt (Az. 84-02.04.2011.A108).

SynCAM1^{flag} Überexpression: Die verwendeten SynCAM1^{flag} überexprimierenden Mäuse wurden von Thomas Biederer und Mitarbeitern generiert und daraufhin von Robbins et al. (2010) erstmals beschrieben. Die Expression von SynCAM1^{flag} wurde mittels Doxycyclin durch ein Tet-Off System kontrolliert (Gossen und Bujard, 1992). Die SynCAM1^{flag} Überexpression wurde über den CamKII (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase) Promotor gesteuert. Die verwendeten Mäuse mit C57BL/6 genetischem Hintergrund wurden mit Thy-1 GFP Mäusen (GFP-M Linie, Feng et al., 2000) verpaart, in denen ein Teil der Neuronen unter der Kontrolle des modifizierten Thy-1 Promotors (Thymocyte differentiation antigen 1) grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimiert. Die so markierten Zellen konnten mit Hilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie visualisiert werden. Mit Doxycyclin behandelte Geschwistertiere mit positivem tTA-Transgen, aber ohne das Gen für SynCAM1^{flag} dienten als Kontrolltiere.

SynCAM1 Knockout: Die SynCAM1 Knockout-Mäuse (Fujita et al., 2006) mit C57BL/6 genetischem Hintergrund wurden ebenfalls mit den Thy-1 GFP Mäusen (GFP-M Linie, Feng et al., 2000) verpaart. Experimentell wurden homozygote SynCAM1 Knockout-Tiere mit homozygoten Geschwistertieren mit unbeeinträchtigtem SynCAM1-Gen verglichen.

Haltung: Die Tiere wurden in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus gehalten mit Futter und Wasseraufnahme *ad libitum* und konstanter Temperatur bei 21-22 °C. Mit 4 Wochen wurden

die Mäuse abgesetzt, nach Geschlechtern getrennt und mit bis zu fünf Tieren aus demselben Wurf gehalten. Mäuse, die zur experimentellen Untersuchung von Spines vorgesehen waren, wurden im Anschluss an die Implantation des kranialen Fensters (Abschnitt 3.2.2) einzeln gehalten. Weiterhin wurden Tiere, die für Experimente vorgesehen waren, nicht verpaart.

Um die SynCAM1^{flag} Überexpression zu unterdrücken, wurde den Mäusen 1 g/l Doxycyclin und 5 g/l Saccharose mit dem Trinkwasser verabreicht. Die Gabe von Doxycyclin-haltigen Wasser startete mit der Schwangerschaft der Mutter, sodass schon während der Embryonalentwicklung die Überexpression unterdrückt wurde. Die SynCAM1^{flag} Überexpression konnte temporär kontrolliert werden, indem Doxycyclin-haltiges Wasser durch Doxycyclin-freies Wasser ersetzt wurde und *vice versa*. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit wurde Doxycyclin-haltiges Trinkwasser in lichtundurchlässigen Flaschen aufbewahrt und spätestens nach 7 Tagen gewechselt. Dauerhaft SynCAM1^{flag} überexprimierende Tiere bekamen bis zum eventuellen Stopp der Überexpression zu keiner Zeit Doxycyclin-haltiges Wasser.

3.2.2 Implantation des kranialen Fensters

Als Grundlage der Implantation des kranialen Fensters zur Untersuchung der Spinedynamik diente das Protokoll von Holtmaat et al. (2009).

Für die Operation wurden Mäuse im Alter von 12-14 Wochen verwendet. Die Maus wurde durch eine intraperitoneale Injektion mit Medetomidin (0,5 mg/kg), Midazolam (5 mg/kg) und Fentanyl (0,05 mg/kg) betäubt. Nach Eintreten der Anästhesie wurde das Analgetikum Carprofen (5 mg/kg) subkutan appliziert. Die Maus wurde auf einer Wärmeplatte platziert und gegen Dehydratation der Augen Augensalbe verabreicht. Die Kopfhaut wurde großzügig enthaart und mit Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde die Maus in einem Stereotaxen (Neurostar) fixiert. Für die Operation wurde ausschließlich steriles Operationsbesteck verwendet. Zunächst wurde der Schädel beider Hemisphären durch Entfernen der Kopfhaut freigelegt. Das Periosteum wurde beiseite geschoben. Die verbliebene Kopfhaut wurde mit Cyanacrylat (UHU) an den Schädel geklebt, sodass der freigelegte Schädel vollständig von fixierter Kopfhaut umrahmt wurde. Mit einem Turbinenbohrer (K-Air plus, Kavo) wurde

auf der posterioren Seite der linken Hemisphere über dem visuellen Cortex mit höchster Geschwindigkeit ein ca. 3-4 mm großer Kreis gebohrt. Ohne Druck wurde der Kreis wieder und wieder nachgefahren, bis sich die Knocheninsel sanft vom restlichen Schädel löste. Um Wärmeentwicklung zu vermeiden, wurde mit Kochsalz-Lösung gespült und mit einem Wattestäbchen wieder getrocknet. Mit einer Pinzette wurde schließlich das freigelegte Knochenstück unter einem Tropfen Kochsalz-Lösung vorsichtig entfernt, sodass das darunter liegende Gehirn offen gelegt wurde. Die Dura wurde durch die Präparation nicht geschädigt. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde das exponierte Gehirn mit steriler Kochsalz-Lösung ständig feucht gehalten. Ein rundes, steriles Deckgläschen mit 5 mm Durchmesser (Menzel) wurde ohne Luftbläschen und ohne Druck über der kranialen Öffnung platziert. Das Deckgläschen wurde nun mit Cyanacrylat versiegelt. Nach dem Trocknen des Cyanacrylates und der Schädeloberfläche wurde Dentalzement (Paladur, Heraeus Kulzer) nach Herstellerangaben angerührt. Der freigelegte Schädel wurde mit dem flüssigen Dentalzement inklusive des Kopfhautansatzes und den Rändern des Deckgläschens vollständig bedeckt, sodass nur noch ein ungefähr 3 mm großes kraniales Fenster frei blieb. Solange der Dentalzement noch feucht und formbar war, wurde ein Delrinbalken mit Schraublöchern über der rechten Hemisphäre positioniert und mit Zement fixiert. Der Balken diente später der Fixierung des Mauskopfes unter dem Objektiv. Nach Trocknung des Zementes wurde die Maus aus dem Stereotakten entfernt. Abschließend wurde das Antibiotikum Enrofloxacin (5 mg/kg) und als Antagonisten für die Anästhesie Atipamezol (2,5 mg/kg), Flumazenil (0,5 mg/kg) und Naloxon (1,2 mg/kg) intraperitoneal injiziert.

Die Maus wachte unter Beobachtung unter einer Wärmelampe auf. Die anschließende postoperative Erholungsphase dauerte 4 Wochen.

3.2.3 *In vivo* Zwei-Photonen-mikroskopische Aufnahmen von dendritischen Spines

Nach der Erholung wurde mit den Bildaufnahmen begonnen. Dafür wurde die Maus intraperitoneal mit Ketamin (104 mg/kg) und Xylazin (8 mg/kg) betäubt. Die Aufnahmen der dendritischen Spines für einen Zeitpunkt dauerten in der Regel 45 - 90 min pro Maus. Vor

jeder Messung wurde das Glasplättchen mit Ethanol gesäubert und rundherum wurde Vaseline aufgetragen, um eine gute Wasserimmersion zu gewährleisten. Der Kopf der Maus wurde mit Hilfe des Delrinbalkens (Abschnitt 3.2.2) an einer Metallhalterung auf dem Mikroskopisch befestigt. Der Winkel, der Maus unter dem Objektiv blieb somit gleich für verschiedene Messtage. Weiterhin wurden durch die Fixierung Atmungsartefakte minimiert und eine stabile Position gewährleistet. Um eine Unterkühlung zu vermeiden, wurde der Mikroskopisch während der Aufnahmen durch eine Wasserheizung auf konstanten 32 °C gehalten. Die Augen wurden mit Augensalbe (Bayer) geschützt und während der gesamten Aufnahmezeit wurde beobachtet, ob die Tiere ruhig und kontinuierlich atmeten.

Am ersten Messtag wurden dendritische Abschnitte gewählt, die für den Messzeitraum untersucht werden sollten. Von diesen Abschnitten wurden mit Hilfe der CCD-Kamera Bilder mit einem 40X Objektiv (NA 0,8) und einem 4X Objektiv (NA 0,1) aufgenommen. Anhand des einzigartigen Musters der Blutgefäße konnte derselbe Dendrit zu einem späteren Zeitpunkt identifiziert werden. Mit dem Zwei-Photonen-Laser wurden nun hochauflösende z-Stapel aufgenommen. Dazu wurden Bilder mit 1024 x 1024 Pixel mit 16 bit Farbtiefe in 2D aufgenommen. Danach wurde der motorisierte Tisch um 0,3 µm nach oben verschoben und die nächste Aufnahme gestartet. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis sich daraus ein 3D-Stapel ergab, der den zu untersuchenden Dendriten beinhaltet. Als Laserwellenlänge wurde 910 nm zur Zwei-Photonen-Anregung von GFP verwendet. Die Laserleistung wurde unter 65 mW vor dem Durchtritt durch das Objektiv gehalten, um den Photoschaden zu minimieren.

Nur Lamina V Neurone wurden zur Auswertung herangezogen. Hierzu wurden die Dendriten bis zum Soma verfolgt und der Abstand zur Cortexoberfläche bestimmt. Alle Somata mit einer Tiefe von über 350 µm wurden als Lamina V Pyramidenzellen klassifiziert. Der Anteil der GFP-markierten Lamina II/III Neurone, deren Somata typischerweise in 200-300 µm unterhalb der Oberfläche lag, war in den hier verwendeten Tieren sehr gering und ließ sich oft schon vorher durch die vergleichsweise höhere Spinedichte erkennen.

Für jedes Tier wurden auf diese Weise 3-5 Stapel von apikalen Dendriten der Lamina V Neuronen aufgenommen. Nach der Messung wurden die Tieren bis zur nächsten Messung in

ihren Käfig gebracht.

3.2.4 Analyse von dendritischen Spines

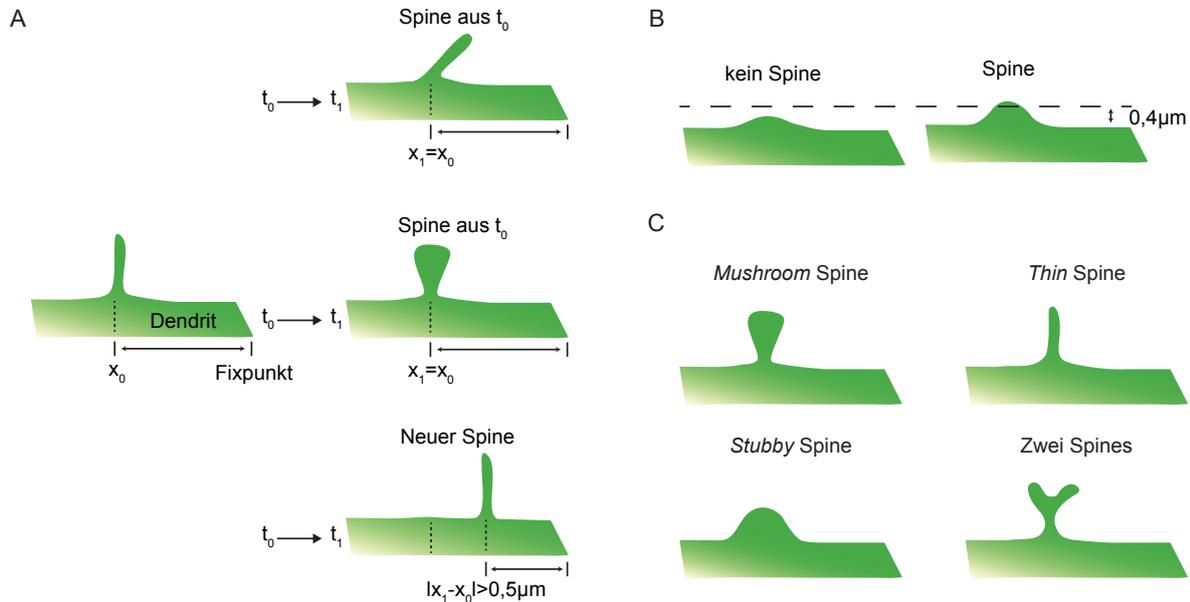


Abbildung 3.5: Klassifikation von dendritischen Spines. A) Zwei Spines in aufeinanderfolgenden Zeitpunkten gelten als identisch, wenn ihre Schaft um weniger als $0,5 \mu\text{m}$ zu festen Fixpunkten auseinanderliegen. B) Ein Spine wird nur gewertet, wenn er mindestens $0,4 \mu\text{m}$ seitlich vom Dendrit liegt. C) Klassifikation verschiedener Spinetypen. Abgewandelt nach (Holtmaat et al., 2009; Harris et al., 1992)

Die Analyse der aufgenommenen Spines erfolgte mit in Matlab (Mathworks) individuell geschriebener Software (Abbildung 3.6) und ImageJ (National Institute of Health). Zunächst wurde für jeden z-Stapel eine Maximumprojektion erstellt, sodass der zu untersuchende Dendrit vollständig enthalten war. Dabei wurden nur Stapel verwendet, die ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis hatten und somit die eindeutige Identifikation von Spines ermöglichten. Die Maximumprojektionen desselben Dendriten für verschiedene Zeitpunkte wurden zu einem neuen Stapel zusammengesetzt, der somit die zeitliche Veränderung eines Dendriten abbildete. Die Stapel mit den Maximumprojektionen wurden registriert. Anhand der registrierten Maximumprojektionen wurden nun Spines identifiziert und ausgewertet. Die Maximumprojektionen dienen dabei lediglich dazu, die Spines zu markieren. Die Identifikation der Spines erfolgte ausschließlich in den original 3D-Stapeln. Die Auswertung erfolgte blind in

Bezug auf die Genotypen. Verschiedene Kriterien zum Zählen der Spines wurden angewandt (Abbildung 3.5). Es wurden nur Spines mindestens $0,4 \mu\text{m}$ lateral vom parentalen Dendriten gezählt. Spines ober- oder unterhalb des Dendriten wurden nicht gezählt. So wurden alle Spines für einen Abschnitt auf dem Dendriten bestimmt. Anschließend wurden beim nächsten Zeitpunkt alle neuen Spines gezählt und für jeden Spine geprüft, ob er noch vorhanden war. Dabei wurde als Referenz der Austritt des Spinehalses vom Dendriten in Bezug auf feste Orientierungspunkte auf dem Dendriten und die relative Position zu benachbarten Spines verwendet. Spines wurden als dieselben gewertet, wenn ihr Austrittspunkt nicht mehr als $0,5 \mu\text{m}$ von ihrer erwarteten Position abwich. Dies wurde für alle Zeitpunkte sukzessive durchgeführt, sodass für jeden Spine erfasst wurde, zu welchen Zeitpunkten er präsent war.

Anhand dieser Daten konnte die Dichte, der Gewinn, der Verlust, der Umsatz und die Stabilität von Spines analysiert werden. Um die Dichte der Spines zu bestimmen, wurde die Länge des Abschnitts bestimmt, über den die Anzahl der Spines ausgewertet wurde. Als Gewinn und Verlust wurden alle Spines gewertet, die zu einem Zeitpunkt dazukamen N_{gewonnen} oder verschwanden N_{verloren} . Der Umsatz ergab sich als $\text{Umsatz} = (N_{\text{gewonnen}} + N_{\text{verloren}}) / (2 \cdot N_{\text{total}})$ mit N_{total} der Anzahl der Spines zum vorherigen Zeitpunkt. Die Überlebensrate und damit die Stabilität vorhandener Spines als Funktion der Zeit ermittelte sich aus dem Anteil der Spines, die seit dem ersten Zeitpunkt weiterhin beobachtet werden konnten. Weiterhin ergab sich der Anteil der stabilen Spines als derjenige Anteil der Spines, die im nachfolgenden Zeitpunkt noch vorhanden waren. Zur Bestimmung der Überlebensrate von neuen Spines wurden die gewonnenen Spines des zweiten bis vierten Zeitpunkts (Tag 3 bis 9) zusammengefasst und ihre Überlebensrate für die vier folgenden Zeitpunkte ermittelt. Dabei wurden Spines, die in allen vier Zeitpunkten gezählt wurden, als neue beständige Spines klassifiziert.

Spines wurden weiterhin anhand morphologischer Daten klassifiziert (Harris et al., 1992). Als *Thin* Spines wurden Fortsätze gewertet, die mindestens die Länge des Dendritendurchmessers hatten und keinen klaren Spinekopf. *Filopodia* wurden klassifiziert als Fortsätze, die ungefähr 3 mal die Länge des Dendritendurchmessers hatten und eventuell eine Schwellung an ihrer Spitze. *Filopodia* und *Thin* Spines wurden als unreife Spines zu *Filopodia*-ähnlichen

Spines zusammengefasst. Fortsätze mit Kopf wurden als *Mushroom Spines* gewertet, unabhängig von ihrer Länge. Als *Stubby Spines* wurden Fortsätze gezählt, die eine Länge entsprechend ihres Halsdurchmessers hatten. *Mushroom* und *Stubby Spines* wurden als reife Spines zusammengefasst.

Für die Abbildungen wurden gefilterte Maximumprojektionen aus z-Stapeln erstellt, die nur die Bildinformation des entsprechenden Dendriten in der besten Fokusebene enthielten (Photoshop, Adobe). Insgesamt wurden 14723 verschiedene Spines (42366 Spines ohne Berücksichtigung der Gleichheit) auf 203 Dendriten von 48 Tieren über eine dendritische Länge von 14,347 mm über einen Zeitraum von bis zu 201 Tagen untersucht.

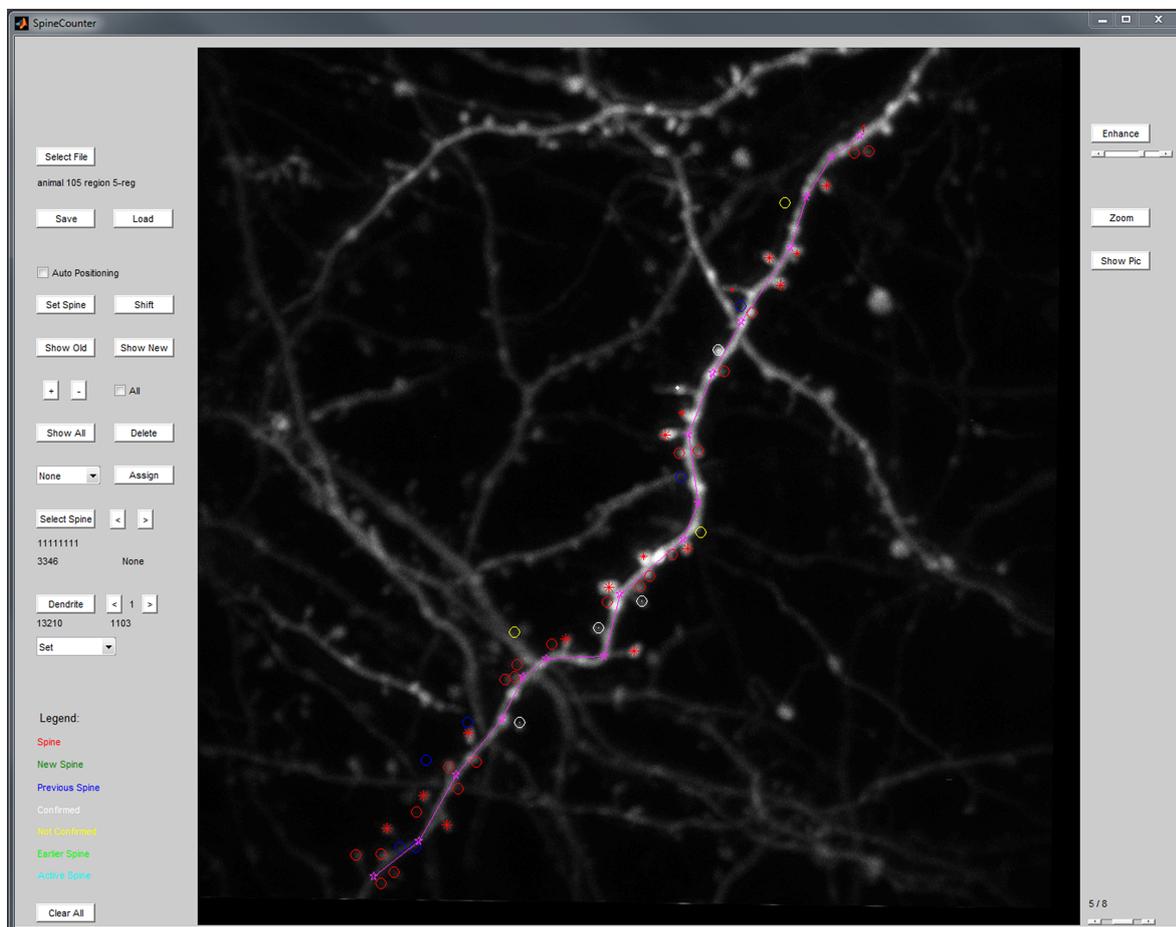


Abbildung 3.6: Screenshot zur Auswertung der Spinedynamik.

3.2.5 Statistik

Die Daten wurden mit Prism 5 (GraphPad) auf statistische Signifikanz getestet. Es wurde entweder ein gepaarter t-Test verwendet, um die Mittelwerte von verschiedenen Gruppen zu vergleichen oder ein ungepaarter t-Test für den Vergleich einzelner Zeitpunkte. Es wurde immer zwischen Kontrollgruppe und Experimentalgruppe (also SynCAM1^{flag} Überexpression oder SynCAM1 Knockout) getestet. Signifikanzniveaus ergeben sich aus: * entspricht $p < 0,05$; ** entspricht $p < 0,01$ und *** entspricht $p < 0,001$.

3.2.6 Western Blot

Zur quantitativen Analyse der SynCAM1^{flag} Überexpression wurden Western Blots durchgeführt. Es wurden dabei zwei qualitativ verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Im ersten Ansatz wurde das Expressionslevel von SynCAM1^{flag} nach 0, 1, 3, 7, 14, 21 oder 28 Tagen Überexpression gemessen. Als zweites wurde die SynCAM1^{flag} Expression 0, 3, 7 oder 30 Tage nach Stopp der Überexpression analysiert. Den Start oder Stopp der SynCAM1^{flag} Überexpression wurde durch das Absetzen bzw. Zugeben von Doxycyclin gesteuert. Es wurden für jeden Zeitpunkt mindestens zwei SynCAM1^{flag} positive Tiere im Alter von 14-16 Wochen verwendet. Zusätzlich wurden SynCAM1^{flag} negative Kontrolltiere für 28 Tage ohne Doxycyclin und für 0 Tage mit Doxycyclin verwendet.

Nach zervikaler Dislokation wurde der Cortex entnommen und kryokonserviert. Die gefrorenen Cortexhälften wurde nach Zugabe von 500 μ l RIPA-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % SDS, 1 % Triton x-100, 0,5 % Natriumdeoxycholat) mit einem Sonicator homogenisiert und lysiert. Die Proben wurden bei 4 °C und 20000 x g für 30 min zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und dessen Proteinmenge nach Herstellerangaben mittels BCA-Test (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

Durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine zunächst aufgetrennt. Dazu wurde ein Gel, bestehend aus einem Sammelgel (pro 10 ml: 6,8 ml H₂O, 1,7 ml 30 % Acrylamid-Mix, 1,25 ml 1,5M Tris, 0,1 ml 10 % SDS, 0,1 ml 10 % Ammoniumpersulfat und 0,01 ml TEMED) und einem Trenngel (pro 20 ml: 7,9 ml H₂O, 6,7 ml 30 % Acrylamid-Mix,

5 ml 1,5M Tris, 0,2 ml 10 % SDS, 0,2 ml 10 % Ammoniumpersulfat und 0,008 ml TEMED), gegossen. Bevor die Taschen im Sammelgel geladen wurden, wurden die Proteinproben nach ihrer Konzentration mit RIPA-Puffer verdünnt, sodass insgesamt 20 µl Lösung mit gleicher Konzentration entstanden. Zu den Proteinlösungen wurden 5 µl Ladepuffer (12,5 % Glycerol, 31,25 mM Tris-HCL pH 6,8, 1 % SDS, 0,02 % Bromphenolblau) gegeben. Weiterhin wurden 5 µl 5 %iges β-Mercaptoethanol hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C inkubiert. Dabei wurden durch die Wirkung der Reduktionsmittel DTT und β-Mercaptoethanol die Disulfidbrücken aufgebrochen und die Proteine denaturiert. Gleichzeitig bindet SDS an die Proteine in einem konstanten Mengenverhältnis von ungefähr 1,4 g negativ geladenem SDS pro g Protein. Durch die elektrische Abstoßung führt dies zu einer weiteren Linearisierung der Proteine. Die Proteine können so im Gel durch ein elektrisches Feld der Größe nach aufgetrennt werden. Die Kammer wurde mit Laufpuffer (1 % SDS, 250 mM und 1920 mM Glycin) aufgefüllt und das Gel für 4-5 Stunden bei 60 V laufen gelassen.

Anschließend fand der eigentliche, in Anlehnung an den Southern Blot benannte, Western Blot (Burnette, 1981) statt, wobei es sich um den Transfer der Proteine auf eine Membran handelt (Towbin et al., 1979; Renart et al., 1979). Dazu wurde eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, Millipore) für 10 s in Methanol aktiviert und mit dem Gel in die Blot-Kammer eingespannt. Es wurde mit gekühltem Transferpuffer (25 mM Tris, 1920 mM und 20 % Methanol) aufgefüllt und über Nacht bei 4 °C mit 15 V geblottet. Durch die Spannung migrierten die Proteine vom Gel in die PVDF-Membran. Die Membran wurde mit 5 % Milchpulver in TBST (Tris Buffered Saline Tween-20; 1,21 g Tris, 8,76 g NaCl, 0,1 ml Tween-20 in 1 l H₂O) geblockt und anschließend über Nacht in 5 %iger Milch mit Primärantikörpern 1/1000 Maus anti-flag (clone M20, Sigma Aldrich) und 1/1000 Maus anti-actin (clone AC-40, Sigma Aldrich) bei 4 °C inkubiert und rotiert. Schließlich wurde 3 x 10 min in TBST gewaschen und 1 h in 5 %iger Milch mit 1/1500 Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-mouse, Cell Signaling Technology) inkubiert. Nun wurde erneut 3 x 10 min in TBST gewaschen, bis der Blot entwickelt wurde. Zum Entwickeln wurde die Membran mit dem Immobilon Entwickler (Millipore) gleichmäßig benetzt und das emittierte Licht wur-

de mit einem Photodetektor gemessen. Die so entstandenen Bilder wurden zur Bestimmung der überexprimierten Menge SynCAM1^{flag} herangezogen. Die Stärke der einzelnen Banden wurde mit ImageJ analysiert. Aktin diente dabei als Referenz für die Gesamtmenge an verwendetem Protein in den einzelnen Proben. Jeder Blot wurde 2-3 mal mit unterschiedlichen Proteinlysaten durchgeführt.

3.3 Material

3.3.1 Bauteile für das Zwei-Photonen-Mikroskop

Tabelle 3.1: Verwendete Bauteile

Bauteil	Typ	Hersteller / Lieferant
Mikroskop	BX51WI	Olympus
Objektiv	LUMPLFLN 40XW	Olympus
Objektiv	PLN 4XCY	Olympus
Filterwürfel	U-MF2	Olympus
Ti:Sa Laser	Chameleon Vision-S	Coherent
Verzögerungsplatte	Half-Wave Plate AHWP05M-980	Thorlabs
Polarisator	Glan-Laser Polarizer GL10-B	Thorlabs
Photodetektor	Gain Detector PDA100A-EC	Thorlabs
Rotator Station	Rotation Stage PRM1/MZ8E	Thorlabs
Shutter	Beam Shutter SH05	Thorlabs
Steuerung Scanner	671 Series Servo Driver	Cambridge Technology
Laserscanner	6215H	Cambridge Technology
Datenaquisition	NI PXIe-6124	National Instruments
Datenaquisition	NI PXIe-6363	National Instruments
Verstärker	DHPCA-100	FEMTO
PMT (GaAsP)	Photosensor module H7422-40	Hamamatsu
PMT	Photomultiplier tube R6357	Hamamatsu
Motorisierter Tisch	Shifting table V380-FM	Luigs & Neumann
Motorisierter Fokus	motorized Focus Axis	Luigs & Neumann
Motorsteuerung	SM-5 Controller	Luigs & Neumann
Dichroitischer Spiegel	720dcxxr	Chroma
Dichroitischer Spiegel	t560lpxr	Chroma
Filter	et525/50m	Chroma
Filter	et620/60m	Chroma
Filter	et800sp-2p8	Chroma
Verschiedene Bauteile		Thorlabs
Elektronik		RS Components

3.3.2 Pharmaka

Pharmaka wurden mit Ausnahme von Doxycyclin in gewünschter Konzentration in steriler, 0,9 %iger Kochsalz-Lösung verdünnt. Doxycyclin wurde in Trinkwasser gelöst.

Tabelle 3.2: Pharmaka

Wirkstoff	Hersteller / Lieferant
Atipamezolhydrochlorid	Orion
Carprofen	Pfizer
Doxycyclinhyclat	Fagron
Enrofloxacin	Bayer
Fentanyl	Janssen
Flumazenil	hameln
Ketamin	medistar
Medetomidinhydrochlorid	cp pharma
Midazolam	ratiopharm
Naoloxonhydrochlorid	ratiopharm
Xylazinhydrochlorid	Ceva

3.3.3 Chemikalien

Tabelle 3.3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller / Lieferant
Acrylamid-Mix	Bio-Rad
Methanol	AppliChem
Natriumdexychoat	Calbiochem
Tris	Promega
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat	Merck
β -Mercapto	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Glycerol	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
Triton x-100	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth
Saccharose	Roth
Milchpulver	REWE

4 Ergebnisse

Die Bildung neuer Synapsen und ihre Aufrechterhaltung ist bis heute nur unvollständig verstanden. SynCAM wurde dabei als eines der Proteine identifiziert, das die Verbindung der Präsynapse mit der Postsynapse vermittelt (Biederer et al., 2002). In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass SynCAM1 einen direkten Einfluss auf die Anzahl der Synapsen hat (Robbins et al., 2010). So besitzen Mäuse, die SynCAM1^{flag} überexprimieren mehr exzitatorische Synapsen. Im Gegensatz dazu haben SynCAM1 Knockout-Mäuse weniger exzitatorische Synapsen. Es konnte dabei jedoch nicht eindeutig beantwortet werden, wodurch es zur Zu- bzw. Abnahme der Synapsen kam.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Einfluss von SynCAM1 auf die dendritische Spinedynamik im adulten Tier zu analysieren. Dabei soll überprüft werden, inwiefern SynCAM1 die Bildung, Reifung oder Stabilität von Spines beeinflusst und als Folge dessen die Spinedichte verändert. Dazu wurde mit Hilfe Zwei-Photonen-mikroskopischer *in vivo* Aufnahmen die Spinedynamik von transgenen SynCAM1 Mäusen untersucht, um Rückschlüsse auf die Funktion von SynCAM1 zu ziehen.

4.1 Induzierte SynCAM1^{flag} Überexpression

Die Expression von SynCAM1^{flag} der transgenen Mäuse lässt sich über ein Tet-Off System durch die Gabe von Doxycyclin steuern. Solange die Tiere also Doxycyclin erhielten, exprimierten sie SynCAM1 auf Wildtypniveau. Bekamen die Mäuse kein Doxycyclin wurde SynCAM1^{flag} überexprimiert. Die Überexpression erfolgte dabei unter der Kontrolle des CaMKII-Promotors, der in allen exzitatorischen Vorderhirnneuronen aktiv ist (Mayford et al., 1996).

In diesem Versuchsteil wurde untersucht, wie sich die Spinedichte in adulten Tieren verändert, nachdem die SynCAM1^{flag} Überexpression gestartet wurde und ob sich die Anzahl neugebildeter und verlorener Spines durch ein erhöhtes SynCAM1-Level verändert.

4.1.1 Untersuchung des induzierten SynCAM1^{flag} Expressionslevels

Vorraussetzung um die Auswirkung der SynCAM1^{flag} Überexpression auf dendritische Spines zu untersuchen, war die Charakterisierung des temporär steuerbaren SynCAM1^{flag} Proteinlevels. Dafür war es notwendig zu bestimmen, wie schnell das Protein überexprimiert wird. Hierfür wurden Cortexlysate von Tieren für bis zu 28 Tage nach dem Start der Überexpression mit Western Blots analysiert (Abbildung 4.1A). Die Intensität der SynCAM1^{flag} Bande wurde dabei im Verhältnis zur Intensität der zugehörigen Aktinbande als Ladekontrolle ausgewertet, sodass die Menge an überexprimiertem SynCAM1^{flag} bestimmt werden konnte. Die Stärke der Bande für Tiere, bei denen die Überexpression dauerhaft (Tag 0) unterdrückt wurde, ist equivalent zur Bande von SynCAM1^{flag} negativen Tieren (Ktr.). Daraus folgt, dass die Überexpression mittels Doxycyclin vollständig unterdrückt werden kann. Bereits 1 Tag nach Starten der Überexpression kann eine schwache Proteinbande für SynCAM1^{flag} erkannt werden. Die Menge an überexprimierten SynCAM1^{flag} nimmt bis zu Tag 7 zu. Bei einer längeren Überexpression kann keine weitere Zunahme der SynCAM1^{flag} Proteinmenge beobachtet werden, sodass die Überexpression bereits 7 Tage nach ihrem Start in Sättigung geht.

Weiterhin wurde die Abnahme der SynCAM1^{flag} Überexpression als Funktion der Zeit analysiert. Hierzu wurden Cortexlysate von Tieren verwendet, bei denen die SynCAM1^{flag} Überexpression bis zu 30 Tage vor Organentnahme durch Doxycyclin beendet wurde (Abbildung 4.1B). Bevor die SynCAM1^{flag} Überexpression gestoppt wurde, bekamen die Tiere kein Doxycyclin, sodass die Überexpression seit frühester Entwicklung aktiviert war. Bereits 3 Tage nach dem Start der Doxycyclin Applikation kann eine Abnahme der Intensität der SynCAM1^{flag} Bande beobachtet werden. Nach 7 Tagen war die Menge an überexprimiertem SynCAM1^{flag} bereits um mehr als 60 % reduziert. Spätestens nach 30 Tagen ist das überexprimierte SynCAM1^{flag} vollständig abgebaut, sodass keine SynCAM1^{flag} Bande mehr gemessen wurde.

Das von uns verwendete konditionelle System zur Regulierung der SynCAM1^{flag} Überexpression erwies sich als zuverlässig und schnell. Die Überexpression wird unmittelbar nach Absetzen von Doxycyclin gestartet und geht innerhalb einer Woche in Sättigung. Die Um-

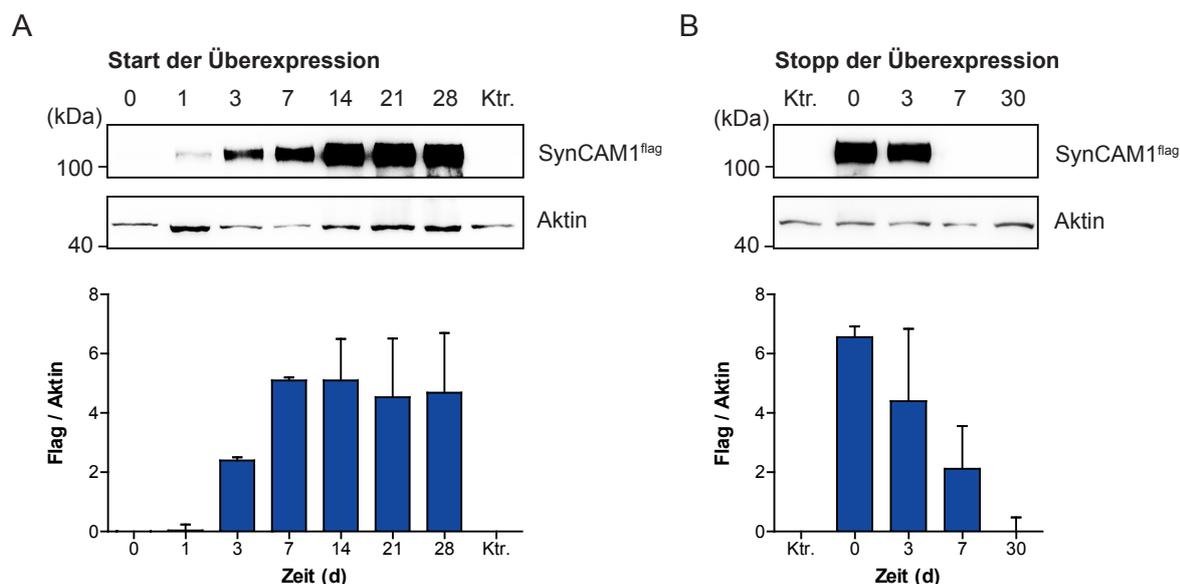


Abbildung 4.1: Analyse der SynCAM1^{flag} Überexpression. **A)** SynCAM1^{flag} Western Blot (oben) für verschiedene Zeitpunkte nach dem Start der SynCAM1^{flag} Überexpression durch Absetzen von Doxycyclin zeigen die Zunahme von überexprimiertem SynCAM1^{flag}. Quantifizierung (unten) durch das Verhältnis der Proteinmenge von SynCAM1^{flag} zu Aktin für die einzelnen Zeitpunkte. **B)** SynCAM1^{flag} Western Blot (oben) für verschiedene Zeitpunkte nach dem Stopp der SynCAM1^{flag} Überexpression durch Gabe von Doxycyclin zeigen die Abnahme von überexprimiertem SynCAM1^{flag}. Quantifizierung (unten) durch das Verhältnis der Proteinmenge von SynCAM1^{flag} zu Aktin für die einzelnen Zeitpunkte. Daten zur Abbildung im Anhang

kehr der Überexpression verläuft ein wenig langsamer, da die überexprimierten Proteine erst sukzessive degradiert werden, nachdem sie ihre Lebensdauer erreicht haben (Goldberg und Dice, 1974).

4.1.2 Erhöhter Zuwachs neuer Spines und Anstieg der Spinedichte durch induzierte SynCAM1^{flag} Überexpression

Als nächstes wurde untersucht, welchen Einfluss die SynCAM1^{flag} Überexpression auf dendritische Spines hat. Die SynCAM1^{flag} überexprimierenden Mäuse wurden mit der GFP-M Linie gekreuzt, die GFP unter der Kontrolle des Thy-1 Promotors in einem kleinen Teil der Neurone exprimieren, wodurch Fluoreszenzaufnahmen ermöglicht werden. So konnten *in vivo* Zwei-Photonen-mikroskopische Bilder von apikalen dendritischen Segmenten von Lamina V Pyramidenzellen aufgenommen werden. Dieselben Dendriten wurden im Abstand von 3

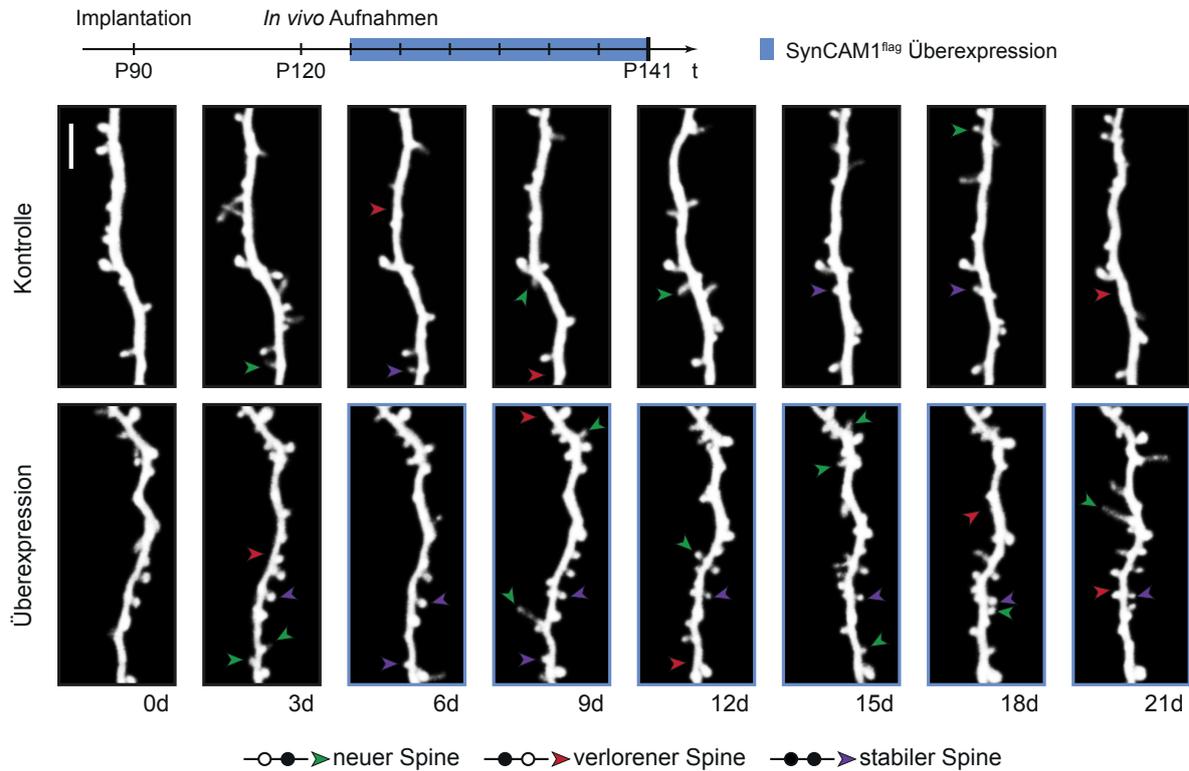


Abbildung 4.2: Induzierte SynCAM1^{flag} Überexpression. Zeitlicher Ablauf des experimentellen Protokolls (oben). Repräsentative *in vivo* Aufnahmen an acht Zeitpunkten von Dendriten einer Lamina V Pyramidenzelle von einem Kontrolltier (obere Bilder) und einem SynCAM1^{flag} Überexpressionstier (untere Bilder). Die Überexpression wurde nach dem zweiten Aufnahmetag durch Absetzen des Doxycyclins gestartet. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. Exemplarisch sind Spines nach verschiedenen Kriterien (unten) klassifiziert, wobei ein ausgefüllter Kreis die Anwesenheit des Spines und ein leerer Kreis seine Abwesenheit bedeutet.

Tagen für 8 Zeitpunkte aufgenommen, sodass die Neubildung und der Verlust von Spines beobachtet werden konnte. In Abbildung 4.2 ist je ein repräsentativer Dendrit von einem Überexpressionstier und einem Kontrolltier für aufeinander folgende Zeitpunkte dargestellt.

Es wurde untersucht, wie sich die Spinedichte mit zunehmender SynCAM1^{flag} Überexpression verändert. Dazu wurde die Überexpression durch Doxycyclin unterdrückt und nach den ersten beiden Aufnahmetagen aktiviert. Die Veränderung der Spinedichte durch die SynCAM1^{flag} Überexpression konnte so verfolgt werden. Als Kontrolle wurden Geschwistertiere verwendet, die mit Doxycyclin behandelt wurden, aber nicht das Gen für die SynCAM1^{flag} Überexpression trugen. Die durchschnittliche Spinedichte, der gemessenen Kontrolltiere, blieb konstant bei durchschnittlichen $0,32 \pm 0,01$ Spines/µm über den Messzeitraum von 21

Tagen (Abbildung 4.3A). Für adulte Tiere ohne äußere Veränderungen wurde in der Literatur ebenfalls eine konstante Spinedichte für Pyramidenzellen über einen Zeitraum von Wochen beschrieben (Grutzendler et al., 2002; Mostany et al., 2013). Die SynCAM1^{flag} überexprimierenden Tiere dagegen zeigten eine signifikante Zunahme der Spinedichte von $0,34 \pm 0,02$ Spines/ μm vor der Behandlung auf $0,42 \pm 0,02$ Spines/ μm an Tag 21. Bereits 18 Tage nach Aktivierung der Überexpression konnte also eine Zunahme der Spinedichte um mehr als 30 % beobachtet werden.

In Abbildung 4.3B wurde der zeitliche Verlauf der Spinedichten für die 30 untersuchten Dendriten und der zugehörige Mittelwert der SynCAM1^{flag} Überexpressionstiere dargestellt. Am ersten Messtag wurden Spinedichten von 0,11 bis 0,50 Spines/ μm für die einzelnen apikalen Dendriten beobachtet, die innerhalb des Messzeitraumes auf Werte von 0,23 bis 0,66 Spines/ μm anstiegen.

Zur genaueren Bestimmung der Ursache des Anstiegs der Spinedichte wurde die Neubildung und der Verlust vorhandener Spines betrachtet (Abbildung 4.3C,D). Als gewonnene, neugebildete Spines wurden dabei diejenigen Spines gewertet, die beim vorangehenden Zeitpunkt nicht beobachtet wurden. Die Bildung neuer Spines wird in den Überexpressionstieren im Gegensatz zu den Kontrolltieren von $0,10 \pm 0,01$ Spines/ μm unmittelbar nach Induktion der Überexpression um ca. 20 % angehoben und verbleibt auf signifikant erhöhten Niveau. Das überexprimierte SynCAM1^{flag}, das bereits 3 Tage nach der Induktion der Überexpression nachgewiesen werden kann (Abbildung 4.1A), wirkt sich also unverzüglich auf die Anzahl der neu gewonnenen Spines aus. Es konnte allerdings noch nicht eindeutig beantwortet werden, ob von Grund auf mehr neue Spines gebildet werden oder ob Spines in einem sehr frühen Stadium stabilisiert werden und somit leichter überleben. In Abschnitt 4.3 wurde weiterführend dazu der Einfluss der SynCAM1^{flag} Überexpression auf die Stabilisation und Entwicklung von Spines untersucht.

Weiterhin wurde der Verlust vorhandener Spines analysiert. Ein Spine galt als verloren, wenn er am darauffolgenden Messtag nicht mehr beobachtet werden kann. Die Verlustrate von Spines ist in den SynCAM1^{flag} überexprimierenden Tieren im Vergleich zu den Kontroll-

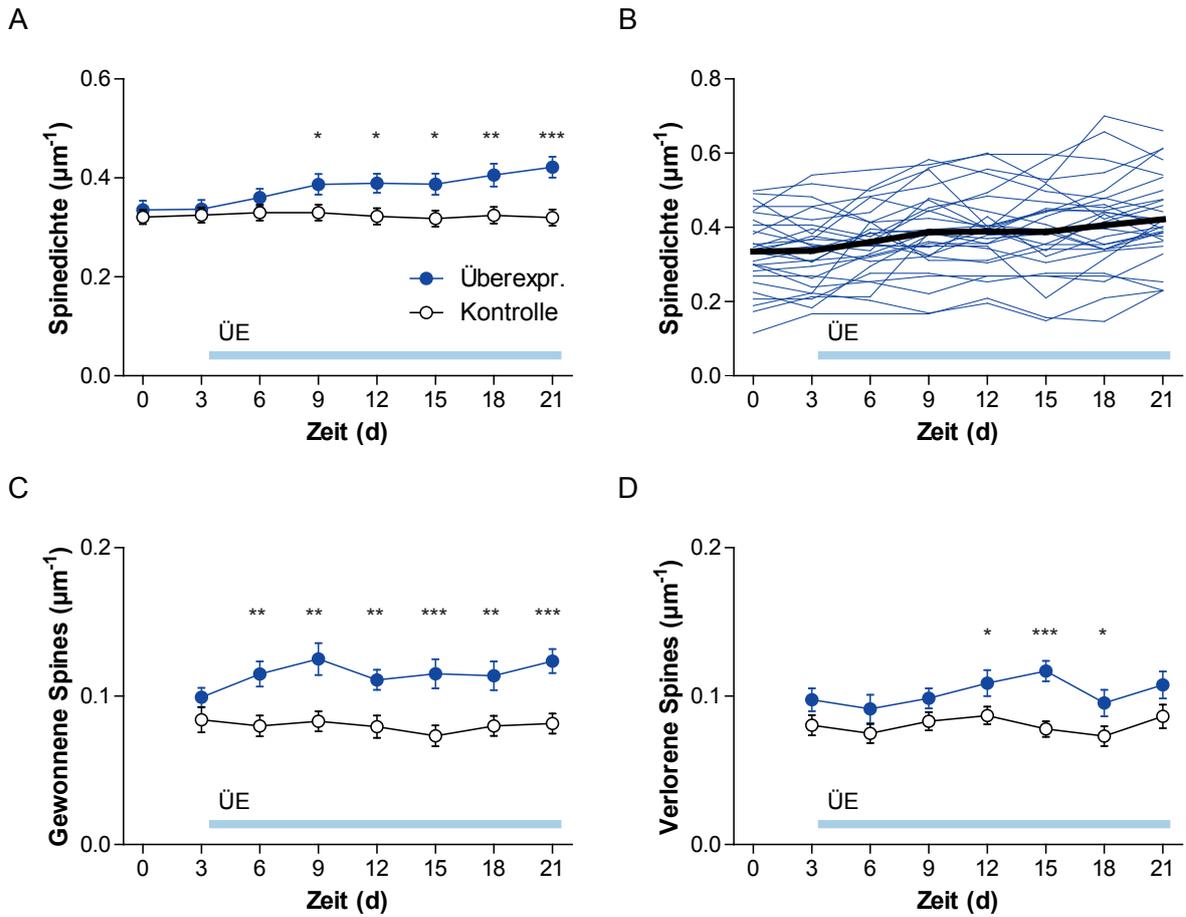


Abbildung 4.3: Die Spinedichte wird durch induzierte SynCAM1^{flag} Überexpression erhöht. **A**) Die Spinedichte nimmt in SynCAM1^{flag} Überexpressionstieren (blau) mit dem Start der Überexpression nach dem zweiten Messtag, im Gegensatz zu den Kontrolltieren (weiß), kontinuierlich zu. **B**) Die Spinedichte der einzelnen Dendriten der SynCAM1^{flag} überexprimierenden Tieren aus **(A)** als Funktion der Zeit mit dem zugehörigen Mittelwert (schwarz). **C,D**) Die Anzahl der Spines die zwischen zwei Messtagen dazukommen **(C)** oder verloren gehen **(D)** steigt in den SynCAM1^{flag} Überexpressionstieren im Verlauf der Messung an. Der hellblaue Balken markiert den Zeitraum der Überexpression. Daten zur Abbildung im Anhang; Überexpr.: n = 32, Kontrolle: n = 29; Signifikanzniveaus: *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

tieren leicht erhöht und steigt im Verlauf der SynCAM1^{flag} Überexpression signifikant an. Ob dieser Anstieg auf die erhöhte Anzahl an Spines zurückzuführen ist oder ob die Stabilität existierender Spines verändert wird, soll im Folgenden analysiert werden (siehe ebenfalls Abschnitt 4.3).

4.1.3 Zunahme stabiler Spines bei induzierter SynCAM1^{flag} Überexpression

Weiterhin wurde der Einfluss der induzierten SynCAM1^{flag} Überexpression auf die Stabilität von Spines analysiert. Als stabile Spines wurden alle Spines gewertet, die an zwei aufeinanderfolgenden Messtagen beobachtet wurden. In Abbildung 4.4A sind die stabilen Spines für den Beobachtungszeitraum von 21 Tagen dargestellt. Nach 3 Tagen wurde die SynCAM1^{flag} Überexpression gestartet. Die Dichte der stabilen Spines vor dem Start der Überexpression von Tag 0 auf Tag 3 betrug $0,24 \pm 0,01$ Spines/ μm in den Kontrolltieren und $0,24 \pm 0,02$ Spines/ μm in den Überexprimierten und war somit nicht signifikant verschieden. Im Verlaufe des experimentellen Ablaufes steigerte sich in den Kontrolltieren die Dichte der stabilen Spines nie über $0,25$ Spines/ μm , wogegen die Anzahl der stabilen Spines in Tieren die SynCAM1^{flag} überexprimierten auf $0,30 \pm 0,02$ Spines/ μm erhöht wurde.

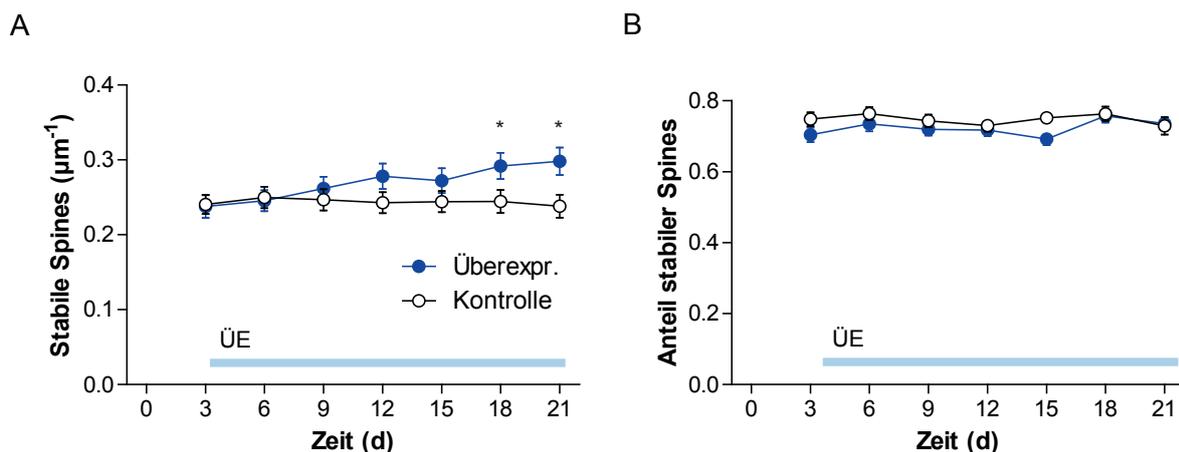


Abbildung 4.4: Die absolute Anzahl stabiler Spines steigt nach induzierter SynCAM1^{flag} Überexpression an. A) Als Folge der induzierten SynCAM1^{flag} Überexpression nimmt die Anzahl der stabilen Spines in den Überexpressionstieren (blau) gegenüber Kontrolltieren (weiß) zu. **B)** Der Anteil der stabilen Spines bleibt dagegen für beide Gruppen konstant. Der hellblaue Balken markiert den Zeitraum der Überexpression. Daten zur Abbildung im Anhang; Überexpr.: n = 32, Kontrolle: n = 29; Signifikanzniveaus: *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

Betrachtet man nun allerdings den prozentualen Anteil der stabilen Spines, so lässt sich keine signifikante Veränderung im Zuge der Überexpression erkennen (Abbildung 4.4B). Im Mittel lag der Anteil stabiler Spines für die Kontrolltiere bei 75 ± 2 % und für die Tiere, die SynCAM1^{flag} überexprimierten, knapp darunter bei 72 ± 2 %.

Ein erhöhtes SynCAM1 Level hat also einen Einfluss auf die absolute Anzahl stabiler Spines, allerdings wird der prozentuale Anteil der stabilen Spines nicht erhöht.

Um den endgültigen Einfluss von SynCAM1 auf die Stabilität von Spines zu bestimmen, wird in Abschnitt 4.3 und Abschnitt 4.4 die Überlebensrate und Lebensdauer von einzelnen Spines von SynCAM1^{flag} Überexpressionstieren und SynCAM1 Knockout-Tieren analysiert. Die Induktion der SynCAM1^{flag} Überexpression führt zur Steigerung der neu gewonnenen Spines und erhöht als Folge die Spinedichte.

4.2 Induzierte SynCAM1^{flag} Langzeitüberexpression

In einem langfristig angelegten Versuchsablauf sollte geklärt werden, ob die Anzahl der Spines bei anhaltender SynCAM1^{flag} Überexpression stetig ansteigt oder in Sättigung geht. Ebenfalls wurde untersucht, ob die erhöhte Spineanzahl durch Abschalten der Überexpression wieder auf das Ursprungsniveau zurückfällt. Dazu wurde wie im vorhergehenden Versuchsablauf (Abschnitt 4.1) die SynCAM1^{flag} Überexpression in adulten Tieren gestartet. Anschließend wurde die Veränderung der Spines monatlich über einen Zeitraum von 6 Monaten beobachtet. In Abbildung 4.5 sind monatlich aufgenommene Bilder von repräsentativen Dendriten von einem Kontrolltier sowie einem SynCAM1^{flag} Überexpressionstier dargestellt.

Nach 4 Monaten der SynCAM1^{flag} Überexpression wurde diese durch die Gabe von Doxycyclin wieder abgestellt und noch zwei weitere Monate gemessen, um zu untersuchen, ob die Spinedichte wieder auf das Ursprungsniveau abfällt. In Abschnitt 4.1.1 wurde gezeigt, dass nach Abschalten der SynCAM1^{flag} Überexpression die überexprimierten Proteine innerhalb eines Monats wieder abgebaut werden, sodass kein überexprimiertes SynCAM1^{flag} mehr nachgewiesen werden kann (Abbildung 4.1). Für die beiden Zeitpunkte nach dem Abschalten der Überexpression war also das überexprimierte SynCAM1^{flag} wieder abgebaut und damit auf Kontrollniveau. Als Kontrolle wurden abermals Geschwistertiere verwendet, die gleichermaßen mit Doxycyclin behandelt wurden, aber nicht das Gen zur SynCAM1^{flag} Überexpression trugen.

Die Spinedichte nimmt nach dem Starten der SynCAM1^{flag} Überexpression zu, während sie

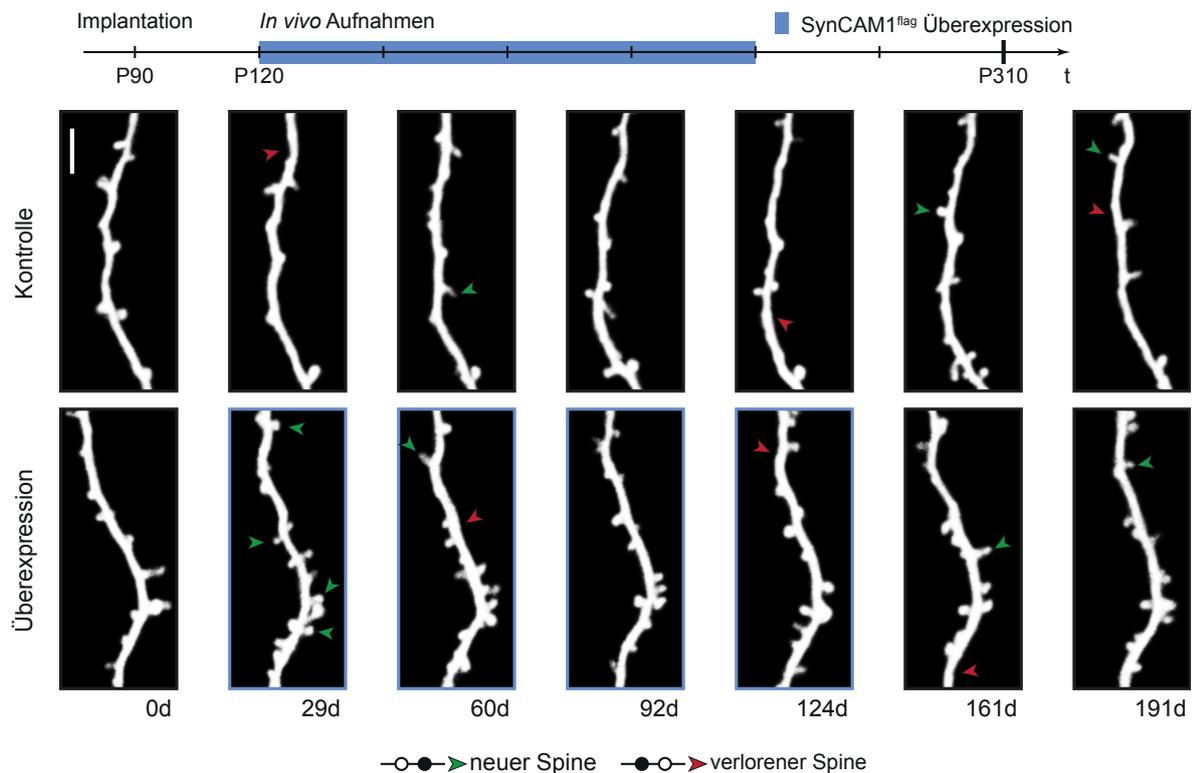


Abbildung 4.5: Induzierte Langzeitüberexpression von *SynCAM1^{flag}*. Zeitlicher Ablauf des experimentellen Protokolls (oben). Repräsentative *in vivo* Aufnahmen in einem Abstand von etwa 30 Tagen von Dendriten einer Lamina V Pyramidenzelle von einem Kontrolltier (obere Bilder) und einem *SynCAM1^{flag}* Überexpressionstier (untere Bilder). Die *SynCAM1^{flag}* Überexpression wurde nach dem ersten Aufnahmetag durch Absetzen des Doxycyclins gestartet und nach vier Monaten wieder gestoppt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm . Exemplarisch sind Spines nach verschiedenen Kriterien (unten) klassifiziert, wobei ein ausgefüllter Kreis die Anwesenheit des Spines und ein leerer Kreis seine Abwesenheit bedeutet.

bei den Kontrolltieren annähernd konstant bleibt (Abbildung 4.6A). So steigt einen Monat nach Induktion der Überexpression die Spinedichte der *SynCAM1^{flag}* Überexpressionstiere von $0,31 \pm 0,02$ Spines/ μm auf $0,42 \pm 0,03$ Spines/ μm . Bei anhaltender *SynCAM1^{flag}* Überexpression nimmt die Spinedichte weiter zu, allerdings nicht mehr so stark wie innerhalb des ersten Monats. Die Spinedichte erreichte ihren höchsten Wert mit $0,47 \pm 0,03$ Spines/ μm 4 Monate nach dem Start der Überexpression. Nach dem Abschalten der *SynCAM1^{flag}* Überexpression bleibt die Spinedichte auch nach zwei weiteren Monaten noch signifikant erhöht bei $0,44 \pm 0,03$ Spines/ μm . Die Spinedichte der Kontrollkohorte fluktuierte währenddessen um durchschnittliche $0,33 \pm 0,04$ Spines/ μm . Bei *SynCAM1^{flag}* Überexpressionstieren kommt

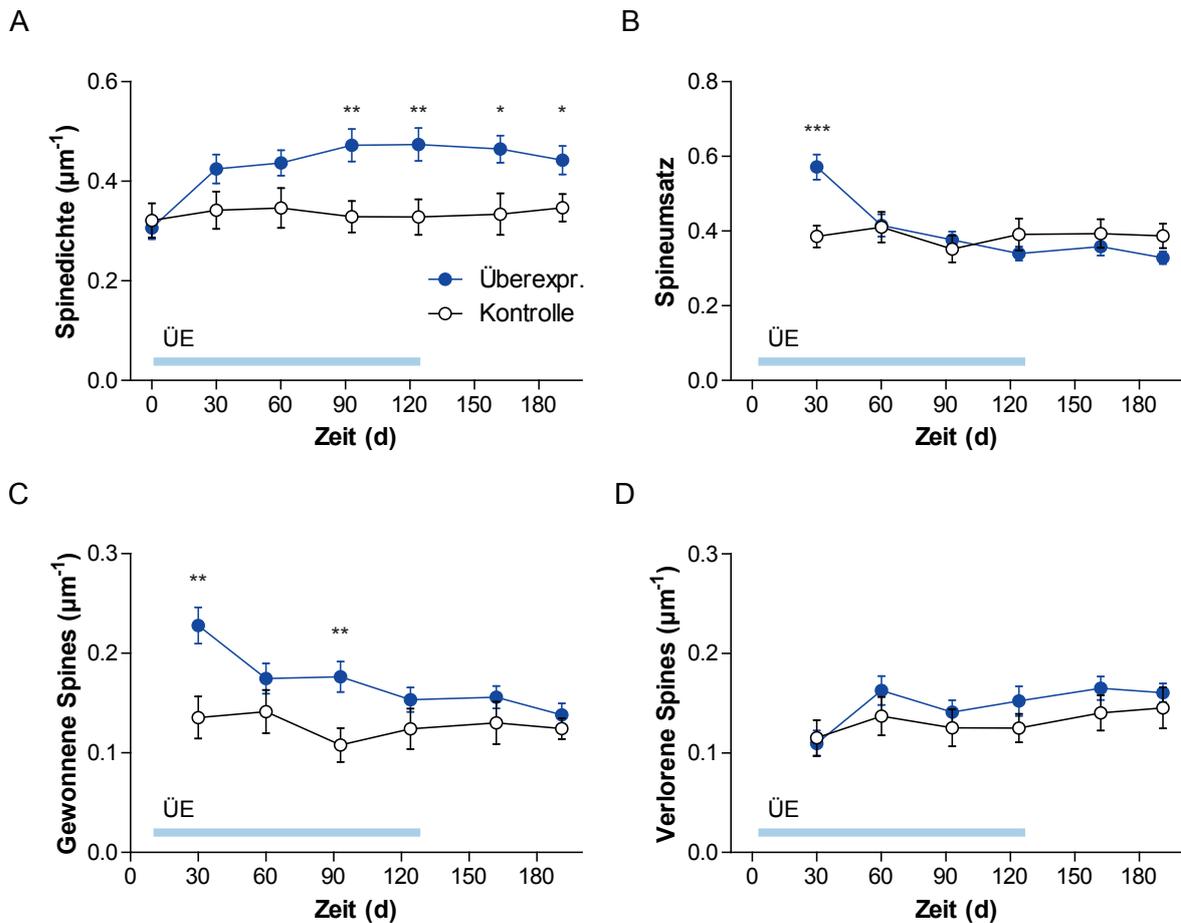


Abbildung 4.6: Die Spinedichte wird durch SynCAM1^{flag} Langzeitüberexpression anhaltend erhöht. **A)** Die Spinedichte nimmt in SynCAM1^{flag} Überexpressionstieren (blau) mit dem Start der Überexpression nach dem ersten Messtag, im Gegensatz zu den Kontrolltieren (weiß), innerhalb des ersten Monats stark zu und geht nach zwei bis drei Monaten in Sättigung und verbleibt auch nach dem Abschalten der Überexpression, vier Monate nach der Induktion, erhöht. **B)** Der Spineumsatz ist nur innerhalb des ersten Monats der Überexpression gegenüber den Kontrolltieren erhöht. **C,D)** Die Anzahl der Spines die zwischen zwei Messtagen dazukommen (**C**) oder verloren gehen (**D**). Während die Anzahl gewonnener Spines innerhalb der ersten 30 Tage am stärksten erhöht wird, ist der Verlust von Spines durch die SynCAM1^{flag} Langzeitüberexpression nicht signifikant verändert. Der hellblaue Balken markiert den Zeitraum der Überexpression. Daten zur Abbildung im Anhang; Überexpr.: n = 20, Kontrolle: n = 12; Signifikanzniveaus: *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

es also innerhalb des ersten Monats zu einer starken Zunahme der Spinedichte, die anschließend nur noch langsam ansteigt, sodass von einer Sättigung der Spinedichte 2 bis 3 Monate nach dem Start der Überexpression ausgegangen werden kann. Wird nun die Überexpression gestoppt, erfolgt nur ein schwacher Rückgang der Spinedichte, obwohl das überexprimierte SynCAM1^{flag} nach spätestens einem Monat wieder abgebaut ist (Abbildung 4.1). Die erhöhte

Spinedichte ist also nicht an das überexprimierte Protein gekoppelt, sondern kann auch ohne überexprimiertes SynCAM1^{flag} in großen Teilen aufrecht erhalten werden.

Zur Auswertung der gewonnenen Spines sollte beachtet werden, dass nur diejenigen Spines gezählt wurden, die 30 Tage nach der vorangegangenen Messung als neue Spines klassifiziert wurden. Mit Hinblick auf die anderen Versuchsteile mit kürzeren Messabständen ist es sehr wahrscheinlich, dass in der Zwischenzeit Spines gebildet wurden und diese vor der nächsten Messung wieder verloren gingen, somit also nicht in die Wertung einfließen. Die Analyse der neu gewonnenen Spines ergibt den stärksten Zuwachs neuer Spines innerhalb der ersten 30 Tage nach dem Starten der SynCAM1^{flag} Überexpression (Abbildung 4.6). So wurden in dieser Zeit $0,23 \pm 0,02$ Spines/ μm in den SynCAM1^{flag} Überexpressionstieren gebildet, in den Kontrolltieren dagegen nur $0,13 \pm 0,02$ Spines/ μm (Abbildung 4.6C). Der Zuwachs neugebildeter Spines nimmt nach der initialen Phase der ersten 30 Tage wieder ab und bleibt in den SynCAM1^{flag} Überexpressionstieren nur leicht erhöht im Vergleich zur Kontrollkohorte. Nach dem Abschalten der Überexpression näherte sich die Anzahl der neugebildeten Spines in den SynCAM1^{flag} Überexpressoren wieder den Kontrolltieren.

Die Anzahl der verlorenen Spines war in den SynCAM1^{flag} Überexpressionstieren mit durchschnittlich $0,14 \pm 0,01$ Spines/ μm nicht signifikant verschieden zu denen der Kontrolltiere mit $0,13 \pm 0,02$ Spines/ μm . Der resultierende Spineumsatz ($\text{Umsatz} = (\text{Gewinn} + \text{Verlust}) / (2 \cdot \text{Anzahl})$) unterscheidet sich vor allem in den ersten 30 Tagen, bei dem der stark erhöhte Zuwachs an neuen Spines stattfindet (Abbildung 4.6B). In den Kontrolltieren wird über den gesamten Beobachtungszeitraum ein Umsatz von durchschnittlichen $0,38 \pm 0,04$ beobachtet. Die SynCAM1^{flag} Überexpressionstiere dagegen haben einen Spineumsatz von $0,57 \pm 0,03$ am ersten Zeitpunkt, der im folgenden Messzeitraum auf durchschnittliche $0,36 \pm 0,02$ abfällt.

Die Überexpression von SynCAM1^{flag} führt innerhalb der ersten 30 Tage zu einer Erhöhung der Spinedichte; ausgelöst durch die erhöhte Neugewinnung von Spines. Anschließend ist die Neubildung nur noch leicht verstärkt und es stellt sich ein konstanter Umsatz ein. Wird die Überexpression wieder abgeschaltet, bleibt die, gegenüber den Kontrolltieren erhöhte,

Spinedichte erhalten.

Durch die SynCAM1^{flag} Überexpression wird eine Änderung in das neuronalen System induziert, an das es sich erst anpassen muss. Zur weiterführenden Untersuchung von SynCAM1 auf die Stabilität, Neubildung und Reifung von Spines wurde ein System verwendet, das sich in einem konstanten Level der Überexpression befand, um eventuelle Kompensationsmechanismen durch die plötzlich veränderte Proteinsituation zu vermeiden. So ist es möglich genauere Aussagen über die Stabilisierung neuer Spines und die Stabilität vorhandener Spines zu treffen.

4.3 Dauerhafte SynCAM1^{flag} Überexpression

Im folgenden Versuchsablauf wurde den SynCAM1^{flag} überexprimierenden Mäuse ausschließlich Trinkwasser ohne Doxycyclin gegeben, sodass sie seit frühester Entwicklung SynCAM1^{flag} überexprimierten. CaMKII ist Neuronen-spezifisch und die Expression nimmt nach der Geburt stark zu (Xue et al., 2002). Die SynCAM1^{flag} Überexpression unter Kontrolle des CaMKII-Promotors erfolgte somit während der neuronalen Entwicklung bis ins adulte Stadium, in dem die Spinedynamik untersucht wurde. Das gesamte neuronale Netzwerk konnte sich auf das erhöhte SynCAM1 Level einstellen und befand sich, im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchsteilen, im Gleichgewicht. Die dauerhaft SynCAM1^{flag} überexprimierenden Tiere werden mit Geschwistertieren verglichen, die nicht das Gen für die SynCAM1^{flag} Überexpression trugen, aber genauso Doxycyclin erhielten. In Abbildung 4.7 sind aufeinanderfolgende Zeitpunkte eines repräsentativen Dendriten von einem Kontrolltier im Vergleich zu einem Dendrit von einem SynCAM1^{flag} Überexpressionstier dargestellt.

Im weiteren Verlauf wird analysiert, ob sich die Eigenschaften der Spines in Tieren, die dauerhaft SynCAM1^{flag} überexprimieren im Vergleich zu Spines von Tieren mit SynCAM1 auf Wildtypniveau unterscheiden.

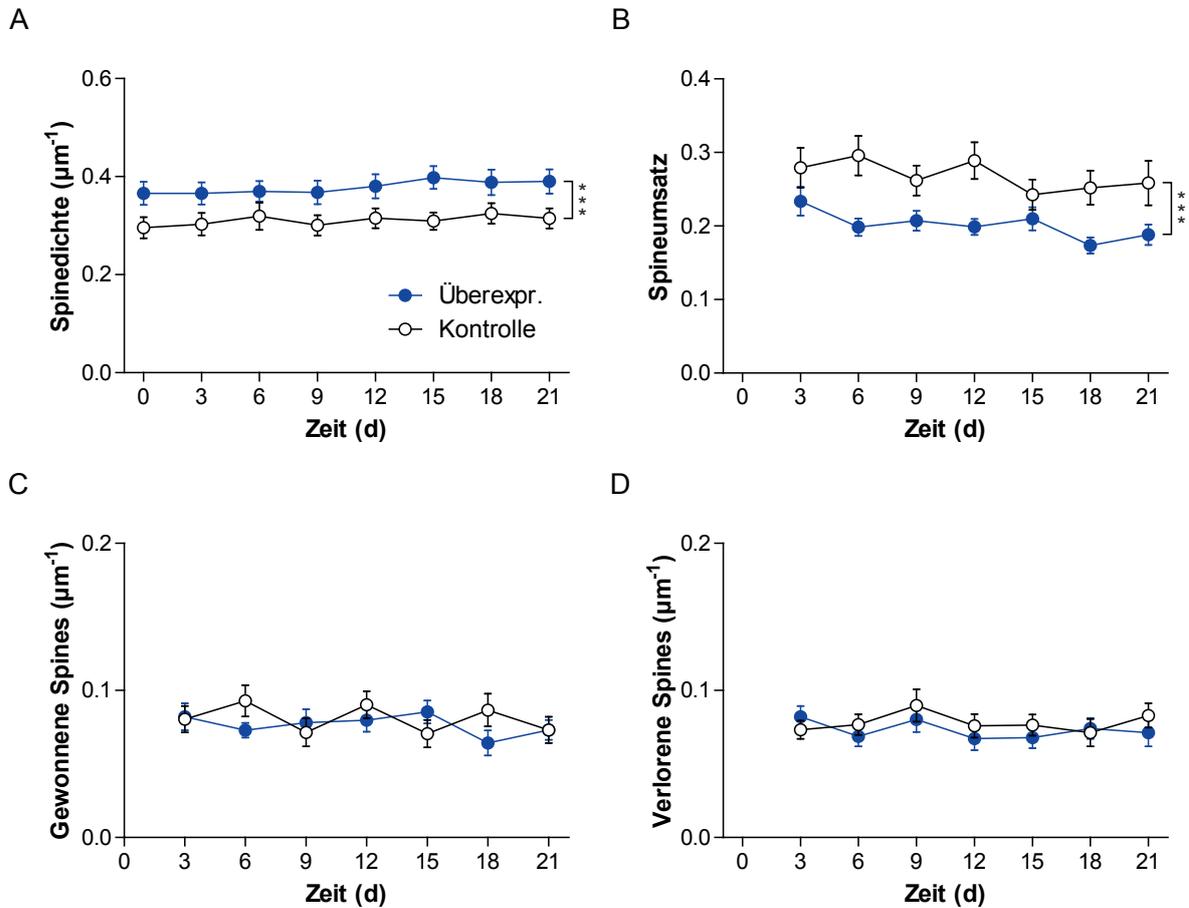


Abbildung 4.8: Dauerhafte SynCAM1^{flag} Überexpression erhöht die Spindichte und verringert den Spineumsatz. **A)** Die Spinedichte in den SynCAM1^{flag} Überexpressionstieren (blau) ist konstant erhöht gegenüber den Kontrolltieren (weiß). **B)** Der Spineumsatz der SynCAM1^{flag} Überexpressionstiere dagegen ist verringert im Vergleich zu den Kontrolltieren. **C,D)** Die Anzahl der Spines, die zwischen zwei Messtagen dazukommen (**C**) oder verloren gehen (**D**) ist unverändert in beiden Gruppen. Daten zur Abbildung im Anhang; Überexpr.: n = 27, Kontrolle: n = 21; Signifikanzniveaus: *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

eine Erhöhung der Spinedichte durch die Behandlung mit Doxycyclin beschrieben. Dieser Effekt konnte somit für Pyramidenzellen des Cortex nicht beobachtet werden.

Die Spinedichte der überexprimierenden Tiere liegt im Mittel über den Beobachtungszeitraum von 21 Tagen bei $0,38 \pm 0,02$ Spines/ μm und ist damit signifikant höher als in den Kontrolltieren (Abbildung 4.8).

Zur Überprüfung der Ursache für die Erhöhung der Spinedichte werden erneut die gewonnen und verlorenen Spines untersucht (Abbildung 4.8C,D). Weder die durchschnittlich

gewonnenen Spines noch die verlorenen Spines sind verändert im Vergleich zu den Kontrolltieren (Gewinn: Kontrolle $0,08 \pm 0,01$ Spines/ μm ; SynCAM1^{flag} Überexpression $0,08 \pm 0,01$ Spines/ μm ; Verlust: Kontrolle $0,08 \pm 0,01$ Spines/ μm ; SynCAM1^{flag} Überexpression $0,07 \pm 0,01$ Spines/ μm). Es findet also, anders als für die induzierte SynCAM1^{flag} Überexpression beobachtet, keine erhöhte Neubildung von Spines statt. Für den Verlust von Spines würde man erwarten, dass für eine größere Anzahl an Spines die Verlustrate ebenfalls erhöht ist, wenn man annimmt, dass die Spines eine vergleichbare Lebensdauer haben. Da die Verlustrate allerdings nicht erhöht ist (Abbildung 4.8D), lässt dies auf eine erhöhte Stabilität und Lebensdauer der Spines schließen.

Aus Spineverlust und Spinegewinn in Bezug zur Spinedichte folgt der Spineumsatz. Aus vergleichbarem Verlust und Gewinn aber erhöhter Anzahl an Spines folgt ein niedriger Umsatz von Spines (Abbildung 4.8B). Die Spines der Kontrolltiere haben im Mittel einen Umsatz von $0,26 \pm 0,02$ und die Überexpressionstiere einen signifikant verringerten Umsatz von $0,20 \pm 0,02$. Die Spines in den überexprimierenden Tieren sind somit weniger dynamisch und statischer im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.3.2 Dauerhafte SynCAM1^{flag} Überexpression führt zur Erhöhung der Stabilität von Spines

Aus den vorherigen Ergebnissen ergeben sich Hinweise, dass Spines von SynCAM1^{flag} Überexpressionstieren weniger dynamisch und stabiler sind als die der Kontrolltiere. Aufgrund dessen soll nun untersucht werden, ob sich das durch eine gesteigerte Überlebensrate der Spines von SynCAM1^{flag} Überexprimierern im Vergleich zu Spines der Kontrollgruppe untermauern lässt. Vom ersten Messtag wurde für jeden vorhandenen Spine verfolgt, bis zu welchem Zeitpunkt er noch beobachtet werden konnte (Abbildung 4.9A). Die Überlebensrate der Spines in den Kontrolltieren nimmt stärker ab als in den SynCAM1^{flag} überexprimierenden Tieren. So können nach 21 Tagen in den Kontrolltieren noch 38 ± 2 % der ursprünglich vorhandenen Spines beobachtet werden, während in den SynCAM1^{flag} Überexpressionstieren noch 49 ± 2 % der Spines vorhanden sind. Die Stabilität der Spines in den Überexpressionstieren

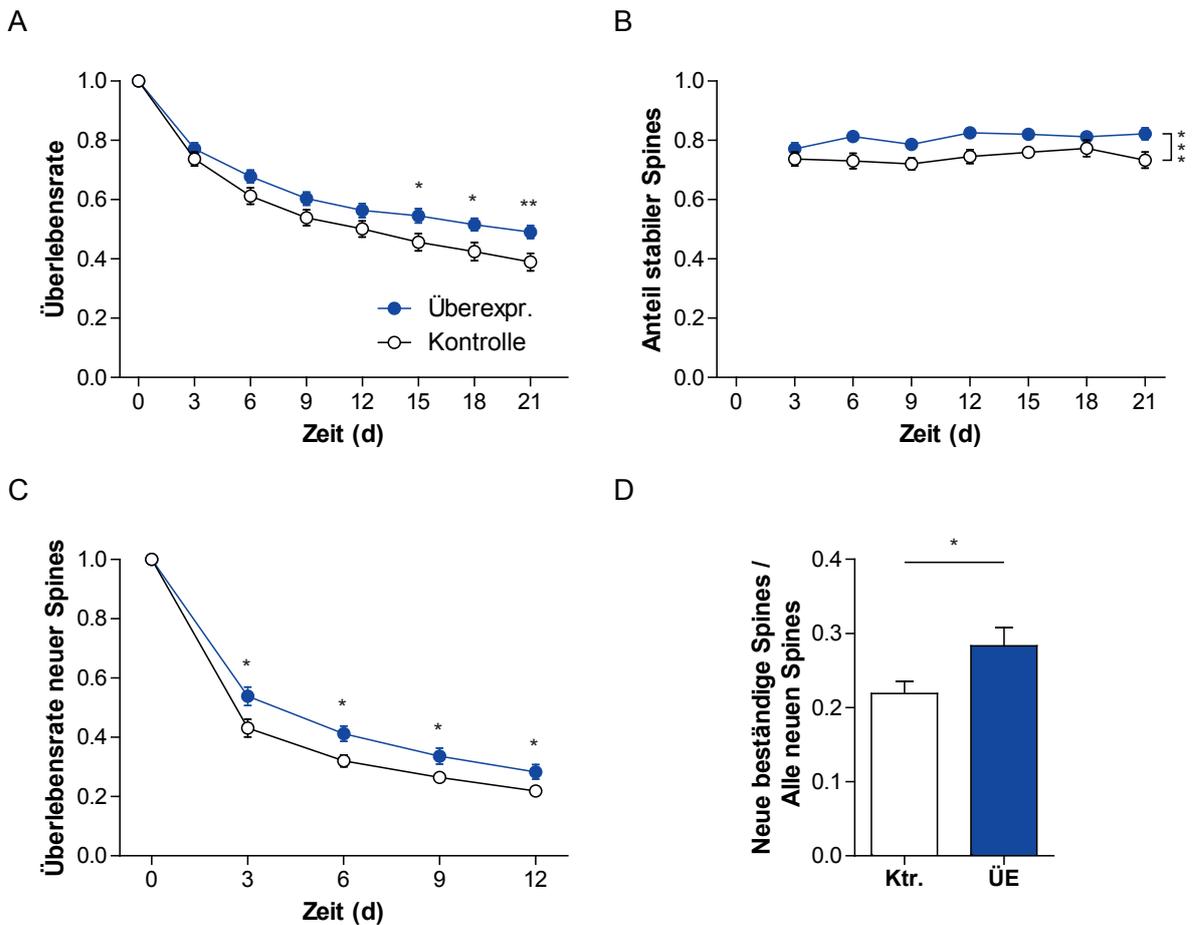


Abbildung 4.9: Die Stabilität von Spines wird durch SynCAM1^{flag} Überexpression erhöht. A-C) Die Überlebensrate existierender Spines (A), der Anteil stabiler Spines (B) und die Überlebensrate neuer Spines (C) von SynCAM1^{flag} Überexpressionstieren (blau) ist erhöht gegenüber Kontrolltieren (weiß). D) Der Anteil der neuen beständigen Spines ist damit in den Überexpressionstieren ebenfalls gesteigert. Daten zur Abbildung im Anhang; Überexpr.: n = 27, Kontrolle: n = 21; Signifikanzniveaus: *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

ist damit signifikant erhöht. Dies wird auch deutlich bei Betrachtung der Spines, die zwischen zwei Aufnahmetagen stabil bleiben. So ist der Anteil stabiler Spines der SynCAM1^{flag} Überexpressionstiere gemittelt über den Messzeitraum mit $80 \pm 2\%$ größer im Vergleich zu $74 \pm 2\%$ der Kontrolltiere (Abbildung 4.9B).

Da eine größere Stabilität bereits existierender Spines gezeigt werden konnte, ergibt sich die Frage, ob die SynCAM1^{flag} Überexpression auch die Stabilisierung von neuen Spines beeinflusst. Es wurde dementsprechend die Überlebensrate für alle Spines bestimmt, die an den Tagen 3 bis 9 erstmalig beobachtet wurden. In Abbildung 4.9C ist die Überlebensrate neuge-

bildeter Spines dargestellt. Es ergibt sich auch für neue Spines eine höhere Überlebensrate in den SynCAM1^{flag} Überexpressionstieren verglichen mit der Kontrollgruppe. Als neue beständige Spines wurden diejenigen Spines gewertet, die neu gewonnen wurden und anschließend an vier weiteren Messtagen beobachtet werden konnten (Abbildung 4.9D). Der Anteil neuer beständiger Spines im Verhältnis zu allen neuen Spines liegt bei den Kontrolltieren bei $22 \pm 2 \%$ und bei SynCAM1^{flag} Überexprimierern um fast 30 % erhöht bei $28 \pm 2 \%$.

Somit kann eine erhöhte Stabilität bereits existierender Spines sowie eine verstärkte Stabilisation neuer Spines durch SynCAM1^{flag} Überexpression nachgewiesen werden.

4.3.3 Verlängerte Lebensdauer und fortgeschrittener Reifestatus von Spines bei dauerhafter SynCAM1^{flag} Überexpression

Der vollständige Mechanismus der Spineentwicklung mit einhergehender Synapsenbildung ist ungeklärt (Nimchinsky et al., 2002; Cane et al., 2014; Yoshihara et al., 2009). Jedoch werden Filopodia von vielen Arbeitsgruppen als unreife Vorstufe für Spines klassifiziert (Yuste und Bonhoeffer, 2004; Ziv und Smith, 1996; Fiala et al., 1998). Zur Untersuchung der Entwicklung von Spines wurde der Anteil der Filopodia-ähnlichen Spines quantifiziert, der Auskunft über den Reifestatus der Spines geben soll. In den Kontrolltieren wurde ein Anteil von $13,1 \pm 1,4 \%$ Filopodia-ähnlicher Spines von Pyramidenzellen des Neocortex gezählt. Der Anteil in den Überexpressionstieren ist mit $6,8 \pm 0,8 \%$ signifikant niedriger. Durch die SynCAM1^{flag} Überexpression ist der Reifestatus der Spines weiter fortgeschritten. Es scheint als würden sich Filopodia-ähnliche Spines einfacher zu reifen Spines weiterentwickeln, wodurch der Anteil Filopodia-ähnlicher Spines verkleinert wird. Das Ergebnis wird weiterhin durch die erhöhte Stabilität der neuen Spines bestätigt (Abbildung 4.9C), sodass neugebildete Spines eine erhöhte Chance haben stabilisiert zu werden und sich weiterzuentwickeln.

Ferner wurde die Lebensdauer von Spines untersucht. Dazu wurden alle Spines entsprechend ihres Beobachtungszeitraums klassifiziert (Abbildung 4.10B). Als flüchtige Spines wurden Spines definiert, die nur an einem einzigen Zeitpunkt beobachtet werden konnten (Abbildung 4.10B, 1 Messtag) und als beständige Spines, diejenigen Spines, die über den gesamten

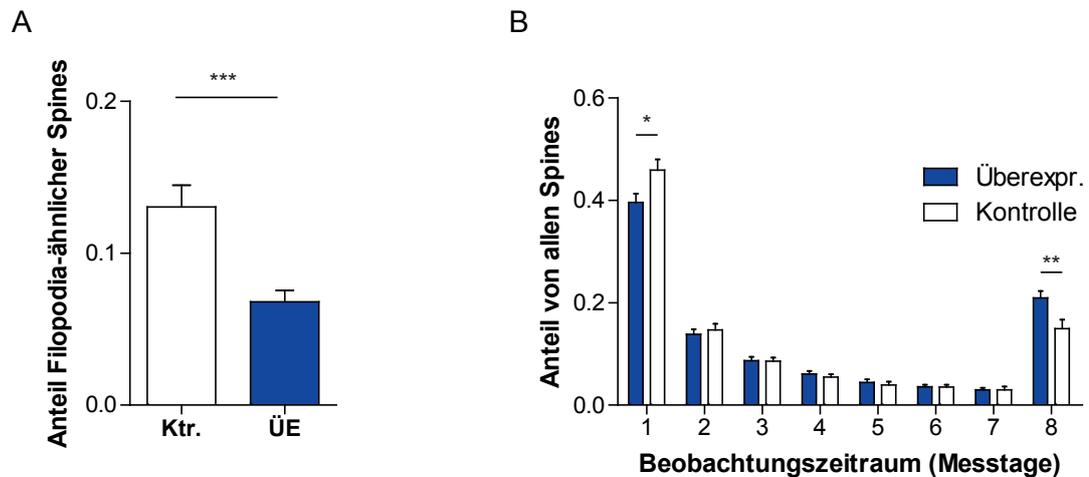


Abbildung 4.10: Veränderte Entwicklung und Verlängerung der Lebensdauer von Spines durch SynCAM1^{flag} Überexpression. A) Die Anzahl der Filopodia-ähnlicher Spines ist in Überexpressionstieren (blau) gegenüber den Kontrolltieren (weiß) erhöht. **B)** Verteilung der beobachteten Spines auf die Anzahl der Messtage an denen sie beobachtet wurden. Daten zur Abbildung im Anhang; Überexpr.: n = 19(A) bzw. 27 (B), Kontrolle: n = 17(A) bzw. 21 (B); Signifikanzniveaus: *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

Messzeitraum präsent waren (Abbildung 4.10B, 8 Messtage). Die Spines der SynCAM1^{flag} überexprimierenden Tiere haben gegenüber den Kontrolltieren signifikant weniger flüchtige Spines, die nur an einem Messtag beobachtet wurden und gleichzeitig signifikant mehr beständige Spines, die an allen Messtagen beobachtet wurden. Die Lebensdauer der Spines wird also durch die SynCAM1^{flag} Überexpression erhöht.

Zusammenfassend konnte in diesem Versuchsteil gezeigt werden, dass die SynCAM1^{flag} Überexpression zu stabileren Spines führt. Dabei wird die Überlebensrate von bereits existierenden, genauso wie die von neugebildeten Spines erhöht. Es kann also ein Effekt von SynCAM1 auf die Neubildung und auf die Beständigkeit von Spines beobachtet werden. Weiterhin ist die Reifung von Spines durch die SynCAM1^{flag} Überexpression fortgeschritten, sodass SynCAM1 eine wichtige Rolle in der Spineentwicklung zugeschrieben werden kann. Die SynCAM1^{flag} Überexpression führt zu einem erhöhten SynCAM1 Level, wodurch seine Wirkung verstärkt wird, um Rückschlüsse auf die Funktion von endogenem SynCAM1 ziehen zu können.

Im Weiteren wurde mit dem SynCAM1 Knockout gearbeitet, anhand dessen untersucht

wurde, welche Eigenschaften von Spines durch die Abwesenheit von SynCAM1 verändert werden.

4.4 Der SynCAM1 Knockout

Die Mäuse, die für diesen Versuchsteil verwendet wurden, exprimierten kein SynCAM1. Ziel war es zu untersuchen, inwiefern das Fehlen von SynCAM1 Eigenschaften von Spines verändert. Durch die Überexpression von SynCAM1^{flag} wurde bereits eine erhöhte Stabilisation und Lebensdauer von Spines beobachtet. Anhand der Knockout-Tiere, die abermals mit der GFP-M Linie gekreuzt wurden, konnte nun untersucht werden, ob das Fehlen von endogenem SynCAM1 einen entgegengesetzten Effekt auf die Neubildung von Spines, deren Reifung und die generelle Stabilität von Spines hat. Dazu wurden dendritische Abschnitte von adulten Tieren über einen Zeitraum von 21 Tagen aufgenommen und anschließend die Dynamik der Spines ausgewertet. Als Kontrollen wurden homozygote Geschwistertiere mit dem unveränderten SynCAM1-Gen verwendet.

In Abbildung 4.11 ist je ein repräsentativer Dendrit von einem Kontrolltier und einem Knockout-Tier für aufeinander folgende Zeitpunkte gegenübergestellt. Auch bei diesem Versuchsaufbau sollte berücksichtigt werden, dass die neuronale Entwicklung der Knockout-Tiere ohne SynCAM1 stattfand. So wurde zum Zeitpunkt der Messung angenommen, dass sich das neuronale Netzwerk im Gleichgewicht befand.

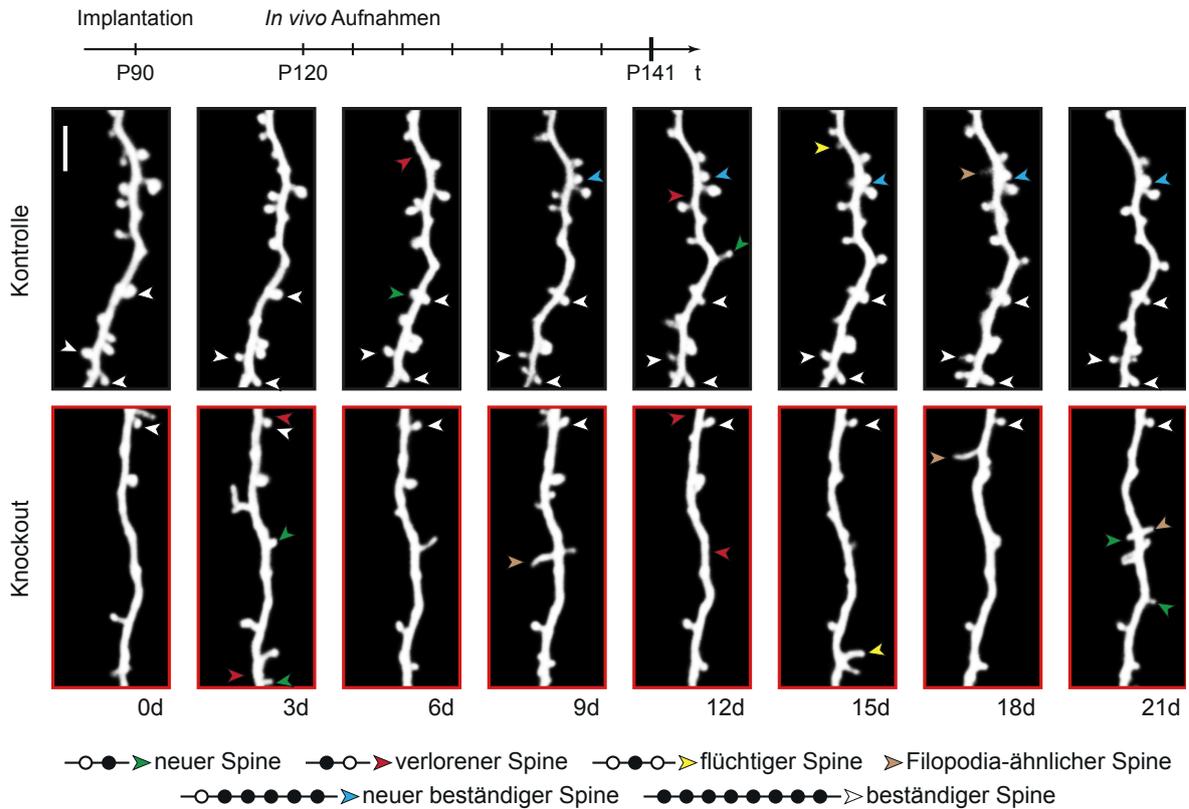


Abbildung 4.11: Der SynCAM1 Knockout. Zeitlicher Ablauf des experimentellen Protokolls (oben). Repräsentative *in vivo* Aufnahmen an acht Zeitpunkten von Dendriten einer Lamina V Pyramidenzelle von einem Kontrolltier (obere Bilder) und einem SynCAM1 Knockout (untere Bilder). Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm . Exemplarisch sind Spines nach verschiedenen Kriterien (unten) klassifiziert, wobei ein ausgefüllter Kreis die Anwesenheit des Spines und ein leerer Kreis seine Abwesenheit bedeutet.

4.4.1 Die Abwesenheit von SynCAM1 führt zu einem erhöhten Spineumsatz

Die Spinedichte der Kontrolltiere lag über den Beobachtungszeitraum von 21 Tagen im Mittel bei $0,48 \pm 0,03$ Spines/ μm und ist damit signifikant höher als die Spinedichte der SynCAM1 Knockout-Tiere von $0,40 \pm 0,03$ Spines/ μm (Abbildung 4.12A). Zu bemerken ist, dass die Spinedichte der Knockout Kontrolltiere deutlich über der Spinedichte der Kontrolltiere für die SynCAM1^{flag} Überexpression liegt (Kontrolle KO: $0,48 \pm 0,03$ zu Kontrolle ÜE: $0,31 \pm 0,02$ Spines/ μm). Dieser Unterschied in der Spinedichte wurde für die hier verwendeten Mauslinien in Pyramidenzellen des Hippocampus bereits veröffentlicht (Robbins et al., 2010). Das untermauert die Bedeutung der Verwendung von Geschwistertieren als Kontroll-

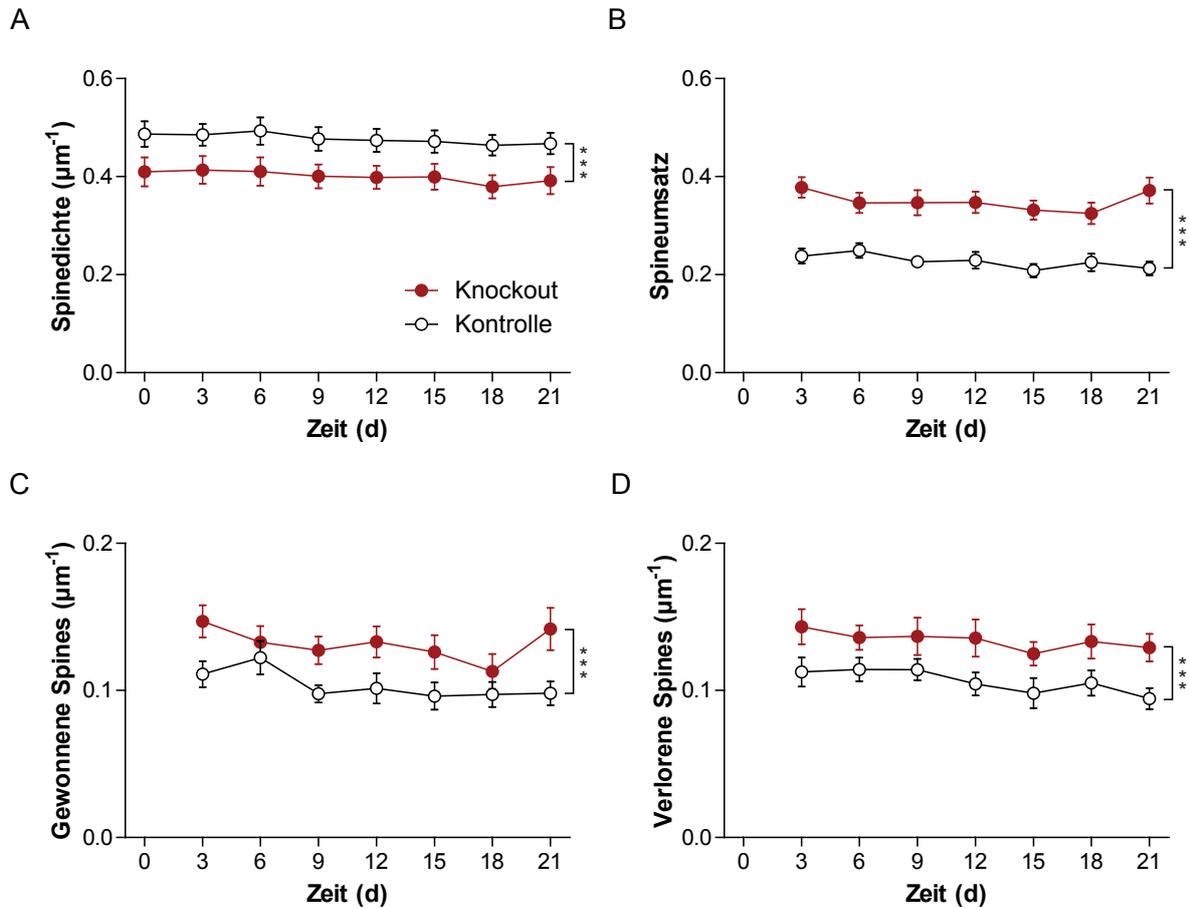


Abbildung 4.12: Verringerte Spinedichte und erhöhter Spineumsatz in SynCAM1 Knockout-Tieren. **A)** Die Spinedichte von den SynCAM1 Knockout-Tieren (rot) ist konstant verringert im Vergleich zu den Kontrolltieren (weiß). **B)** Der Spineumsatz in den Knockout-Tieren ist dagegen erhöht gegenüber den Kontrolltieren. **C,D)** Die Anzahl der Spines, die zwischen zwei Messungen dazukommen (**C**) oder verloren gehen (**D**), ist gesteigert in den Knockout-Tieren. Daten zur Abbildung im Anhang; Knockout.: $n = 29$, Kontrolle: $n = 33$; Signifikanzniveaus: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

gruppe, um etwaige genetische und eventuell auch phänotypische Unterschiede abseits der zu untersuchenden Parameter zu minimieren.

Um die Ursache für die erniedrigte Spinedichte der SynCAM1 Knockout-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe zu ergründen, wurden die gewonnenen und verlorenen Spines untersucht (Abbildung 4.12C,D). Die gewonnenen Spines in der Kontrollkohorte betragen im Mittel $0,10 \pm 0,01$ Spines/ μm und sind damit niedriger als in den Knockout-Tieren, in denen durchschnittlich $0,13 \pm 0,01$ Spines/ μm neu hinzukamen (Abbildung 4.12C). Erstaunlich an

diesem Ergebnis ist die Tatsache, dass offenbar mehr neue Spines in den Knockout-Tieren generiert wurden, obwohl die Spinedichte im Vergleich zur Kontrollgruppe niedriger ist. Das deutet darauf hin, dass durch den SynCAM1 Mangel die Stabilität und Überlebensrate von neugebildeten Spines beeinträchtigt wird.

Aufgrund dessen wurde der Verlust von Spines zwischen zwei Messtagen betrachtet. Der durchschnittliche Verlust von Spines in den Kontrolltieren ist mit $0,11 \pm 0,01$ Spines/ μm signifikant niedriger als in den SynCAM1 Knockout-Tieren mit $0,13 \pm 0,01$ Spines/ μm (Abbildung 4.12D). Die erhöhte Verlustrate von Spines deutet wiederum auf eine geringere Stabilität durch das fehlende SynCAM1 hin. Der Spineumsatz ist, aufgrund der verstärkten Rate mit der neue Spines gewonnen werden sowie vorhandene verloren gehen, deutlich erhöht (Abbildung 4.12B). Der Spineumsatz in den SynCAM1 Knockout-Tieren ist mit $0,35 \pm 0,02$ um über 50% erhöht gegenüber der Vergleichsgruppe mit $0,23 \pm 0,02$. Der beobachtete stark erhöhte Spineumsatz in den SynCAM1 Knockout-Tieren beschreibt ein dynamischeres System, das durch die Abwesenheit von SynCAM1 deutlich an Statik verloren hat.

4.4.2 Verringerte Stabilität von Spines in SynCAM1 Knockout-Tieren

Im Folgenden soll geklärt werden, ob die Spines in den Knockout-Tieren eine verminderte Überlebensrate und Stabilität haben. In Abbildung 4.13A ist dazu die Überlebensrate von dendritischen Spines in SynCAM1 Knockout-Tieren im Vergleich zu den zugehörigen Kontrolltieren dargestellt. Von den Spines der Kontrollgruppe überleben $47 \pm 2\%$ der Spines die 21 Tage des Messzeitraumes. In den SynCAM1 Knockout-Tieren sind dagegen nur noch $30 \pm 2\%$ der Spines über den gesamten Zeitraum beobachtet worden. Das Fehlen von SynCAM1 führt somit zu einer deutlichen Reduktion der Stabilität bereits existierender Spines. Das kann auch am Anteil der stabilen Spines beobachtet werden. So ist der Anteil stabiler Spines mit $65 \pm 2\%$ deutlich niedriger in den SynCAM1 Knockout-Tieren als in der Kontrollgruppe mit $77 \pm 2\%$ (Abbildung 4.13B). Weiterhin wurde die Überlebensrate neugebildeter Spines untersucht. Die Überlebensrate neugebildeter Spines von SynCAM1 Knockout-Tieren ist deutlich niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 4.13C,D). So sind die neugebildeten

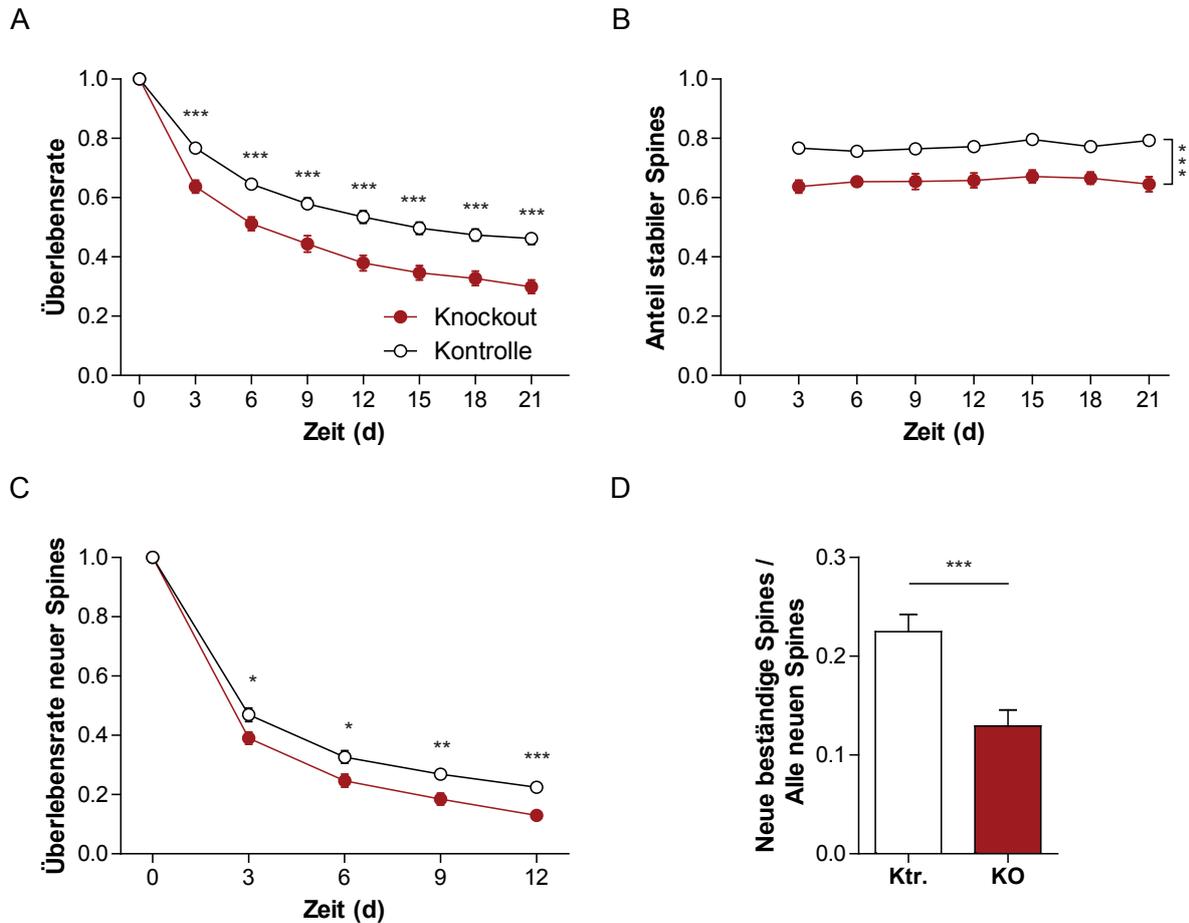


Abbildung 4.13: Die Stabilität von Spines wird durch die Abwesenheit von SynCAM1 stark verringert. A-C) Die Überlebensrate existierender Spines (A), der Anteil stabiler Spines (B) und die Überlebensrate neuer Spines (C) von SynCAM1 Knockout-Mäusen (rot) ist reduziert gegenüber den Kontrolltieren (weiß). **D)** Der Anteil der neuen beständigen Spines ist in den Knockout-Tieren damit ebenfalls vermindert. Daten zur Abbildung im Anhang; Knockout.: n = 29, Kontrolle: n = 33; Signifikanzniveaus: *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

Spines der SynCAM1 Knockout-Mäuse signifikant weniger beständig. Die Anzahl der neuen beständigen Spines, die 12 weitere Tage nach ihrem ersten Auftreten beobachtet werden konnten, der Knockout-Gruppe sind mit $13 \pm 2\%$ zu $22 \pm 2\%$ gegenüber den Kontrollgruppe um über 40% reduziert. Das zeigt, dass eine Stabilisierung neuer Spines ohne SynCAM1 deutlich erschwert wird. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den entsprechenden Ergebnissen der SynCAM1^{flag} Überexpression (Abbildung 4.9), so zeigt sich ein entgegengesetzter Effekt. Durch SynCAM1^{flag} Überexpression wird die Stabilität und gleichermaßen die Stabilisierung neuer Spines erhöht (Abschnitt 4.3), wogegen die Tiere ohne SynCAM1 deutliche Einbußen

in der Spinestabilität und Stabilisierung neuer Spines aufweisen. Zusammengefasst lässt sich daraus schließen, dass SynCAM1 für das Fortbestehen vorhandener Spines mitverantwortlich ist und neue Spines nach ihrer Bildung durch SynCAM1 gefestigt werden.

4.4.3 Verringerter Reifestatus und reduzierte Lebensdauer von Spines in SynCAM1

Knockout-Tieren

Weiter stellte sich die Frage, ob die Reifung von Spines ohne SynCAM1 erschwert wird. Dazu wurde die Anzahl der Filopodia-ähnlichen Spines betrachtet. Ein höher Anteil Filopodia-ähnlicher Spines belegt einen rückständigen Reifestatus der Spines. Der Anteil Filopodia-ähnlicher Spines ist in Mäusen ohne SynCAM1 gegenüber Tieren mit normaler SynCAM1 Expression erheblich erhöht (Abbildung 4.14A). So ist der Anteil der Filopodia-ähnlichen Spines in den Kontrolltieren bei $7,7 \pm 0,7\%$ und der Anteil in den SynCAM1 Knockout-Mäusen ist mit $18,0 \pm 1,3\%$ mehr als doppelt so hoch. Fehlt SynCAM1 ist die Reifung und Entwicklung von Spines offenbar deutlich beeinträchtigt. Die Lebensdauer der Spines, ermittelt durch die Anzahl der Messtage an denen die einzelnen Spines beobachtet wurden, ist von SynCAM1 Knockout-Mäusen ebenfalls deutlich verringert (Abbildung 4.14B). Der Anteil der flüchtigen Spines, die nur an einem Messtag beobachtet wurden, ist mit $57 \pm 2\%$ der SynCAM1 Knockouts gegenüber $42 \pm 1\%$ der Kontrolltiere deutlich erhöht (Abbildung 4.14B, 1 Messtag). Damit einhergehend ist der Anteil beständiger Spines, die an allen Messtagen beobachtet wurden mit $10 \pm 1\%$ der SynCAM1 Knockout-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $21 \pm 1\%$ stark verringert (Abbildung 4.14B, 8 Messtage). Die Lebensdauer der Spines wird durch den Mangel an SynCAM1 in den Knockout-Tieren also maßgeblich verringert.

Anhand der Untersuchung der Eigenschaften der Spines von Knockout-Tieren konnte gezeigt werden, dass die Stabilität und Lebensdauer von Spines ohne SynCAM1 erheblich beeinträchtigt ist. Weiterhin werden von SynCAM1 Knockouts zwar mehr neue Spines gebildet, diese haben aber eine erschwerte Entwicklung und eine geringere Chance dauerhaft integriert zu werden.

Insgesamt betrachtet zeigt sich das neuronale Netzwerk ohne SynCAM1 dynamischer und

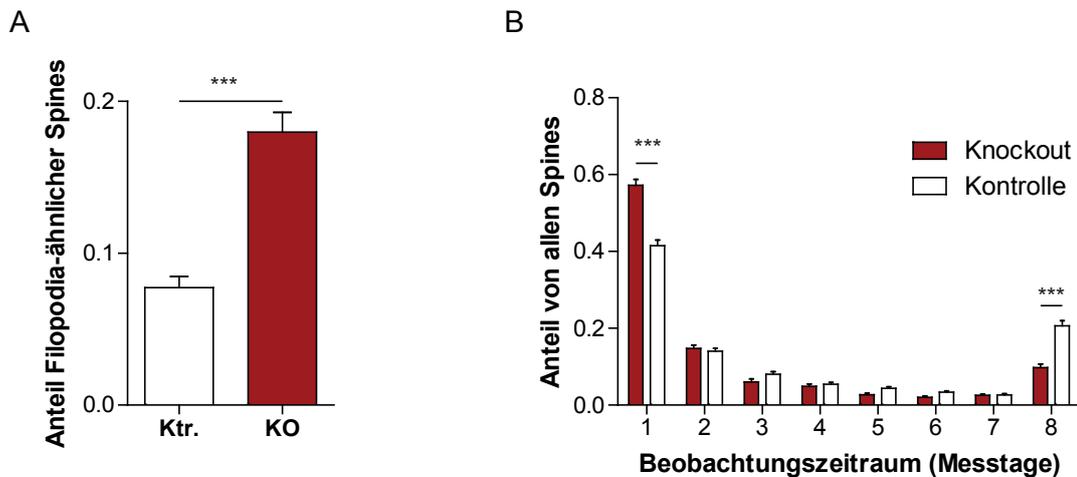


Abbildung 4.14: Einfluss auf die Entwicklung und Verkürzung der Lebensdauer von Spines durch SynCAM1 Knockout. **A)** Die Anzahl der Filopodia-ähnlichen Spines ist in SynCAM1 Knockout-Tieren (rot) gegenüber den Kontrolltieren (weiß) stark vermindert. **B)** Verteilung der beobachteten Spines auf die Anzahl der Messtage an denen sie beobachtet wurden. Daten zur Abbildung im Anhang; Knockout.: n = 26 bzw. 29 (B), Kontrolle: n = 30 bzw. 33(B); Signifikanzniveaus: *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

weniger beständig. Die Experimente zeigten für die Überexpression von SynCAM1^{flag} und den Knockout von SynCAM1 komplementäre Ergebnisse in Bezug auf die Stabilisierung und Beständigkeit von Spines, sodass daraus Schlüsse über die Wirkungsweise von SynCAM1 im Lebenszyklus eines Spines geschlossen werden können. So ist SynCAM1 involviert in die Entwicklung und Stabilisierung von neuen Spines und beeinflusst die Stabilität vorhandener Spines. Auf die initiale Neubildung von Spines wurde kein eindeutiger Einfluss von SynCAM1 beobachtet.

5 Diskussion

Die Konnektivität von Neuronen sowie die Entwicklung neuer synaptischer Verbindungen ist wesentlich für die Funktion des Gehirns. Die Bildung von neuen Synapsen und deren Bestehen wird unterdessen mit Lernen und dem Gedächtnis assoziiert und ist von großem Interesse neurowissenschaftlicher Forschung (Lichtman und Colman, 2000; Rakic et al., 1994; Chen und Tonegawa, 1997). Dabei sind über 90 % der exzitatorischen Synapsen im Zentralnervensystem in Spines organisiert (Harris und Kater, 1994).

Die vorliegende Studie beschäftigte sich mit der Entstehung und Stabilität von dendritischen Spines im lebenden Gehirn und soll damit zum Verständnis der Bildung und Entwicklung von Synapsen beitragen. Dazu wurden genetisch veränderte Mäuse verwendet, die das Zelladhäsionsprotein SynCAM1^{flag} entweder konditionell überexprimierten oder SynCAM1 Knockout-Mäuse, die kein SynCAM1 exprimierten. Die Bildung, Stabilisierung und der Erhalt von Spines wurde mit Hilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie beobachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von SynCAM1^{flag} die Stabilisierung und den Reifegrad von neuen Spines erhöht und die Lebensdauer existierender Spines verlängert, was zu einer Erhöhung der Spinedichte führt. Wird die SynCAM1^{flag} Überexpression wieder abgeschaltet, so verbleibt die Spinedichte erhöht. Für die SynCAM1 Knockout-Tiere wurden dazu komplementäre Beobachtungen gemacht. So haben Spines ohne SynCAM1 eine veränderte Reifung und sind instabiler, sodass daraus eine verminderte Spinedichte folgt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse einen Einfluss von SynCAM1 auf die Entwicklung und Stabilität von Spines. Die Überlebensrate neuer Spines wird dabei durch SynCAM1 begünstigt. Weiterhin wird die Stabilität von Spines durch SynCAM1 maßgeblich erhöht.

5.1 Die Funktion von SynCAM1 in der Entwicklung und Stabilität dendritischer Spines

Der Mechanismus der Bildung von Synapsen und Spines ist bis heute nicht eindeutig verstanden. In dieser Studie konnte ein direkter Zusammenhang von SynCAM1 auf die Entwicklung und Stabilität von Spines gezeigt werden (Abbildung 5.1). Die Überexpression von

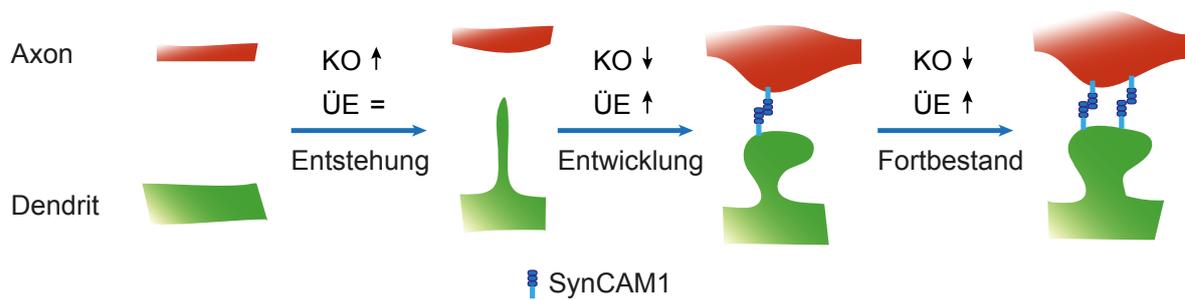


Abbildung 5.1: Modell zur Entstehung von Spines und der Einfluss von SynCAM1. Es kommt zur Entstehung eines postsynaptischen Fortsatzes. Die adhäsive Verbindung der synaptischen Partner unter anderem durch SynCAM1 führen zur Entwicklung zum reifen Spine. Die Lebensdauer des Spines wird durch SynCAM1 mitbestimmt. Der Einfluss des SynCAM1 Knockouts (KO) und der SynCAM1^{flag} Überexpression (ÜE) ist für die einzelnen Entwicklungsstufen zusammengefasst dargestellt.

SynCAM1^{flag} erhöht die Spinedichte (Abbildung 4.8A) und im Gegenzug reduziert der SynCAM1 Knockout die Spinedichte (Abbildung 4.12A). Dabei können im wesentlichen drei Faktoren zur Veränderung der Spinedichte führen. Erstens können mehr bzw. weniger neue Vorläuferspines gebildet werden. Zweitens können diese Vorläuferspines sich leichter oder schwerer zu reifen Spines weiterentwickeln. Drittens kann die Stabilität und Lebensdauer von Spines verändert werden. SynCAM1 beeinflusst dabei vor allem die Entwicklung und Stabilität der Spines. Im Folgenden soll die Wirkung von SynCAM1 anhand des Lebenszyklus eines Spines erläutert werden.

Die Entstehung neuer Spines: Die Entstehung eines Spines muss durch spezifische Faktoren initiiert werden, die an einer Stelle des Dendriten bzw. Axons die spätere Bildung eines Spines bzw. einer Synapse festlegen. Die Anzahl dieser Vorläuferspines könnte dabei durch SynCAM1 bestimmt werden.

Der Einfluss von SynCAM1 auf die Anzahl der neugebildeten Vorläuferspines kann allerdings zurückgewiesen werden, da dauerhaft SynCAM1^{flag} überexprimierende Tiere keine erhöhte Neubildung von Spines zeigen (Abbildung 4.8) und die SynCAM1 Knockout-Tiere, trotz SynCAM1 Mangel, sogar eine verstärkte Neubildung von Spines aufweisen (Abbildung 4.12). Die erhöhte Neubildung von Spines der Knockout-Tiere könnte auf einen kompensatorischen Effekt als Folge der geringen Synapsenanzahl zurückzuführen sein. So könnte die geringe

Stabilität und Anzahl der Synapsen die Zelle zur Neubildung von Spines veranlassen, die wiederum durch den Mangel an SynCAM1 nur schwer stabilisiert werden. Die Anzahl der neugebildeten Vorläuferspines wird durch SynCAM1 somit scheinbar nicht direkt beeinflusst. Die erhöhte Rate neugebildeter Spines bei der induzierten SynCAM1^{flag} Überexpression (Abbildung 4.3C) kann mit dem Einfluss von SynCAM1 auf die Spineentwicklung erklärt werden, sodass sich Vorläuferspines leichter weiterentwickeln und infolge als neugewonnene Spines detektiert werden. Es kann nicht zwischen einem neuen Vorläuferspines und einem Vorläuferspines der stabilisiert wurde unterschieden werden.

Die Stabilisation und Entwicklung neugebildeter Spines: Durch Zelladhäsionsproteine wie SynCAM1 kann eine Verbindung zwischen Prä- und Postsynapse hergestellt werden, die die Entwicklung der Synapse und das Ausbilden des Spines ermöglicht (Dalva et al., 2007). Die Wahrscheinlichkeit mit der ein neugebildeter Spine überlebt und reift ist dabei durch SynCAM1 maßgeblich beeinflusst. So wird die Überlebensrate neuer Spines durch SynCAM1^{flag} Überexpression erhöht (Abbildung 4.9) und im Knockout stark verringert (Abbildung 4.13). SynCAM1 stabilisiert neue Spines und erhöht ihre Überlebenschance. Dabei könnte SynCAM1 als adhäsives Protein die Verbindung zwischen Prä- und Postsynapse verstärken.

Wurde eine Verbindung zwischen prä- und postsynaptischer Membran hergestellt, reift und entwickelt sich der Spine bis er die typische *Mushroom* Form, der meisten beständigen Spines, ausbildet. SynCAM1 ist dabei ebenfalls in die Entwicklung der Spines involviert. SynCAM1 Knockout-Tiere haben einen stark erhöhten und SynCAM1^{flag} Überexpressionstiere eine verringerten Anteil an Filopodia-ähnlichen Spines gegenüber Kontrolltieren (Abbildung 4.14, Abbildung 4.14). Zwar ist nicht eindeutig belegt, dass jeder reife Spine zwingend aus einem Filopodium hervorgeht, es wird jedoch allgemein anerkannt, dass Filopodia eine dynamische, unreife Vorstufe zu Spines darstellen (Fiala et al., 1998; Zuo et al., 2005a; Ziv und Smith, 1996; Dailey und Smith, 1996). Die Filopodia-ähnlichen Spines verbleiben ohne SynCAM1 scheinbar in ihrem unreifen Stadium und können sich nur eingeschränkt weiterentwickeln oder ziehen sich wieder zurück. Die Reifung der Spines ist ohne die fixierende Verbindung

der prä- und postsynaptischen Membran durch SynCAM1 nur eingeschränkt möglich. Die Wahrscheinlichkeit mit der ein Filopodium sich zum reifen Spine weiterentwickelt wird somit durch SynCAM1 beeinflusst.

Während der Spineentwicklung kommt es zur Ausbildung der eigentlichen Synapse. Dabei könnte SynCAM1 stabilisierend beim strukturellen Ausbilden der aktiven Zone und der postsynaptischen Dichte wirken. SynCAM1 hat eine zytosolische PDZ-Bindestelle (postsynaptic density-95/discs large/zona occludens-1) und eine Protein 4.1 Interaktionsschnittstelle (Biederer, 2006) über die es mit intrazellulären Proteinen wechselwirken kann. So wurde eine Interaktion von SynCAM mit synaptischen Proteinen wie CASK (Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase), Syntenin (Syndecan binding protein) oder Farp1 (FERM, Rho/ArhGEF, and Pleckstrin domain protein 1) gezeigt (Biederer et al., 2002; Cheadle und Biederer, 2012).

Über diese Interaktionen ist eine Rolle von SynCAM1 bei der Rekrutierung von Proteinen für die Signalübertragung oder das synaptische Gerüst möglich. Die Rekrutierung von Signalproteinen ist für die Entwicklung der Synapse und die synaptische Transmission entscheidend. Die Interaktion von SynCAM1 mit Farp1 könnte weiterhin bedeutend sein, da Farp1 die Aktin-Polymerisation erhöht (Cheadle und Biederer, 2012). Aktin ist in Spines sehr dynamisch und an der Spinebildung und strukturellen Plastizität beteiligt (Fischer et al., 1998). Die Aktin-Polymerisation könnte somit über Farp1 vermittelt werden und so zur Stabilität des Zytoskeletts von Spines führen. Inwiefern die gemachten Beobachtungen allein auf die adhäsive Wirkung von SynCAM1 zurückzuführen sind oder durch seine Interaktionspartner vermittelt wird, wurde in der Studie nicht untersucht, ist aber von Interesse für weitere Experimente.

Eindeutig ist, dass die transsynaptische Adhäsion durch die extrazelluläre Domäne von SynCAM vermittelt wird (Biederer et al., 2002; Sara et al., 2005; Fogel et al., 2007). Der intrazelluläre zytoplasmatische Anteil dagegen ist mitverantwortlich dafür, dass die Synapsenanzahl, gemessen über die mEPSC-Frequenz (miniature excitatory postsynaptic current), durch SynCAM1^{flag} Überexpression erhöht wird (Sara et al., 2005). Das muss aber nicht

zwangsläufig bedeuten, dass die intrazellulären Interaktionspartner von SynCAM1 diesen Effekt vermitteln. Mit verändertem zytoplasmatischen Rest könnte es ebenso dazu kommen, dass SynCAM1 nicht korrekt in die Membran integriert wird oder an der falschen Stelle bindet und damit keine synaptische Adhäsion vermitteln kann. Für die vollständige Funktion im Organismus sind die extra- als auch intrazellulären Anteile notwendig.

Die Aktivität der Synapse ist ferner mitverantwortlich für die Entwicklung und Stabilität von Spines (Maletic-Savatic, 1999; Kwon und Sabatini, 2011; Cane et al., 2014). Synapsen werden durch erhöhte Aktivität stabilisiert und haben eine erhöhte Überlebenschance (Chen und Tonegawa, 1997; Buonomano und Merzenich, 1998). Da die basale synaptische Transmission durch SynCAM1 weitgehend unbeeinflusst bleibt (Robbins et al., 2010) scheint SynCAM1 eine spezielle Rolle in der Spinestabilität einzunehmen ohne dabei die basale Aktivität zu beeinflussen.

Fortbestand und Eliminierung von Spines: Einmal entwickelte Spines haben eine Lebensdauer von Stunden oder Tagen bis hin zu Monaten oder Jahren. Diese wird durch SynCAM1 maßgeblich beeinflusst. So hatten Spines von SynCAM1^{flag} Überexpressionstieren eine erhöhte und die von SynCAM1 Knockout-Tieren eine verminderte Lebensdauer. Die adhäsiven Eigenschaften durch die extrazellulären Ig-Domänen von SynCAM1 sind dabei für den Zusammenhalt der synaptischen Membranen verantwortlich (Fogel et al., 2007) und führen somit vermutlich zu erhöhter Stabilität und damit zum Fortbestand der Spines. Wurde SynCAM1^{flag} über mehrere Monate überexprimiert, so führte das zu einer dauerhaft erhöhten Spinedichte (Abbildung 4.6). Mit dem Stopp der Überexpression ging die erhöhte Spinedichte, auch nachdem kein überexprimiertes Protein mehr nachgewiesen werden konnte, nicht auf das Kontrollniveau zurück. Der Anstieg der Spinedichte durch die SynCAM1^{flag} Überexpression ist also nicht vollständig reversibel. Die erhöhte Spinedichte nach langanhaltender SynCAM1^{flag} Überexpression ist demnach nicht direkt an das Expressionslevel von SynCAM1^{flag} gebunden, sondern wird durch andere Faktoren auf erhöhtem Niveau gehalten. So könnten Spines, die einmal im System integriert sind und funktionelle Synapsen bilden, durch andere Adhäsions-

moleküle oder endogenes SynCAM1 stabilisiert werden. Von Robbins et al. (2010) wurde eine Reversibilität für die erhöhte Anzahl an Synapsen durch die Überexpression von SynCAM1^{flag} gezeigt. Dabei wurden allerdings Hippocampus Neurone von Jungtieren verwendet und die Überexpression erfolgte nur für 14 Tage und nicht über mehrere Monate. Es könnte also eine langfristige Überexpression nötig sein, um die Spinedichte dauerhaft zu erhöhen.

Die Eliminierung von Spines dient der Reorganisation des neuronalen Netzwerkes und ist für die Entwicklung und die Gedächtnisbildung entscheidend (Hayama et al., 2013; Lichtman und Colman, 2000; Yang und Gan, 2012; van Versendaal et al., 2012). Durch den starken Einfluss auf die Stabilität von Spines konnte SynCAM1 als ein Faktor für das Fortbestehen von Spines identifiziert werden. Synaptische Plastizität wie die Langzeit-Depression (LTD) wurden als Indikatoren, die zur Eliminierung von Spines führen, beschrieben (Nagerl et al., 2004; Becker et al., 2008). Die synaptische Übertragung und die Stabilität von Spines bestimmen sich gegenseitig, so resultiert wiederholtes LTD in der Eliminierung von Spines (Hasegawa et al., 2015). SynCAM1 könnte dabei einen Faktor für die strukturelle Erhaltung der Synapse darstellen. So konnte LTD in SynCAM1^{flag} überexprimierenden Tieren nicht ausgelöst werden und war in SynCAM1 Knockout-Tieren verstärkt (Robbins et al., 2010). Das belegt, dass die Abschwächung der synaptischen Übertragung durch LTD, ebenso wie die Eliminierung des Spines, durch SynCAM1 reguliert wird. Die strukturellen Veränderungen gehen also mit der synaptischen Abschwächung einher. Dabei sei zu beachten, dass nicht eindeutig ist, ob die erhöhte Spinestabilität zur Abschwächung des LTDs führt oder *vice versa*. Die genannten Ergebnisse sprechen vielmehr für einen zusammenhängenden Mechanismus von LTD und Spinestabilität.

Zusammenfassend kann SynCAM1 eine wichtige Rolle in der Reifung und Entwicklung von Spines zugeschrieben werden. Außerdem wird die Lebensdauer und Stabilität von Spines durch SynCAM1 maßgeblich bestimmt. Die strukturellen und grundlegenden funktionellen Eigenschaften der Synapse bleiben, abgesehen von der Verkürzung der PSD-Länge (postsynaptische Dichte) im SynCAM1 Knockout, von SynCAM1 größtenteils unverändert (Robbins

et al., 2010). Damit hat SynCAM1 eine besondere Bedeutung für die Bildung und Beständigkeit von Synapsen ohne ihre Eigenschaften direkt zu beeinträchtigen.

Die Ergebnisse unterstützen weiterhin eine Spinebildung, wie sie das Filopodia-Modell beschreibt: Zum ersten tritt der stabilisierende Effekt von SynCAM1 nach der ersten Beobachtung eines Spines auf. Es wird durch SynCAM1 also die Entwicklung und Beständigkeit von Spines gesteuert und nicht die Anzahl der Spineneubildungen. Ein gewisser Anteil der postsynaptischen Fortsätze hatten bei ihrer ersten Beobachtung vermutlich noch keine präsynaptische Verbindung und die adhäsive, transsynaptische Wirkung von SynCAM1 kam noch nicht zum tragen. Das widerspricht dem Miller/Peters-Modell, nach dem der präsynaptische Terminus den Dendriten kontaktiert, bevor dieser einen Spine bildet. Zweitens wird ohne SynCAM1 der Anteil der Filopodia-ähnlichen Spines stark erhöht, was eine Interpretation nahelegt, nach der Filopodia sich ohne SynCAM1 nur erschwert weiterentwickeln und in ihrem unreifen Stadium verbleiben oder zurückziehen. Das entspricht der Beschreibung nach der Filopodia-Theorie, wonach Filopodia sich zu einen reifen Spine weiterentwickeln.

5.2 Die Rolle SynCAMs im Vergleich zu anderen Adhäsionsproteinen

Die SynCAM-Familie: Die hier vorgestellten Ergebnisse konnten den Einfluss von SynCAM1 auf die Entwicklung und die Stabilität von Spines nachweisen. Die Abwesenheit von SynCAM1 führt dabei zu einer starken Verminderung der Stabilität von Spines. SynCAM tritt sowohl an der Prä-, als auch an der Postsynapse auf. SynCAM1 bildet homophile trans-Interaktionen sowie starke heterophile Bindungen mit SynCAM2 und schwache mit SynCAM3 (Fogel et al., 2007). Die ersten beiden Ig-Domänen vermitteln dabei die heterophile Interaktion von SynCAM1 und SynCAM2 (Fogel et al., 2010, 2007). Durch den Knockout von SynCAM1 fallen die heterophilen sowie die homophilen SynCAM1 Verbindungen weg, wodurch die Stabilität der Spines geschwächt wird. Die fehlenden heterophilen Verbindungen könnten zum Teil durch homophile Verbindungen von anderen SynCAM-Proteinen ausgeglichen werden. Allerdings werden von SynCAM-Proteinen heterophile Verbindungen gegenüber homophilen bevorzugt (Fogel et al., 2007), sodass eine Schwächung in der Adhäsionswirkung

besteht. Eine veränderte Expression von anderen Adhäsionsproteinen ist als Reaktion auf das veränderte Level von SynCAM1 ebenso denkbar. Die Expression von den verbleibenden SynCAMs 2-4 und anderen Adhäsionsproteinen bleibt zumindest unverändert, wenn SynCAM1 überexprimiert wird (Robbins et al., 2010).

Der hier gezeigte alleinige Knockout von SynCAM1 beeinträchtigt die Stabilität und Entwicklung von Spines, obwohl im Vorderhirn SynCAM1 gegenüber SynCAM2 endogen schwächer exprimiert wird (Robbins et al., 2010). SynCAM1 kann somit eine Schlüsselrolle für die Spineentwicklung und Stabilität zugewiesen werden. In Co-Kulturen von nicht-neuronalen Zellen mit Neuronen wurde für SynCAM2 eine stärkere synaptogene Wirkung gegenüber SynCAM1 beobachtet (Fogel et al., 2007). Welche Rolle SynCAM2 im Vergleich zu SynCAM1 bei der Synapsenbildung übernimmt, soll in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

SynCAM1 innerhalb der Ig Superfamilie: Zelladhäsionsproteine der IgSF (Immunoglobulin superfamily) umfassen zahlreiche Proteine mit vielfältigen Funktionen. So wird beispielsweise für die neuronale Vernetzung dem Drosophila Homlog Dscam (Down syndrome cell adhesion molecule) eine besondere Rolle zugeschrieben (Chen et al., 2006; Schmucker et al., 2000). Es existieren von diesem IgSF-Protein über 38000 Splice-Varianten, wodurch eine hohe Vielfalt in der neuronalen Verschaltung ermöglicht wird (Schmucker et al., 2000). Dabei könnten die alternativen Proteinprodukte verschiedene Neuronen- oder Synapsentypen kodieren. Für SynCAM1 sind hingegen nur 5 Splice-Varianten bekannt (Biederer, 2006). Die Feinabstimmung von SynCAM1 könnte vielmehr durch post-translationale Modifikationen wie die Glykolysierung bestimmt sein. So sind die Splice-Variationen hauptsächlich in extrazellulären Region für mögliche Glykolysationsstellen (Biederer, 2006). Der zytoplasmatische Anteil hingegen ist hoch konserviert für die Isoformen und verschiedenen SynCAM-Familienmitglieder. Die spezifische Modifikation von SynCAM1 und SynCAM2 durch Glykolysation beeinflusst die adhäsiven Eigenschaften und die synaptogene Wirkung (Fogel et al., 2010, 2007). Die gezielte Modifikation könnte zu einer funktionellen Beeinflussung von Synapsen führen und damit zur synaptischen Variation beitragen. Weiterhin kommt es zur Oligomerisation von SynCAM1

durch cis-Interaktionen, wodurch die adhäsive Wirkung kontrolliert wird (Fogel et al., 2011). Die Oligomerisation wird dabei durch die Domänen Ig2 und Ig3 vermittelt. Die Oligomerisation könnte die lokalen Bindestellen von SynCAM1 für trans-Interaktionen erhöhen oder die für die trans-Interaktion wichtige Domäne Ig1 für die adhäsive Bindung positionieren (Fogel et al., 2011). Oligomerisation ist für andere Adhäsionsmoleküle wie Neurexin, Neuroligin oder γ -Protocadherin ebenfalls beschrieben (Dean et al., 2003; Levinson und El-Husseini, 2005; Schreiner und Weiner, 2010). Die laterale Anordnung von SynCAM1 und anderen synaptischen Adhäsionsmolekülen könnte zur strukturellen Organisation der Synapse beitragen und synaptische Parameter bestimmen.

Neben SynCAM gibt es noch weitere Ig-Domänen Proteine wie NCAM (neural cell adhesion molecule), Nectin oder die LAR-Familie (leukocyte-associated receptor), die an der Synapse organisiert sind. Sie alle besitzen Ig-Domänen, die die Wechselwirkung mit anderen Molekülen vermitteln. Dabei wurde NCAM mit der synaptischen Übertragung und Plastizität in Verbindung gebracht (Washbourne et al., 2004; Muller et al., 1996; Polo-Parada et al., 2004). Für das NCAM-Homolog Fascilin 2 wurde weiterhin ein Zusammenhang mit der Synapsenbildung gezeigt (Davis et al., 1997). SynCAM, das auch Nectin-ähnlich bezeichnet wird, hat mit Nectin die extrazellulären Domänen gemeinsam, aber andere intrazelluläre Interaktionspartner (Missler et al., 2012). Zusammen mit Cadherinen bilden Nectine *puncta adherentia* (Mizoguchi et al., 2002; Togashi et al., 2006), die üblicherweise die Synapse flankieren. Auch für SynCAM gibt es Hinweise auf eine perisynaptische Anordnung (unveröffentlicht von Biederer und Mitarbeitern). Diese Abriegelung der aktiven Synapse durch strukturbildende Proteine könnte die Synapse als Kompartiment im neuronalen Gewebe abgrenzen.

Die genaue Wirkungsweise der verschiedenen Ig-Proteine an der Synapse ist bis heute nur unvollständig verstanden. Die Aufklärung der Wechselwirkung zwischen einzelnen Familienmitgliedern und ihr Zusammenwirken könnte wichtige Hinweise zur Bildung und Entwicklung von Synapsen liefern. Ebenso ist interessant zu klären, ob einige der Ig-Proteine in bestimmter Zusammensetzung an einem Synapsentyp vorkommen und so eine individuelle synaptische Charakterisierung darstellen.

Neurologin-Neurexin: Zu den am meisten untersuchten synaptischen Zelladhäsionsmolekülen gehören Neurexin und Neurologin. Anders als SynCAM1 sind sie weniger an der Synapsenbildung und -stabilität beteiligt, sondern modulieren vielmehr synaptische Transmission (Sudhof, 2008). Im Gegensatz zu Experimenten mit Zellkulturen (Chih et al., 2005; Scheiffele et al., 2000) wurde selbst für den Tripleknockout des postsynaptischen Neurologins 1-3 *in vivo* weder eine Abnahme der Synapsenanzahl noch eine veränderte synaptische Ultrastruktur beobachtet (Varoqueaux et al., 2006). Das relative Verhältnis von Neurologin 1 zwischen benachbarten Zellen ist allerdings für die Regulation der Synapsenzahl bedeutend (Kwon et al., 2012). Es scheint eine konkurrierende Beziehung zwischen den Neurologinen zu bestehen. Der Triple-Knockout des präsynaptischen α -Neurexins beeinflusst die Synapsendichte ebenfalls nicht maßgeblich (Missler et al., 2003).

Der Einfluss auf die synaptischen Funktionen von Neurologin und Neurexin sind demgegenüber weitreichend (Krueger et al., 2012). So sind sie für die basale synaptische Transmission, synaptische Plastizität und Gedächtnisbildung entscheidend (Blundell et al., 2010; Kim et al., 2008; Varoqueaux et al., 2006; Missler et al., 2003).

Weiterhin wird die Synapsenentwicklung als auch die Rekrutierung der prä- und postsynaptischen Maschinerie durch Neurexin und Neurologin gesteuert (Krueger et al., 2012). Neurexin und Neurologin sind über verschiedene Bindepartnern wie CASK mit Neurexin (Hata et al., 1996) oder PSD-95 (postsynaptic density protein 95) mit Neurologin (Irie et al., 1997) an das synaptischen Gerüst gebunden. So kann durch CASK, das ebenfalls mit SynCAM wechselwirkt (Biederer et al., 2002), eine indirekte Interaktion von SynCAM und Neurexin stattfinden. Vermittelt durch Neurexin und CASK könnte es zur Akkumulation von SynCAM kommen und damit die synaptische Adhäsion verstärkt werden.

Neben der hohen Anzahl an Isoformen (Missler und Sudhof, 1998; Ichtchenko et al., 1995) gibt es auch alternative Bindepartner für Neurologin und Neurexin (Linhoff et al., 2009; Uemura et al., 2010; Xu et al., 2010; Stan et al., 2010), zum Beispiel LRRTMs (leucine rich repeat trans-membrane) für Neurexin (Linhoff et al., 2009) oder TSP1 (Thrombospondin 1) für Neurologin (Xu et al., 2010). So wurden für die vielen Variationsmöglichkeiten, ähnlich dem

Dscam, ein Art Interaktionskode für verschiedene Synapsentypen und Netzwerkverbindungen vorgeschlagen (Krueger et al., 2012).

Während SynCAM die Rolle der Stabilisierung und Strukturordnung übernimmt, dient Neuroligin-Neurexin mehr der funktionellen Modulation und Vermittlung zwischen Prä- und Postsynapse. Dies könnte auch dadurch unterstützt werden, dass Neurexin und Neuroligin, zwar nicht ausschließlich (Taniguchi et al., 2007), jedoch hauptsächlich an der Prä- bzw. Postsynapse vorkommen. Durch diese Spezialisierung könnte eine gezielte Interaktion mit den prä- bzw. postsynaptischen Proteinen stattfinden, um beispielsweise eine Steuerung der synaptischen Transmission zu ermöglichen. Für eine symmetrische strukturelle Adhäsion vermittelt durch SynCAM könnte es demgegenüber günstig sein, wenn auf beiden Seiten der Synapse der gleiche Adhäsionspartner die Verbindung eingeht. Obwohl SynCAM an inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen nachgewiesen werden konnte (Thomas et al., 2008), wurde die Verringerung der Synapsendichte durch den SynCAM1 Knockout nur an exzitatorischen Synapsen beobachtet (Robbins et al., 2010). Eine Funktion von Neurexin oder Neuroligin dagegen konnte neben exzitatorischen auch an inhibitorischen Synapsen beobachtet werden (Craig und Kang, 2007). Die Bildung von exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen ist allerdings grundlegend verschieden (Wierenga et al., 2008), sodass SynCAM 1 an inhibitorischen Synapsen eine andere Funktion im Vergleich zu exzitatorischen Synapsen innehaben könnte. Einzelne Familienmitglieder von SynCAM könnten daneben funktionell für inhibitorische oder exzitatorische Synapsen spezialisiert sein. Die hier gezeigten Effekte von SynCAM1 auf die Stabilität von Spines beziehen sich ebenfalls ausschließlich auf exzitatorische Synapsen, da inhibitorische Synapsen hauptsächlich am dendritischen Schaft auftreten und nicht in Spines organisiert sind.

Rezeptor-Tyrosinkinase: Eine weitere wichtige Gruppe von synaptischen Interaktionsproteinen sind, die zu den RTKs (receptor tyrosine kinases) gehörende, Eph Rezeptor Familie. Eph Rezeptoren werden durch membrangebundene Ephrin-Liganden aktiviert und leiten das Signal über Autophosphorylierung in die Zelle weiter (Kullander und Klein, 2002). Ephrin-B

Signalübertragung ist wichtig für die Synapsenbildung und Spinemorphologie (Henkemeyer et al., 2003; Penzes et al., 2003; Kayser et al., 2006). Die Bindung von Ephrin mit Eph Rezeptoren führt zur Interaktion des Eph Rezeptors mit NMDA-Rezeptoren (N-methyl-D-aspartate receptor), die entscheidend für die Synapsenentwicklung ist (Dalva et al., 2000). Durch diese Interaktion ist der Einfluss von Ephrin Signalübertragung auf die synaptische Plastizität wenig überraschend (Grunwald et al., 2001; Henderson et al., 2001).

Auch SynCAM1 spielt eine Rolle in der synaptischen Transmission (Robbins et al., 2010). Während Eph Rezeptoren über die Interaktion mit NMDA-Rezeptoren direkt an der Signalweiterleitung beteiligt sind, scheint im Fall von SynCAM1 die strukturelle Stabilität als Grundlage zur Signalübertragung wichtig zu sein. Im Tripleknockout von EphB 1-3 konnte in den sich bildenden Filopodien keine NMDA-Rezeptoren oder AMPA-Rezeptoren (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) nachgewiesen werden (Henkemeyer et al., 2003). Die Spinereifung scheint also durch die mangelnde Signalweiterleitung verhindert zu werden. Die Einzelknockouts für EphB zeigen nur einen schwachen Phänotyp und werden scheinbar durch die anderen EphBs kompensiert. Der hier gezeigte Effekt auf die Spinestabilität durch SynCAM1 kann durch die verbleibenden SynCAMs demgegenüber nicht so leicht kompensiert werden.

Leucine-rich repeat Proteine: Zu der Superfamilie der LRRs (leucine-rich repeats) gehören weitere wichtige synaptische Zelladhäsionsproteine wie SALM (synaptic adhesion-like molecules), NGL (netrin-G ligand) oder Slitrk (von Slit und Trk) (Wang et al., 2006; Ko et al., 2006; Ko und Kim, 2007a; Woo et al., 2009; Aruga und Mikoshiba, 2003). Diese beeinflussen die Bildung, Entwicklung, Beständigkeit, Diversifikation und Plastizität von Synapsen sowie die Entwicklung des Nervensystems (Ko und Kim, 2007a; Lauren et al., 2003; Linhoff et al., 2009; Kim et al., 2006; Ko und Kim, 2007b). Das LRR-Motif vermittelt dabei die Protein-Protein Interaktion. Für viele der LRR Proteine konnte eine Interaktion mit PSD-95 gezeigt werden. PSD-95 ist eines der am besten studierten synaptischen Proteine und ist essentiell an der postsynaptischen Signalverarbeitung beteiligt (Stein et al., 2003; Kornau et al.,

1995; El-Husseini et al., 2000; Gomperts, 1996; Ehrlich et al., 2007; Schnell et al., 2002). In der Interaktion mit PSD-95 könnte ein entscheidender Unterschied zu SynCAM liegen, für das keine Bindung mit PSD-95 gezeigt werden konnte (Aussage Prof. Thomas Biederer). Das unterstützt die These zur strukturbildenden Funktion von SynCAM unabhängig von der synaptischen Übertragung.

Cadherine: Die Familie der Cadherine (nach calcium-dependent adhesion) umfasst eine große Gruppe Calcium-abhängiger Adhäsionsproteine. Cadherine formen einen Komplex mit Catenin, wodurch sie mit dem Aktin-Skelett verankert sind (Arikkath und Reichardt, 2008). Ihnen wird eine Verwicklung in die neuronale Zielerkennung zugeschrieben und ferner sind sie an der Regulation der Spinemorphologie beteiligt (Shapiro und Colman, 1999; Togashi et al., 2002; Arikkath und Reichardt, 2008). Cadherine sind wesentlich in der Entwicklung von Synapsen und Spines involviert und haben Auswirkungen auf die synaptische Plastizität. N-Cadherin dimerisiert als Folge neuronaler Aktivität und führt so zu einer verstärkten Adhäsion (Tanaka et al., 2000). Die synaptische Bindung wird also direkt durch synaptische Aktivität moduliert. Ob ein solcher Zusammenhang von synaptischer Plastizität und adhäsiver Wirkung auch für SynCAM besteht, ist nicht bekannt. Weiterhin wird die Stabilität von Spines und der Spineumsatz durch Catenin als Teil des Cadherin-Komplexes gesteuert (Abe et al., 2004). Der wesentliche Unterschied zu SynCAM besteht darin, dass N-Cadherine keinen Einfluss auf die Spinedichte haben (Jungling et al., 2006; Missler et al., 2012). Cadherine können über Catenin mit anderen Ig-Adhäsionsproteinen wie Nectin interagieren (Takeichi, 2007), ob eine solche Interaktion auch zu SynCAM besteht, bleibt noch zu untersuchen.

Integrin und Syndecan Abschließend seien noch Integrin und Syndecan als Zelladhäsionsproteine genannt, die in Synapsen lokalisiert sind und synaptische Eigenschaften beeinflussen. Für Integrine wurde ein Einfluss auf die synaptische Plastizität sowie die Entwicklung der Synapse gezeigt (Chavis und Westbrook, 2001; Chan et al., 2003). Ihr wesentlicher Unterschied zu SynCAM besteht darin, dass sie mit der extrazellulären Matrix wechselwirken und nur teilweise Zell-Zell Interaktion aufbauen. Ähnliche Interaktionen mit der extrazellulären

Matrix wurde auch für Syndecan beschrieben, die die morphologische Reifung von Spines beschleunigen (Lee und Sheng, 2000). Syndecan interagiert ebenso wie SynCAM mit CASK (Rapraeger, 2000). Es könnte also durch extrazelluläre Liganden, die mit Syndecan interagieren, über die Vermittlung von CASK zur Adhäsion von SynCAM-Proteinen kommen. Der genaue Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Synapsenbildung ist allerdings nicht bekannt.

Die Bedeutung synaptischer Adhäsionsproteine: Die Vielzahl der synaptischen Zelladhäsionsproteine und deren Isoformen sowie die Interaktion mit einer Vielzahl zytosolischer Proteine zeigt wie komplex die Spinebildung und Synapsenreifung ist und wie präzise diese im Gehirn gesteuert werden kann. So ist es auch nicht weiter verwunderlich, dass Zelladhäsionsproteine mit einer Vielzahl von mentalen Krankheiten in Verbindung gebracht wurden, darunter Autismus, Schizophrenie, bipolare Störungen, Rett-Syndrom oder geistige Behinderung (Krueger et al., 2012; Francks et al., 2007; Frei und Stoeckli, 2014; Woo et al., 2009; Sudhof, 2008). SynCAM1 im speziellen wurde dabei mit Autismus in Verbindung gebracht (Zhiling et al., 2008).

Die Erforschung der genauen Funktion einzelner Proteine erweist sich dabei als schwierig, da sich die Ergebnisse von Experimenten mit Neuronenkulturen oftmals von denen *in vivo* unterscheiden. So können andere Adhäsionsproteine Effekte von einem fehlenden Protein kompensieren oder das stark vereinfachte System in Kulturen kann das neuronale Netzwerk nicht adäquat abbilden. So kann die Überexpression eines Proteins in Kulturen, das beispielsweise zur Zielerkennung dient, dazu führen, dass mehr Synapsen gebildet werden, obwohl die Bildung der Synapse nicht seiner eigentlichen Aufgabe entspricht.

Weiterhin kann sich die Funktion eines Adhäsionsproteins während des Lebenszyklus einer Synapse oder in der Entwicklung des Organismus verändern, sodass eine gezielte Aussage über die Funktion erschwert werden kann. Die Interpretation der gewonnenen Ergebnisse ist somit nicht immer eindeutig. Viele Fragen zu Adhäsionsproteinen bleiben unbeantwortet und können Ziel zukünftiger Forschung sein. Insbesondere die Identifizierung der Faktoren, die

bestimmen, an welcher Stelle und zwischen welchen Zellen eine Synapse gebildet wird, bleibt spannend und herausfordernd. Weiterhin bleibt zu klären, ob es zu einer hierarchischen Verarbeitung durch verschiedene Signalwege kommt, die die Synapsenbildung, Reifung oder Auflösung initiieren. Verschiedene Adhäsionsproteine könnten dabei unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Ein Zelladhäsionsmolekül könnte beispielsweise als Folge synaptischer Aktivität andere strukturbildende Adhäsionsproteine zur strukturellen Stabilisierung veranlassen.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Funktion von SynCAM1 im lebenden Mechanismus genauer zu untersuchen. Die präsentierten Daten konnten dabei einen direkten Zusammenhang von SynCAM1 auf die Stabilität und Entwicklung von Spines zeigen. Die dabei erzielten Ergebnisse wurden durch die Überexpression als Verstärkung der Funktion von SynCAM1 gemacht und wurden durch den Verlust seiner Funktion mit entgegengesetzten Resultaten bestätigt.

SynCAM1 kann eine Schlüsselrolle in der Spine Stabilität zugeschrieben werden, da bereits der alleinige Knockout gravierende Folgen auf die Stabilität von dendritischen Spines aufweist. Für weiterführende Experimente ist ein Mehrfachknockout, insbesondere mit SynCAM2, attraktiv, da so ein noch massiverer Einbruch der Spine Stabilität bis hin zum vollständigen Verlust der Fähigkeit Spines zu stabilisieren zu erwarten wäre.

5.3 Der Zusammenhang von Lernen, Gedächtnis, SynCAM und Spines

Die Verknüpfung von zellulären Veränderungen mit dem Gedächtnis bleibt eine der größten Herausforderungen der modernen Neurowissenschaft. Auf welche Art werden Erfahrungen strukturell im Gehirn verankert? Welche synaptischen oder neuronalen Voraussetzungen ermöglichen das Lernen von neuem Wissen oder Fähigkeiten? Zur Beantwortung dieser und ähnlicher Fragen müssen die Mechanismen verstanden werden, die der Bildung, Modulation und Erhaltung von Synapsen zugrunde liegen (Bailey und Kandel, 1993). Anpassungen können dabei in der Veränderung der synaptischen Stärke erfolgen oder durch die Bildung oder Eliminierung von Synapsen. Durch diese Erkenntnisse könnten Lernvorgänge optimiert oder Patienten mit Gedächtnisstörungen behandelt werden.

In dieser Arbeit wurde die Bildung und Stabilität von Spines untersucht und analysiert, welche Rolle SynCAM1 dabei übernimmt.

Strukturelle Veränderungen durch Erfahrung: Verschiedene Studien untersuchten die erfahrungsabhängigen, strukturellen Veränderungen der dendritischen Spinedynamik im Cortex (zusammengefasst in Fu und Zuo, 2011; Holtmaat und Svoboda, 2009; Bhatt et al., 2009). Durch monokulare Deprivation, dem zeitweise Verschließen eines Auges, kommt es zu strukturellen und funktionellen Veränderungen im Cortex (Wiesel und Hubel, 1963; Keck et al., 2008; Gordon und Stryker, 1996; Mrcic-Flogel et al., 2007). Die strukturelle Veränderung aufgrund der Deprivation findet auch auf der Ebene von Spines statt (Majewska und Sur, 2003; Oray et al., 2004; Hofer et al., 2009). So kommt es zu einer erhöhten Spinebildung von Lamina V Neuronen im binokularen Cortex, die nach dem Öffnen des deprivierten Auges wieder auf das Ausgangsniveau zurückgeht (Hofer et al., 2009). Von den neugebildeten Spines während der Deprivation bestehen viele auch noch nachdem wieder normales Sehen möglich ist. Die Erfahrung durch die Deprivation hinterlässt somit strukturelle Spuren in den neugebildeten Spines. Zumindest ein Teil der Erfahrung wurde auf diese Weise in Spines verarbeitet und gespeichert.

SynCAM1 könnte dabei ein Mediator für die Spinebildung sein. Durch die Deprivation könnte über einen Signalweg die Expression von SynCAM1 angeregt werden, sodass es in den entsprechenden Zellen zu einer erhöhten Stabilisierung von Spines kommt, wodurch die Information dauerhaft verarbeitet wird. Passend dazu konnte für das SynCAM-Gen eine massive Hochregulierung nach monokularer Deprivation beobachtet werden (Lyckman et al., 2008). SynCAM könnte also eine Schlüsselrolle in der plastischen Anpassung aufgrund der Deprivation einnehmen und wäre damit direkt an der strukturellen Verarbeitung von Erfahrungen im Gehirn beteiligt. Experimentell könnte dazu untersucht werden, ob im SynCAM1 Knockout die erhöhte Spinebildung, als Folge der monokularen Deprivation, vermindert oder unterdrückt werden könnte. Aufgrund der starken Hochregulierung von SynCAM und der hier gezeigten Funktion in der Stabilität von Spines ist eine veränderte Reaktion auf die

monokulare Deprivation sehr wahrscheinlich. Die Verwicklung von SynCAM1 mit der erfahrungsbedingten Speicherung von Informationen könnte so nachgewiesen werden.

Die hier gezeigten Daten stammen von Neuronen aus dem visuellen Cortex. Die beschriebene Funktion von SynCAM1 ist dabei keineswegs auf den visuellen Cortex beschränkt. Vielmehr wurde ein Modell gesucht, indem die isolierte Funktion von SynCAM1 untersucht werden konnte. Da SynCAM1 im gesamten Cortex exprimiert wird (Thomas et al., 2008) und sich die Spinedynamiken von Lamina V Pyramidenzellen im Neocortex nur geringfügig unterscheiden (Zuo et al., 2005a; Holtmaat et al., 2005; Majewska et al., 2006), kann von einer vergleichbaren Funktion in einer anderen cortikalen Region ausgegangen werden. Im somatosensorischen Cortex wurde ebenfalls sensorische Deprivation dazu verwendet, erfahrungsbedingte Änderung in der Spinedynamik zu untersuchen (Trachtenberg et al., 2002; Lendvai et al., 2000; Holtmaat et al., 2006; Wilbrecht et al., 2010; Schubert et al., 2013; Zuo et al., 2005b; Miquelajauregui et al., 2015). So führte ein Beschneiden der Vibrissen in einem Schachbrettmuster zu einem erhöhten Spineumsatz von Lamina V Neuronen der entsprechenden Region des somatosensorischen Cortex (Trachtenberg et al., 2002). Weiterhin wurden als Folge der Deprivation neue Spines stabilisiert und vormals beständige Spines destabilisiert (Holtmaat et al., 2006). Somit ist die Modellierung von Spines und synaptischen Verbindungen von großer Bedeutung in der Entwicklung und der Verarbeitung von Erfahrungen.

Ein Zusammenhang von SynCAM1 mit den Veränderungen der Spinedynamik ist denkbar, da insbesondere der Spineumsatz oder die Spinestabilisierung durch SynCAM1 beeinflusst wird (siehe Abbildung 4.9 und Abbildung 4.13). So könnte die Deprivation im adulten Tier zu einer Erhöhung des SynCAM1 Levels in den neuen Spines führen und zu einer Verringerung in den vorhandenen, sodass es zu der beschriebenen Stabilisierung von neuen Spines und Destabilisierung von vorhandenen Spines kommt.

Bei neugeborenen Tieren findet eine starke Synaptogenese statt, der eine Eliminierung von einem großen Teil der Synapsen folgt (Zuo et al., 2005a; Rakic et al., 1986). Durch anhaltende sensorische Deprivation kann die Eliminierung von Synapsen im somatosensorischen Cortex aufgehalten werden (Zuo et al., 2005b). Die Reduktion der Spinedichte und Reor-

organisation des neuronalen Netzwerks während der Entwicklung wird somit durch Erfahrung mitbestimmt. Die Mechanismen, die dem Spineabbau zugrunde liegen, und welchen Einfluss Erfahrung auf die Netzwerkorganisation hat, bleibt schwierig zu beantworten. Zumindest im visuellen Cortex konnte eine starke Abnahme des Expressionslevels von SynCAM von P14 (postnataler Tag 14) zu P28 beobachtet werden (Lyckman et al., 2008). Diese Herabregulation des Expressionslevels von SynCAM könnte durch die Abnahme der Spinedichte zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung bedingt sein (Holtmaat et al., 2005), sodass die Spinedichte an das Expressionslevel von SynCAM gekoppelt wäre. Die Deprivation könnte in juvenilen Tieren zu einer anhaltenden Expression von SynCAM1 führen, die den Spineverlust somit verhindert. Die Verringerung des Proteinlevels von SynCAM und anderen Adhäsionsproteinen während der Entwicklung könnte zum Abbau von Synapsen und zur Reorganisation des neuronalen Netzwerks führen. Damit wäre SynCAM auch ein Regulator der Spinedichte während der Entwicklung und würde die entwicklungsabhängige Netzwerkumstrukturierung kontrollieren.

Neben der Unterdrückung von sensorischen Reizen wurden auch entgegengesetzte Experimente durchgeführt. Dazu wurden Tiere in einer angereicherten Umgebung gehalten, um den Reizeingang zu erhöhen (Alvarez und Sabatini, 2007; van Praag et al., 2000; Yang et al., 2009; Jung und Herms, 2012). Als Folge der angereicherten Umgebung wurden Veränderungen in der Spinedichte, dem Spineumsatz sowie der Überlebensrate von Spines von kortikalen Neuronen beobachtet. Es kommt sowohl durch die sensorische Deprivation als auch durch sensorische Anreicherung zur Eliminierung vorhandener Spines (vergl. Holtmaat et al., 2006; Jung und Herms, 2012).

Das deutet zunächst darauf hin, dass sich das System auf die neue Reizsituation einstellt und vorhandene, nicht mehr benötigte Synapsen wegfallen, für die neue neuronale Verknüpfungen gebildet werden, die eine angepasste Reaktion auf die neuen Gegebenheiten ermöglichen. Außerdem zeigt es, dass sich die simple Veränderung der sensorischen Eingänge nicht so leicht in der Spine Stabilität oder dem Spineumsatz ablesen lässt. Jede sensorische Veränderung kann eine unterschiedliche Anpassung auf der Spineebene zur Folge haben. Die Komplexität der Verarbeitung von Erfahrungen im Nervensystem ist weit höher als die Ver-

änderungen einzelner Parameter wie der Spine­stabilität. Einzelne Spines könnten dabei vollkommen unterschiedlich auf verschiedene Reize reagieren. Die Veränderung in der Stärke der synaptischen Verbindung kann eine weitere entscheidende Rolle in der Verarbeitung von Erfahrungen und Erinnerungen spielen. So könnten einige Synapsen wegfallen und die Transmission der übrigen Synapsen vergrößert werden, sodass eine höhere Sensitivität entsteht.

Festzuhalten bleibt, dass die Reorganisation von Spines auch durch Erfahrungen bestimmt wird. Welche Adhäsionsproteine in die Prozesse involviert sind, die die erfahrungsbedingte Restrukturierung veranlassen, muss in späteren Experimenten untersucht werden. Dass SynCAM1 direkt oder indirekt daran beteiligt ist, ist sehr wahrscheinlich, da insbesondere diejenigen Eigenschaften der Spines wie der Spineumsatz oder die Stabilität beeinflusst werden, die auch SynCAM1 verändert.

Veränderung der Spinedynamik beim Lernen: Neben der Verarbeitung von Erfahrungen, die zu anhaltenden Veränderungen in der Netzwerkorganisation führen, sind synaptische Anpassung essentiell für das Erlernen neuer Fähigkeiten (Buonomano und Merzenich, 1998). Verschiedene Untersuchungen zum Einfluss von Lernen auf die Spinedynamik wurden durchgeführt (Xu et al., 2009; Yang et al., 2009; Fu et al., 2012; Kuhlman et al., 2014; Lai et al., 2012; Joachimsthaler et al., 2015; Moczulska et al., 2013). Es kommt durch den Lernprozess entweder zur Neubildung von Spines (Xu et al., 2009; Yang et al., 2009; Fu et al., 2012; Kuhlman et al., 2014; Moczulska et al., 2013) oder zur Eliminierung von Spines (Lai et al., 2012; Joachimsthaler et al., 2015). Anhand der Ergebnisse aus den genannten Studien kann weder die Veränderung der Spinedichte anhand des Lernparadigmas bestimmt werden, noch gibt es Aufschluss über das Verhalten verschiedener Zelltypen oder Cortexregionen während des Lernprozesses (Joachimsthaler et al., 2015).

Das Lernen des Gehirns erscheint damit deutlich komplexer, als das man die Veränderung in der Spinedichte auf Grund des Lernparadigmas voraussagen könnte. Allerdings konnte für die Extinktion einer Angstkonditionierung der entgegengesetzte Effekt zu dem vorangegangenen Lernvorgang beschrieben werden (Lai et al., 2012). So kam es durch die Konditionierung

zur Eliminierung von Spines und die anschließende Extinktion der Konditionierung führte zu einer Neubildung von Spines auf denselben dendritischen Abschnitten, die eine gewisse Reversibilität und damit das teilweise Überschreiben des Erlernten nahelegen. Weiterhin konnte eine Korrelation vom Trainingserfolg und der Neubildung von Spines oder deren Stabilität hergestellt werden, der den Zusammenhang vom Lernerfolg mit der Spinebildung belegt (Xu et al., 2009; Yang et al., 2009; Kuhlman et al., 2014). Die Stabilität von neuen und bereits existierenden Spines wurde dabei erhöht. Das impliziert, dass durch Spines erlernte Fähigkeiten oder Verhalten dauerhaft verarbeitet werden. Spines stellen somit eine strukturelle Anpassungsmöglichkeit für das Lernen neuer Fähigkeiten dar.

Die Neubildung von Spines sowie die Entfernung bestehender Spines ermöglicht dem Zentralnervensystem sich auf eine wechselnde Umgebung anzupassen. Teile der so gebildeten Spines bleiben ein Leben lang erhalten. SynCAM1 könnte dabei ein Regulator für die Spine Stabilität darstellen. Neue Reize oder Aufgaben könnten über eine Signalkaskade zur veränderten Bindung oder Expression von SynCAM1 führen und so die Spinebildung oder Eliminierung vermitteln. Demgemäß wurden für die hier verwendeten Mäuse Unterschiede im Lernverhalten zu Vergleichstieren beobachtet (Robbins et al., 2010). Die SynCAM1^{flag} Überexpressionsmäuse zeigten dabei Lerndefizite und die SynCAM1 Knockout-Mäuse schnitten sogar besser ab als die Kontrollgruppe. Die SynCAM1 Knockout-Tiere haben einen deutlich erhöhten Spineumsatz und könnten es damit leichter haben Spines neu anzuordnen und sich auf neue Begebenheiten anzupassen. Die Überexpressionstiere dagegen haben eine starre Spinedynamik und einen niedrigen Umsatz, sodass es für sie schwierig sein könnte, neue Fähigkeiten zu erlernen und die dafür notwendigen Spines zu reorganisieren.

Somit könnte die dynamische Bildung und Auflösung von Spines wichtig sein, um Fähigkeiten zu erlernen, Erfahrungen zu verarbeiten und zu speichern. So konnte in einer anderen Untersuchung ein erhöhter Spineumsatz mit einem besseren Lernergebnis korreliert werden (Roberts et al., 2010). Es steht allerdings noch aus zu klären, ob SynCAM1 Knockout-Tiere obgleich ihres verbesserten räumlichen Gedächtnisses möglicherweise ein vermindertes Langzeitgedächtnis haben. Ein Zusammenhang von der Stabilität von Synapsen und Spines und

der Fähigkeit Erinnerungen zu speichern wurde schon häufiger diskutiert (Bhatt et al., 2009; Hofer und Bonhoeffer, 2010; Bourne und Harris, 2007; Bailey und Kandel, 1993). Der Anteil beständiger Spines wird mit langanhaltenden Erinnerungen assoziiert (Yang et al., 2009; Grutzendler et al., 2002; Holtmaat et al., 2005). Durch die verminderte Spinestabilität der SynCAM1 Knockouts könnte es sein, dass Inhalte zwar schneller gelernt werden, aber gleichzeitig leichter wieder vergessen werden. Die geringere Stabilität der Spines könnte es erschweren, das Gedächtnis dauerhaft zu erhalten. Es wäre also denkbar, dass die Spinestabilität Lernerfolg und Gedächtnisfähigkeit entgegengesetzt beeinflusst, sodass eine niedrige Stabilität Lernvorgänge erleichtert und gleichzeitig die dauerhafte Speicherung erschwert. In der Natur könnte die gegebene Spinestabilität einen Mittelweg aus Lernfähigkeit und Gedächtnisspeicherung darstellen.

Berücksichtigt werden sollte außerdem, dass die SynCAM1^{flag} Überexpressionstiere und die SynCAM1 Knockout-Mäuse Veränderungen in synaptischer Plastizität zeigen (Robbins et al., 2010). In SynCAM1^{flag} Überexpressionstieren konnte kein LTD (Langzeit-Depression) ausgelöst werden und in den SynCAM1 Knockout-Tieren war es sogar verstärkt. LTP (Langzeit-Potenzierung) dagegen war unbeeinträchtigt von der SynCAM1 Expression. Die synaptische Plastizität stellt eine grundlegende Form für Lernen und Gedächtnis auf synaptischer Ebene dar (Bliss und Collingridge, 1993; Murakoshi und Yasuda, 2012; Luscher et al., 2000). Die Lernunterschiede könnten also auch durch die veränderte synaptische Plastizität bedingt sein. Dabei könnte die synaptische Plastizität, die veränderte Spinestabilität oder beides den Lernerfolg beeinflussen.

Spines als Informationsspeicher: Die Zwei-Photonen-Mikroskopie hat es ermöglicht, *in vivo* die Veränderung von Spines zu untersuchen und so zum Verständnis beigetragen, wie Lernen und Gedächtnis in der dynamischen Änderung von Spines resultieren. Die Speicherung von Erinnerungen und das Erlernen neuer Fähigkeiten spiegelt sich dabei in der Veränderung von Spines wieder. So geht die natürliche Abnahme der kognitiven Fähigkeiten im Alter mit einer Änderung der Spinedynamik einher (Mostany et al., 2013). Weiterhin führt Schlaf

zur gezielten Stabilisation von Spines und verbessert so die Gedächtnisbildung (Yang et al., 2014). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SynCAM1 die Stabilität und Entwicklung von Spines bestimmt. SynCAM1 könnte somit eine wichtige Rolle in der Verarbeitung von Erinnerungen haben und die Fähigkeit Neues zu erlernen bestimmen.

Zahlreiche Fragen zum Lernen und Gedächtnis bleiben allerdings unbeantwortet. In der Zukunft wird es von großer Bedeutung sein, diejenigen Spines zu identifizieren, in denen die Information tatsächlich gespeichert ist. So finden die gemachten Beobachtungen während eines natürlichen Spineumsatzes statt. Somit ist es schwierig, diejenigen Spines zu bestimmen, die tatsächlich am Lernen beteiligt waren. Auch wurde in der Regel nur eine Subpopulation von Neuronen betrachtet, sodass nur ein Ausschnitt der effektiv beteiligten Neuronen in die Auswertung einfluss. Einzelne Spines oder dendritische Abschnitte können dabei verschiedene Funktionen innerhalb eines Neurons haben (Jia et al., 2010; Chen et al., 2011; Cichon und Gan, 2015). Weiterhin muss analysiert werden, wie Synapsen Erfahrungen kodieren und wie es zur gezielten Stabilisation der entsprechenden Spines kommt (Wyatt et al., 2012). Auf welche Art sich das Gedächtnis bildet und erhalten wird, bleibt eines der größten Mysterien der modernen Neurowissenschaft.

5.4 Methodische Aspekte der gewonnenen Ergebnisse

In diesem Abschnitt soll der Einfluss verschiedener Faktoren bei der Präparation und Durchführung auf die gewonnenen Ergebnisse diskutiert werden. Für *in vivo* Studien von Neuronen existieren zwei gängige Präparationen, die Zwei-Photonen-mikroskopische Aufnahmen ermöglichen. Der Schädelknochen wird entweder bis auf ca. 20 μm dünn geschliffen und ermöglicht transkraniale Aufnahmen (Yang et al., 2010) oder es wird ein Teil der Schädeldecke entfernt und durch ein kraniales Fenster ersetzt (Holtmaat et al., 2009). Die Vor- und Nachteile der beiden Methoden sollen im folgenden erläutert werden. Die Verdünnung des Schädelknochens ist weniger invasiv als das kraniale Fenster, sodass direkt nach der Operation mit den Messungen begonnen werden kann. Ein Schädelstück von 0,2 mm im Durchmesser über der gewünschten kortikalen Region wird dünn geschliffen. Durch die verhältnismäßig kleine Stelle ist eine ho-

he Dichte fluoreszent-markierter Zellen erforderlich (z.B. YFP-H Linie). Zwischen einzelnen Messungen muss der nachgewachsene Schädelknochen erneut dünn geschliffen werden. Da für jede Messungen der Schädelknochen ein wenig lichtundurchlässiger wird und deswegen der Knochen für jeden Messpunkt dünner geschliffen werden muss, ist die maximale Anzahl an aufeinanderfolgenden Aufnahmen mit guter Bildqualität, selbst bei guter Durchführung, auf maximal fünf beschränkt, wobei die Intervalle zwischen den Messtagen beliebig groß sein können.

Das kraniale Fenster ermöglicht Aufnahmen über einen großen kortikalen Bereich für theoretisch unbegrenzt viele Zeitpunkte. Nach einigen Monaten kann es zum Knochenwachstum unter dem Fenster kommen, wodurch die Bildqualität eingeschränkt wird. Durch die Öffnung des Schädels werden Eingriffe wie die Applikation von Drogen oder Viren oder das Patchen von Nervenzellen ermöglicht. Beide Präparationen benötigen viel Übung und müssen mit großer Sorgfalt durchgeführt werden, um eine gute Bildqualität zu gewährleisten und das Gehirn nicht zu schädigen. Der große Nachteil des kranialen Fensters ist, dass es zu einer postoperativen Inflammation kommen kann, die den Spineumsatz beeinflusst (Xu et al., 2007). Zahlreiche Studien haben beide Methoden verglichen und den Einfluss der postoperativen Gliosis untersucht oder diskutiert (Xu et al., 2007; Holtmaat und Svoboda, 2009; Mostany et al., 2013; Yang et al., 2010; Holtmaat et al., 2009; Pan und Gan, 2008; Majewska et al., 2006; Lee et al., 2008; Crowe und Ellis-Davies, 2014). Es herrscht allerdings Uneinigkeit, ob die Präparation einen Einfluss auf die beobachteten Spinedynamik hat. In jedem Fall ist es ratsam nach der Implantation des kranialen Fensters eine Erholungszeit einzuräumen, da die operationsbedingte Mikroglia Aktivierung 1-2 Wochen anhält und nach 4 Wochen abgeklungen ist (Lee et al., 2008; Holtmaat et al., 2009). Es gibt Versuche die Vorteile beider Präparationen zu kombinieren (Drew et al., 2010) oder den Schädelknochen lichtdurchlässig zu machen (Wang et al., 2012).

In den veröffentlichten Studien zur Spinedynamik gibt es teils gravierende Unterschiede in der beobachteten Spinestabilität und Spineumsatz (diskutiert in Fu und Zuo, 2011; Yuste und Bonhoeffer, 2004; Holtmaat und Svoboda, 2009).

Neben der Präparation können weitere Faktoren die Ergebnisse beeinflussen: Die Auswertung der Spines erfolgt in der Regel manuell, sodass individuelle Unterschiede zu abweichenden Ergebnissen führen können. Die verwendeten Kriterien der Spinebestimmung können sich weiterhin unterscheiden, so werden von einigen Gruppen keine Filopodia für die Auswertung berücksichtigt. Weiterhin kann das Alter der Tiere, die Mauslinie, die Cortexregion oder der Zelltyp den Vergleich zu anderen Untersuchungen erschweren.

Verlässliche Ergebnisse lassen sich erzielen, indem Beobachtungen desselben Tieres vor und nach einer Behandlung vom selben Beobachter durchgeführt werden, wie die hier vorgestellten Ergebnisse der induzierten SynCAM1^{flag} Überexpression. Zusätzlich wurden Geschwistertiere verwendet, die dieselbe Behandlung erfahren haben. Weiterhin wurde die Spinedynamik blind in Bezug auf den Genotypen ausgewertet und erwies sich ohne Behandlung über mehrere Monate als konstant. Sollte der Spineumsatz oder die Überlebensrate durch die Operation oder andere Faktoren beeinflusst worden sein, so waren sie dennoch über den Messzeitraum und mit den verwendeten Bedingungen konstant und erlauben Aussagen über den Einfluss von SynCAM1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Cortexregion unter dem kranialen Fenster zeigten keine Auffälligkeit gegenüber einer unbehandelten Stelle (Aussage Prof. Stephan Baader), sodass von keiner großen Beeinträchtigung des Nervengewebes ausgegangen werden muss.

Auf die präzise Identifikation der untersuchten Cortexregion mittels intrinsischer Bildgebung (Grinvald et al., 1986) wurde in dieser Arbeit verzichtet. Das kraniale Fenster wurde über dem visuellen Cortex implantiert. So stammt der Großteil der Neurone aus dem visuellen Cortex, es könnten aber dennoch Neuronen aus benachbarten Regionen aufgenommen worden sein. Da sich die Eigenschaften der Spines von Lamina V Neuronen der verschiedenen Cortexregionen nur geringfügig unterscheiden, ist der Einfluss von Neuronen aus anderen Regionen allerdings zu vernachlässigen (Majewska et al., 2006; Holtmaat et al., 2005). Die gemachten Untersuchungen gelten allgemein für die Funktion von SynCAM1 und hätten auch in einer anderen kortikalen Region, einer anderen kortikalen Schicht oder an einem anderen Neuronentyp gemacht werden können.

Für die Aufnahmen wurden die Mäuse anästhesiert und zwischen zwei Aufnahmetagen in ihre Käfige zurückgebracht. Da die Narkose mit der Veränderung von neuronaler Aktivität in Verbindung gebracht wurde (Franks und Lieb, 1994; Rudolph und Antkowiak, 2004), kann auch ein Einfluss auf die Spinedynamik vermutet werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die hier verwendete Narkose mit Ketamin/Xylazin keinen entscheidenden Einfluss auf die Spinedynamik hat, sodass auch die Betäubung für die Interpretation der Ergebnisse nicht weiter berücksichtigt werden muss (Yang et al., 2011).

Um Neuronen im Cortex mit fluoreszierenden Farbstoffen zu markieren, gibt es drei häufig verwendete Methoden. Erstens können transgene Mäuse, die ein Fluorophor wie GFP in einem bestimmten Zelltyp exprimieren, verwendet werden (Feng et al., 2000). Die Mauslinien exprimieren das Fluorophor in einzelnen Neuronen und ermöglichen *in vivo* Aufnahmen von verschiedenen Cortexregionen in sehr guter Qualität zu jedem Alter der Tiere über beliebig lange Zeiträume. Einziger Nachteil in der Verwendung von transgenen Tieren besteht in der relativ langen Vorlaufzeit und dem hohen Zuchtaufwand. Insbesondere wenn, wie hier geschehen, die Kreuzung mit anderen transgenen Mauslinien erfolgt.

Ein zweiter Weg, Erbmaterial in einzelne Zellen einzubringen, ist über die *in utero* Elektroporation (Saito und Nakatsuji, 2001; Tabata und Nakajima, 2001; Saito, 2006). Vorteile sind, dass Wildtypmäuse verwendet werden können und dass quasi beliebige Plasmide mit dem Fluorophor in die entsprechenden Zellen eingebracht werden können. Die Prozedur benötigt allerdings eine weitere komplizierte Operation, die Erfahrung erfordert und das Nervengewebe schädigen kann.

Drittens können Neurone mittels Viren markiert werden (Blömer et al., 1997; La Salle et al., 1993). Dafür werden in der Regel vor der Implantation des kranialen Fensters Viren in den Cortex appliziert, die entsprechende Neurone infizieren. Die virale Infektion ist eine einfache und schnelle Methode, die es ermöglicht, Neurone von Wildtypmäusen für Wochen bis Monate nach der Infektion aufzunehmen. Allerdings ist die Kapazität des viralen Vektors begrenzt und es kann zur Beeinträchtigung der infizierten Zellen oder umliegenden Nervengewebe kommen. Im Zuge der Dissertation wurden alle drei Möglichkeiten der Markierung

einzelner Neurone getestet und diskutiert. Die Verwendung der transgenen Mäuse hat sich dabei als am vielversprechendsten herausgestellt. Die Methode ist am wenigsten invasiv und ermöglicht die Aufnahme der Nervenzellen über einen langen Zeitraum in sehr guter Bildqualität. Außerdem war es durch die Kreuzung der GFP-Mäuse mit den SynCAM1^{flag} Überexprimierern bzw. SynCAM1 Knockouts möglich die Spinedynamik zu untersuchen, wenn das gesamte Netzwerk von der veränderten Expression betroffen ist. Da SynCAM1 prä- und postsynaptisch vorkommt, wird so das SynCAM1 Level auf beiden Seiten der Synapse verändert. Wird dagegen nur in einzelnen Zellen SynCAM1 überexprimiert oder herunterreguliert, können die Ergebnisse von den hier gemachten abweichen, da nur die Postsynapse ein verändertes SynCAM1 Level aufweist und die Präsynapse demgegenüber SynCAM1 auf Wildtypniveau exprimiert.

Generell ist die Untersuchungen von Spines problematisch, da nur der postsynaptische Anteil der Synapse gefärbt ist. Es ist also nicht eindeutig, welche Spines einen präsynaptischen Partner haben. Außerdem lässt sich nicht klären, welche Spines aktive Synapsen haben. Allerdings konnte die Größe von Spines mit der zugehörigen Synapsengröße korreliert werden (Bourne und Harris, 2007; Kasai et al., 2003). Dabei sind Spines mit Synapsen stabiler und überleben länger (Knott et al., 2006). Ebenso konnte die Synapsengröße mit der Stabilität der Spines in Verbindung gebracht werden (Cane et al., 2014; Alvarez und Sabatini, 2007; Kasai et al., 2003). Auch wenn nicht eindeutig ist, welche Spines tatsächlich Synapsen besitzen, so ist die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Spine eine Synapse besitzt, durch seine Größe und Stabilität gegeben.

Zahlreiche Faktoren können die hier gezeigten Ergebnisse beeinflusst haben. Unter der Berücksichtigung der verwendeten Methoden und Kontrollbedingen erscheint die beschriebene Funktion von SynCAM1 auf die Spine Stabilität allerdings als äußerst robust und glaubwürdig. Zusätzlich wurde das SynCAM1^{flag} Überexpressionsmodell mit dem SynCAM1 Knockout kombiniert, wodurch die Ergebnisse vervollständigt und bestätigt werden konnten.

6 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Die hier gewonnenen Ergebnisse demonstrieren die Funktion von SynCAM1 im intakten Gehirn. Es ist eine der ersten Studien überhaupt, die den Einfluss eines synaptischen Adhäsionsproteins auf die Stabilität und Entwicklung von Spines *in vivo* belegt. Mit Hilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass SynCAM1 direkt die Stabilisierung und Entwicklung von neuen Spines sowie die Stabilität von bestehenden Spines beeinflusst. Dabei wurden die Daten von der SynCAM1^{flag} Überexpression und dem SynCAM1 Knockout verglichen und konnten so ein komplementäres Bild über die Funktion von SynCAM1 liefern. Die Änderung des Expressionslevels von SynCAM1 führte zu einer massiven Veränderung in der Reifung und Stabilität von Spines. Da die basalen synaptischen Eigenschaften unverändert bleiben (Robbins et al., 2010), deuten die Daten daraufhin, dass SynCAM1 eine Sonderrolle in der Synapsenstabilität und -entwicklung einnimmt, ohne die synaptische Transmission zu verändern. Somit ist SynCAM1 ein Hauptregulator für die Spinedichte.

Zusammengefasst kann folgendes Spinemodell beschrieben werden: Kommt es zum initialen Kontakt der synaptischen Seiten führt die adhäsive Verbindung von SynCAM1 zur Stabilisation des neuen Spines. Aufgrund der höheren Stabilität wird die Spineentwicklung zum reifen Spine vereinfacht und die Überlebensrate erhöht. Die Lebensdauer und die Beständigkeit des reifen Spines wird letztendlich durch SynCAM1 mitbestimmt.

Durch die gezeigte wichtige Funktion in der Spineentwicklung und -stabilität kann für SynCAM1 eine wichtige Rolle in der Spineregulation während des Lernens angenommen werden. So wurden für die hier verwendeten Mausmodelle veränderte Lernerfolge beobachtet, wobei die Knockout-Mäuse im räumlichen Gedächtnistest besser und die Überexpressionstiere schlechter abschnitten (Robbins et al., 2010). Inwiefern sich die veränderte Spinestabilität auf die Fähigkeit zu lernen und die Gedächtnisbildung auswirkt, muss noch genauer untersucht werden. Insbesondere ist die Frage spannend und herausfordernd, wie sehr eine hohe Spinestabilität benötigt wird, um eine Erinnerung langfristig zu erhalten. Dafür müsste ein Lernparadigma gesucht werden, an dem genau diejenigen Neurone beteiligt sind, die ein verändertes SynCAM1 Level aufweisen. Denn die großflächige Veränderung des Proteinlevels

von SynCAM1 kann auch durch Netzwerkeffekte, zum Beispiel durch eine veränderte durchschnittliche Aktivität pro Synapse, Einfluss auf den Lernerfolg haben.

Weiterhin ist die Untersuchung von SynCAM1 im Vergleich und als Konkurrenz zu anderen Adhäsionsproteinen wichtig und interessant. Dabei könnte insbesondere SynCAM2 einen spannenden Kandidaten darstellen. Der Doppelknockout von SynCAM1 und SynCAM2 sollte einen noch dramatischeren Effekt auf die Spine Stabilität darstellen, da insbesondere die Kompensation durch homophile Interaktionen von SynCAM2 wegfällt.

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
Cadherine	nach calcium-dependent adhesion
Cadm1	Cell adhesion molecule 1 (SynCAM1)
CamKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
CASK	Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase
Dscam	Down syndrome cell adhesion molecule
Farp1	FERM, Rho/ArhGEF, and Pleckstrin domain protein 1
FWHM	full width half maximum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GUI	graphical user interface
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin superfamily
IgSF4a	Immunglobulin Superfamily member 4a (SynCAM1)
KO	Knockout
Ktr.	Kontrolle
LAR	leukocyte-associated receptor
LRR	leucine-rich repeats
LRRTM	leucine rich repeat trans-membrane
LTD	Langzeit-Depression
LTP	Langzeit-Potenzierung
mEPSC	miniature excitatory postsynaptic current
NCAM	neural cell adhesion molecule
necl-2	nectin-like molecule 2 (SynCAM1)
NGL	netrin-G ligand
NMDA	N-methyl-D-aspartate
pdz	postsynaptic density-95/discs large/zona occludens-1
PMT	Photomultiplier tube
PSD	postsynaptische Dichte
PSD-95	postsynaptic density protein 95
PSF	Punktspreizfunktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA175	retinoic acid inducible protein 175 (SynCAM1)
RTK	receptor tyrosine kinase
SALM	synaptic adhesion-like molecules
Slitrk	von Slit und Trk
SynCAM1	Synaptic Cell Adhesion Molecule 1
Syntenin	Syndecan binding protein
TBS	Tris Buffered Saline
Thy-1	Thymocyte differentiation antigen 1
TsLC1	Tumor suppressor in lung cancer 1 (SynCAM1)
TSP1	Thrombospondin 1
ÜE	Überexpression

Abbildungsverzeichnis

2.1	Laminarer Aufbau des Neocortex	4
2.2	Drei Modelle zur Entstehung von Spines	6
2.3	Struktur und transsynaptische Verbindung von SynCAM	10
2.4	Vergleich von Ein-Photonen-Anregung und Zwei-Photonen-Anregung	13
3.1	Strahlengang des Zwei-Photonen-Mikroskops	16
3.2	Modell der offenen Detektorbox	17
3.3	Steuerung des Zwei-Photonen-Mikroskops	19
3.4	Experimentelle Bestimmung der Punktspreizfunktion	20
3.5	Klassifikation von dendritischen Spines	25
3.6	Screenshot zur Auswertung der Spinedynamik	27
4.1	Analyse der SynCAM1 ^{flag} Überexpression	35
4.2	Induzierte SynCAM1 ^{flag} Überexpression	36
4.3	Die Spinedichte wird durch induzierte SynCAM1 ^{flag} Überexpression erhöht	38
4.4	Die absolute Anzahl stabiler Spines steigt nach induzierter SynCAM1 ^{flag} Überexpression an	39
4.5	Induzierte Langzeitüberexpression von SynCAM1 ^{flag}	41
4.6	Die Spinedichte wird durch SynCAM1 ^{flag} Langzeitüberexpression anhaltend erhöht	42
4.7	Dauerhafte SynCAM1 ^{flag} Überexpression	45
4.8	Dauerhafte SynCAM1 ^{flag} Überexpression erhöht die Spindichte und verringert den Spineumsatz	46
4.9	Die Stabilität von Spines wird durch SynCAM1 ^{flag} Überexpression erhöht	48
4.10	Veränderte Entwicklung und Verlängerung der Lebensdauer von Spines durch SynCAM1 ^{flag} Überexpression	50
4.11	Der SynCAM1 Knockout	52
4.12	Verringerte Spindichte und erhöhter Spineumsatz in SynCAM1 Knockout-Tieren	53

4.13 Die Stabilität von Spines wird durch die Abwesenheit von SynCAM1 stark verringert	55
4.14 Einfluss auf die Entwicklung und Verkürzung der Lebensdauer von Spines durch den SynCAM1 Knockout	57
5.1 Modell zur Entstehung von Spines und der Einfluss von SynCAM1	60

Tabellenverzeichnis

3.1	Verwendete Bauteile	31
3.2	Pharmaka	32
3.3	Chemikalien	32
6.1	Daten aus Abbildung 4.1A	115
6.2	Daten aus Abbildung 4.1B	115
6.3	Daten aus Abbildung 4.3A	115
6.4	Daten aus Abbildung 4.3C	116
6.5	Daten aus Abbildung 4.3D	116
6.6	Daten aus Abbildung 4.4A	116
6.7	Daten aus Abbildung 4.4B	117
6.8	Daten aus Abbildung 4.6A	117
6.9	Daten aus Abbildung 4.6B	117
6.10	Daten aus Abbildung 4.6C	118
6.11	Daten aus Abbildung 4.6D	118
6.12	Daten aus Abbildung 4.8A	118
6.13	Daten aus Abbildung 4.8B	119
6.14	Daten aus Abbildung 4.8C	119
6.15	Daten aus Abbildung 4.8D	119
6.16	Daten aus Abbildung 4.9A	120
6.17	Daten aus Abbildung 4.9B	120
6.18	Daten aus Abbildung 4.9C	120
6.19	Daten aus Abbildung 4.9D	121
6.20	Daten aus Abbildung 4.10A	121
6.21	Daten aus Abbildung 4.10B	121
6.22	Daten aus Abbildung 4.12A	121
6.23	Daten aus Abbildung 4.12B	122
6.24	Daten aus Abbildung 4.12C	122

6.25 Daten aus Abbildung 4.12D	122
6.26 Daten aus Abbildung 4.13A	123
6.27 Daten aus Abbildung 4.13B	123
6.28 Daten aus Abbildung 4.13C	123
6.29 Daten aus Abbildung 4.13D	124
6.30 Daten aus Abbildung 4.14A	124
6.31 Daten aus Abbildung 4.14B	124

Literatur

- K. Abe, O. Chisaka, F. Van Roy, und M. Takeichi. Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by alpha N-catenin. *Nat Neurosci*, 7(4):357–63, 2004.
- V. A. Alvarez und B. L. Sabatini. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci*, 30:79–97, 2007.
- J. Arikath und L. F. Reichardt. Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, 31(9):487–94, 2008.
- J. Aruga und K. Mikoshiba. Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci*, 24(1):117–29, 2003.
- C. H. Bailey und E. R. Kandel. Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol*, 55:397–426, 1993.
- N. Becker, C. J. Wierenga, R. Fonseca, T. Bonhoeffer, und U. V. Nagerl. LTD induction causes morphological changes of presynaptic boutons and reduces their contacts with spines. *Neuron*, 60(4):590–7, 2008.
- D. L. Benson, D. R. Colman, und G. W. Huntley. Molecules, maps and synapse specificity. *Nat Rev Neurosci*, 2(12):899–909, 2001.
- D. H. Bhatt, S. Zhang, und W. B. Gan. Dendritic spine dynamics. *Annu Rev Physiol*, 71:261–82, 2009.
- T. Biederer. Bioinformatic characterization of the SynCAM family of immunoglobulin-like domain-containing adhesion molecules. *Genomics*, 87(1):139–50, 2006.
- T. Biederer, Y. Sara, M. Mozhayeva, D. Atasoy, X. Liu, E. T. Kavalali, und T. C. Sudhof. SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science*, 297(5586):1525–31, 2002.

- T. Binzegger, R. J. Douglas, und K. A. Martin. A quantitative map of the circuit of cat primary visual cortex. *J Neurosci*, 24(39):8441–53, 2004.
- T. V. Bliss und G. L. Collingridge. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407):31–9, 1993.
- U. Blömer, L. Naldini, T. Kafri, D. Trono, I. M. Verma, und F. H. Gage. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *Journal of virology*, 71(9):6641–6649, 1997.
- J. Blundell, C. A. Blaiss, M. R. Etherton, F. Espinosa, K. Tabuchi, C. Walz, M. F. Bolliger, T. C. Sudhof, und C. M. Powell. Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. *J Neurosci*, 30(6):2115–29, 2010.
- J. Bourne und K. M. Harris. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol*, 17(3):381–6, 2007.
- D. V. Buonomano und M. M. Merzenich. Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annual review of neuroscience*, 21(1):149–186, 1998.
- W. N. Burnette. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112(2):195–203, 1981.
- S. Cajal. *Comparative study of the sensory areas of the human cortex*. 1899.
- M. Cane, B. Maco, G. Knott, und A. Holtmaat. The Relationship between PSD-95 Clustering and Spine Stability In Vivo. *J Neurosci*, 34(6):2075–86, 2014.
- C. S. Chan, E. J. Weeber, S. Kurup, J. D. Sweatt, und R. L. Davis. Integrin requirement for hippocampal synaptic plasticity and spatial memory. *J Neurosci*, 23(18):7107–16, 2003.
- P. Chavis und G. Westbrook. Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature*, 411(6835):317–21, 2001.

-
- L. Cheadle und T. Biederer. The novel synaptogenic protein Farp1 links postsynaptic cytoskeletal dynamics and transsynaptic organization. *J Cell Biol*, 199(6):985–1001, 2012.
- B. E. Chen, M. Kondo, A. Garnier, F. L. Watson, R. Puettmann-Holgado, D. R. Lamar, und D. Schmucker. The molecular diversity of Dscam is functionally required for neuronal wiring specificity in *Drosophila*. *Cell*, 125(3):607–20, 2006.
- C. Chen und S. Tonegawa. Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci*, 20:157–84, 1997.
- X. Chen, U. Leischner, N. L. Rochefort, I. Nelken, und A. Konnerth. Functional mapping of single spines in cortical neurons in vivo. *Nature*, 475(7357):501–5, 2011.
- B. Chih, H. Engelman, und P. Scheiffele. Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science*, 307(5713):1324–8, 2005.
- D. Choquet und A. Triller. The dynamic synapse. *Neuron*, 80(3):691–703, 2013.
- J. Cichon und W. B. Gan. Branch-specific dendritic Ca(2+) spikes cause persistent synaptic plasticity. *Nature*, 520(7546):180–5, 2015.
- G. Cox und C. J. Sheppard. Practical limits of resolution in confocal and non-linear microscopy. *Microsc Res Tech*, 63(1):18–22, 2004.
- A. M. Craig und Y. Kang. Neurexin-neuroligin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol*, 17(1):43–52, 2007.
- S. E. Crowe und G. C. Ellis-Davies. Longitudinal in vivo two-photon fluorescence imaging. *J Comp Neurol*, 522(8):1708–27, 2014.
- M. E. Dailey und S. J. Smith. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *The Journal of neuroscience*, 16(9):2983–2994, 1996.

- M. B. Dalva, M. A. Takasu, M. Z. Lin, S. M. Shamah, L. Hu, N. W. Gale, und M. E. Greenberg. EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell*, 103(6):945–56, 2000.
- M. B. Dalva, A. C. McClelland, und M. S. Kayser. Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nat Rev Neurosci*, 8(3):206–20, 2007.
- G. W. Davis, C. M. Schuster, und C. S. Goodman. Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: target-derived Fasciclin II regulates the pattern of synapse formation. *Neuron*, 19(3):561–73, 1997.
- C. Dean, F. G. Scholl, J. Choih, S. DeMaria, J. Berger, E. Isacoff, und P. Scheiffele. Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat Neurosci*, 6(7):708–16, 2003.
- W. Denk, J. H. Strickler, und W. W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951):73–6, 1990.
- R. J. Douglas und K. A. Martin. Mapping the matrix: the ways of neocortex. *Neuron*, 56(2):226–38, 2007.
- P. J. Drew, A. Y. Shih, J. D. Driscoll, P. M. Knutsen, P. Blinder, D. Davalos, K. Akassoglou, P. S. Tsai, und D. Kleinfeld. Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull. *Nat Methods*, 7(12):981–4, 2010.
- I. Ehrlich, M. Klein, S. Rumpel, und R. Malinow. PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(10):4176–4181, 2007.
- A. E.-D. El-Husseini, E. Schnell, D. M. Chetkovich, R. A. Nicoll, und D. S. Brecht. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*, 290(5495):1364–1368, 2000.
- G. Feng, R. H. Mellor, M. Bernstein, C. Keller-Peck, Q. T. Nguyen, M. Wallace, J. M. Nerbonne, J. W. Lichtman, und J. R. Sanes. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*, 28(1):41–51, 2000.

-
- J. C. Fiala, M. Feinberg, V. Popov, und K. M. Harris. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci*, 18(21):8900–11, 1998.
- J. C. Fiala, J. Spacek, und K. M. Harris. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev*, 39(1):29–54, 2002.
- M. Fischer, S. Kaech, D. Knutti, und A. Matus. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*, 20(5):847–54, 1998.
- A. I. Fogel, M. R. Akins, A. J. Krupp, M. Stagi, V. Stein, und T. Biederer. SynCAMs organize synapses through heterophilic adhesion. *J Neurosci*, 27(46):12516–30, 2007.
- A. I. Fogel, Y. Li, J. Giza, Q. Wang, T. T. Lam, Y. Modis, und T. Biederer. N-glycosylation at the SynCAM (synaptic cell adhesion molecule) immunoglobulin interface modulates synaptic adhesion. *J Biol Chem*, 285(45):34864–74, 2010.
- A. I. Fogel, M. Stagi, K. Perez de Arce, und T. Biederer. Lateral assembly of the immunoglobulin protein SynCAM 1 controls its adhesive function and instructs synapse formation. *EMBO J*, 30(23):4728–38, 2011.
- C. Francks, S. Maegawa, J. Lauren, B. S. Abrahams, A. Velayos-Baeza, S. E. Medland, S. Colella, M. Groszer, E. Z. McAuley, T. M. Caffrey, T. Timmusk, P. Pruunsild, I. Koppel, P. A. Lind, N. Matsumoto-Itaba, J. Nicod, L. Xiong, R. Jooper, W. Enard, B. Krinsky, E. Nanba, A. J. Richardson, B. P. Riley, N. G. Martin, S. M. Strittmatter, H. J. Moller, D. Rujescu, D. St Clair, P. Muglia, J. L. Roos, S. E. Fisher, R. Wade-Martins, G. A. Rouleau, J. F. Stein, M. Karayiorgou, D. H. Geschwind, J. Ragoussis, K. S. Kendler, M. S. Airaksinen, M. Oshimura, L. E. DeLisi, und A. P. Monaco. LRRTM1 on chromosome 2p12 is a maternally suppressed gene that is associated paternally with handedness and schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 12(12):1129–39, 1057, 2007.
- N. P. Franks und W. R. Lieb. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*, 367(6464):607–14, 1994.

- J. A. Frei und E. T. Stoeckli. SynCAMs extend their functions beyond the synapse. *Eur J Neurosci*, 39(11):1752–60, 2014.
- M. Fu und Y. Zuo. Experience-dependent structural plasticity in the cortex. *Trends Neurosci*, 34(4):177–87, 2011.
- M. Fu, X. Yu, J. Lu, und Y. Zuo. Repetitive motor learning induces coordinated formation of clustered dendritic spines in vivo. *Nature*, 483(7387):92–5, 2012.
- E. Fujita, Y. Kouroku, S. Ozeki, Y. Tanabe, Y. Toyama, M. Maekawa, N. Kojima, H. Senoo, K. Toshimori, und T. Momoi. Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking RA175/TSLC1/SynCAM/IGSF4A, a cell adhesion molecule in the immunoglobulin superfamily. *Mol Cell Biol*, 26(2):718–26, 2006.
- C. D. Gilbert und M. Sigman. Brain states: top-down influences in sensory processing. *Neuron*, 54(5):677–96, 2007.
- A. L. Goldberg und J. F. Dice. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Annu Rev Biochem*, 43(0):835–69, 1974.
- S. N. Gomperts. Clustering membrane proteins: it’s all coming together with the PSD-95/SAP90 protein family. *Cell*, 84(5):659–662, 1996.
- J. A. Gordon und M. P. Stryker. Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse. *J Neurosci*, 16(10):3274–86, 1996.
- M. Gossen und H. Bujard. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(12):5547–51, 1992.
- M. Göppert-Mayer. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik*, 401(3):273–294, 1931.
- A. Grinvald, E. Lieke, R. D. Frostig, C. D. Gilbert, und T. N. Wiesel. Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature*, 324(6095):361–4, 1986.

-
- A. Grunditz, N. Holbro, L. Tian, Y. Zuo, and T. G. Oertner. Spine neck plasticity controls postsynaptic calcium signals through electrical compartmentalization. *J Neurosci*, 28(50):13457–66, 2008.
- I. C. Grunwald, M. Korte, D. Wolfer, G. A. Wilkinson, K. Unsicker, H. P. Lipp, T. Bonhoeffer, and R. Klein. Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 32(6):1027–40, 2001.
- J. Grutzendler, N. Kasthuri, and W. B. Gan. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, 420(6917):812–6, 2002.
- K. M. Harris und S. B. Kater. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci*, 17:341–71, 1994.
- K. M. Harris, F. E. Jensen, und B. Tsao. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci*, 12(7):2685–705, 1992.
- S. Hasegawa, S. Sakuragi, K. Tominaga-Yoshino, und A. Ogura. Dendritic spine dynamics leading to spine elimination after repeated inductions of LTD. *Sci Rep*, 5:7707, 2015.
- Y. Hata, S. Butz, und T. C. Sudhof. CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuroligins. *J Neurosci*, 16(8):2488–94, 1996.
- T. Hayama, J. Noguchi, S. Watanabe, N. Takahashi, A. Hayashi-Takagi, G. C. Ellis-Davies, M. Matsuzaki, und H. Kasai. GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local Ca²⁺ signaling. *Nat Neurosci*, 16(10):1409–16, 2013.
- F. Helmchen und W. Denk. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods*, 2(12):932–40, 2005.

- J. T. Henderson, J. Georgiou, Z. Jia, J. Robertson, S. Elowe, J. C. Roder, and T. Pawson. The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. *Neuron*, 32(6):1041–56, 2001.
- M. Henkemeyer, O. S. Itkis, M. Ngo, P. W. Hickmott, and I. M. Ethell. Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol*, 163(6):1313–26, 2003.
- H. Hering und M. Sheng. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci*, 2(12):880–8, 2001.
- S. B. Hofer und T. Bonhoeffer. Dendritic Spines: The Stuff That Memories Are Made Of? *Curr Biol*, 20(4):R154–7, 2010.
- S. B. Hofer, T. D. Mrsic-Flogel, T. Bonhoeffer, und M. Hubener. Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature*, 457(7227):313–7, 2009.
- A. Holtmaat und K. Svoboda. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci*, 10(9):647–58, 2009.
- A. Holtmaat, L. Wilbrecht, G. W. Knott, E. Welker, und K. Svoboda. Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature*, 441(7096):979–83, 2006.
- A. Holtmaat, T. Bonhoeffer, D. K. Chow, J. Chuckowree, V. De Paola, S. B. Hofer, M. Hubener, T. Keck, G. Knott, W. C. Lee, R. Mostany, T. D. Mrsic-Flogel, E. Nedivi, C. Portera-Cailliau, K. Svoboda, J. T. Trachtenberg, und L. Wilbrecht. Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nat Protoc*, 4(8):1128–44, 2009.
- A. J. Holtmaat, J. T. Trachtenberg, L. Wilbrecht, G. M. Shepherd, X. Zhang, G. W. Knott, und K. Svoboda. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron*, 45(2):279–91, 2005.

-
- D. H. Hubel und T. N. Wiesel. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *The Journal of physiology*, 160(1):106, 1962.
- D. H. Hubel und T. N. Wiesel. Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. *The Journal of physiology*, 195(1):215–243, 1968.
- K. Ichtchenko, Y. Hata, T. Nguyen, B. Ullrich, M. Missler, C. Moomaw, und T. C. Sudhof. Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell*, 81(3):435–43, 1995.
- M. Irie, Y. Hata, M. Takeuchi, K. Ichtchenko, A. Toyoda, K. Hirao, Y. Takai, T. W. Rosahl, und T. C. Sudhof. Binding of neuroligins to PSD-95. *Science*, 277(5331):1511–5, 1997.
- H. Jia, N. L. Rochefort, X. Chen, und A. Konnerth. Dendritic organization of sensory input to cortical neurons in vivo. *Nature*, 464(7293):1307–12, 2010.
- B. Joachimsthaler, D. Brugger, A. Skodras, und C. Schwarz. Spine Loss in Primary Somatosensory Cortex during Trace Eyeblink Conditioning. *J Neurosci*, 35(9):3772–81, 2015.
- J. D. Jontes und S. J. Smith. Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. *Neuron*, 27(1):11–4, 2000.
- C. K. Jung und J. Herms. Structural Dynamics of Dendritic Spines are Influenced by an Environmental Enrichment: An In Vivo Imaging Study. *Cereb Cortex*, 2012.
- K. Jungling, V. Eulenburg, R. Moore, R. Kemler, V. Lessmann, und K. Gottmann. N-cadherin transsynaptically regulates short-term plasticity at glutamatergic synapses in embryonic stem cell-derived neurons. *J Neurosci*, 26(26):6968–78, 2006.
- H. Kasai, M. Matsuzaki, J. Noguchi, N. Yasumatsu, und H. Nakahara. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci*, 26(7):360–8, 2003.
- M. S. Kayser, A. C. McClelland, E. G. Hughes, und M. B. Dalva. Intracellular and trans-synaptic regulation of glutamatergic synaptogenesis by EphB receptors. *J Neurosci*, 26(47):12152–64, 2006.

- T. Keck, T. D. Mrsic-Flogel, M. Vaz Afonso, U. T. Eysel, T. Bonhoeffer, und M. Hubener. Massive restructuring of neuronal circuits during functional reorganization of adult visual cortex. *Nat Neurosci*, 11(10):1162–7, 2008.
- M. B. Kennedy. Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science*, 290(5492):750–4, 2000.
- J. Kim, S. Y. Jung, Y. K. Lee, S. Park, J. S. Choi, C. J. Lee, H. S. Kim, Y. B. Choi, P. Scheiffele, C. H. Bailey, E. R. Kandel, und J. H. Kim. Neuroligin-1 is required for normal expression of LTP and associative fear memory in the amygdala of adult animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(26):9087–92, 2008.
- S. Kim, A. Burette, H. S. Chung, S. K. Kwon, J. Woo, H. W. Lee, K. Kim, H. Kim, R. J. Weinberg, und E. Kim. NGL family PSD-95-interacting adhesion molecules regulate excitatory synapse formation. *Nat Neurosci*, 9(10):1294–301, 2006.
- G. W. Knott, A. Holtmaat, L. Wilbrecht, E. Welker, und K. Svoboda. Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci*, 9(9):1117–24, 2006.
- J. Ko und E. Kim. Leucine-rich repeat proteins of synapses. *J Neurosci Res*, 85(13):2824–32, 2007a.
- J. Ko und E. Kim. Leucine-rich repeat proteins of synapses. *J Neurosci Res*, 85(13):2824–32, 2007b.
- J. Ko, S. Kim, H. S. Chung, K. Kim, K. Han, H. Kim, H. Jun, B. K. Kaang, und E. Kim. SALM synaptic cell adhesion-like molecules regulate the differentiation of excitatory synapses. *Neuron*, 50(2):233–45, 2006.
- H.-C. Kornau, L. T. Schenker, M. B. Kennedy, und P. H. Seeburg. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, 269(5231):1737–1740, 1995.

-
- D. D. Krueger, L. P. Tuffy, T. Papadopoulos, und N. Brose. The role of neurexins and neuroligins in the formation, maturation, and function of vertebrate synapses. *Curr Opin Neurobiol*, 22(3):412–22, 2012.
- S. J. Kuhlman, D. H. O’Connor, K. Fox, und K. Svoboda. Structural plasticity within the barrel cortex during initial phases of whisker-dependent learning. *J Neurosci*, 34(17):6078–83, 2014.
- K. Kullander und R. Klein. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(7):475–86, 2002.
- H. B. Kwon und B. L. Sabatini. Glutamate induces de novo growth of functional spines in developing cortex. *Nature*, 474(7349):100–4, 2011.
- H. B. Kwon, Y. Kozorovitskiy, W. J. Oh, R. T. Peixoto, N. Akhtar, J. L. Saulnier, C. Gu, und B. L. Sabatini. Neuroligin-1-dependent competition regulates cortical synaptogenesis and synapse number. *Nat Neurosci*, 15(12):1667–74, 2012.
- G. L. G. La Salle, J. Robert, S. Berrard, V. Ridoux, L. Stratford-Perricaudet, M. Perricaudet, und J. Mallet. An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science*, 259(5097):988–990, 1993.
- C. S. Lai, T. F. Franke, und W. B. Gan. Opposite effects of fear conditioning and extinction on dendritic spine remodelling. *Nature*, 483(7387):87–91, 2012.
- J. Lauren, M. S. Airaksinen, M. Saarma, und T. Timmusk. A novel gene family encoding leucine-rich repeat transmembrane proteins differentially expressed in the nervous system. *Genomics*, 81(4):411–21, 2003.
- S. H. Lee und M. Sheng. Development of neuron-neuron synapses. *Curr Opin Neurobiol*, 10(1):125–31, 2000.
- W. C. Lee, J. L. Chen, H. Huang, J. H. Leslie, Y. Amitai, P. T. So, und E. Nedivi. A dynamic

- zone defines interneuron remodeling in the adult neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(50):19968–73, 2008.
- B. Lendvai, E. A. Stern, B. Chen, und K. Svoboda. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature*, 404(6780):876–81, 2000.
- J. N. Levinson und A. El-Husseini. Building excitatory and inhibitory synapses: balancing neuroligin partnerships. *Neuron*, 48(2):171–4, 2005.
- J. W. Lichtman und H. Colman. Synapse elimination and indelible memory. *Neuron*, 25(2):269–78, 2000.
- M. W. Linhoff, J. Lauren, R. M. Cassidy, F. A. Dobie, H. Takahashi, H. B. Nygaard, M. S. Airaksinen, S. M. Strittmatter, und A. M. Craig. An unbiased expression screen for synaptogenic proteins identifies the LRRTM protein family as synaptic organizers. *Neuron*, 61(5):734–49, 2009.
- C. Luscher, R. A. Nicoll, R. C. Malenka, und D. Muller. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci*, 3(6):545–50, 2000.
- A. W. Lyckman, S. Horng, C. A. Leamey, D. Tropea, A. Watakabe, A. Van Wart, C. McCurry, T. Yamamori, und M. Sur. Gene expression patterns in visual cortex during the critical period: synaptic stabilization and reversal by visual deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(27):9409–14, 2008.
- A. Majewska und M. Sur. Motility of dendritic spines in visual cortex in vivo: changes during the critical period and effects of visual deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(26):16024–9, 2003.
- A. K. Majewska, J. R. Newton, und M. Sur. Remodeling of synaptic structure in sensory cortical areas in vivo. *J Neurosci*, 26(11):3021–9, 2006.

-
- M. Maletic-Savatic. Rapid Dendritic Morphogenesis in CA1 Hippocampal Dendrites Induced by Synaptic Activity. *Science*, 283(5409):1923–1927, 1999.
- J. Mariani, F. Crepel, K. Mikoshiba, J. P. Changeux, and C. Sotelo. Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from Reeler mutant mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 281(978):1–28, 1977.
- P. Maurel, S. Einheber, J. Galinska, P. Thaker, I. Lam, M. B. Rubin, S. S. Scherer, Y. Murakami, D. H. Gutmann, and J. L. Salzer. Nectin-like proteins mediate axon Schwann cell interactions along the internode and are essential for myelination. *J Cell Biol*, 178(5):861–74, 2007.
- M. Mayford, M. E. Bach, Y. Y. Huang, L. Wang, R. D. Hawkins, and E. R. Kandel. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science*, 274(5293):1678–83, 1996.
- M. Miller und A. Peters. Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *J Comp Neurol*, 203(4):555–73, 1981.
- A. Miquelajauregui, S. Kribakaran, R. Mostany, A. Badaloni, G. G. Consalez, und C. Portera-Cailliau. Layer 4 pyramidal neurons exhibit robust dendritic spine plasticity in vivo after input deprivation. *J Neurosci*, 35(18):7287–94, 2015.
- M. Missler und T. C. Sudhof. Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genet*, 14(1):20–6, 1998.
- M. Missler, W. Zhang, A. Rohlmann, G. Kattenstroth, R. E. Hammer, K. Gottmann, und T. C. Sudhof. Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature*, 423(6943):939–48, 2003.
- M. Missler, T. C. Sudhof, und T. Biederer. Synaptic cell adhesion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(4):a005694, 2012.

- A. Mizoguchi, H. Nakanishi, K. Kimura, K. Matsubara, K. Ozaki-Kuroda, T. Katata, T. Honda, Y. Kiyohara, K. Heo, M. Higashi, T. Tsutsumi, S. Sonoda, C. Ide, und Y. Takai. Nectin: an adhesion molecule involved in formation of synapses. *J Cell Biol*, 156(3):555–65, 2002.
- K. E. Moczulska, J. Tinter-Thiede, M. Peter, L. Ushakova, T. Wernle, B. Bathellier, und S. Rumpel. Dynamics of dendritic spines in the mouse auditory cortex during memory formation and memory recall. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(45):18315–20, 2013.
- R. Mostany, J. E. Anstey, K. L. Crump, B. Maco, G. Knott, und C. Portera-Cailliau. Altered synaptic dynamics during normal brain aging. *J Neurosci*, 33(9):4094–104, 2013.
- T. D. Mrsic-Flogel, S. B. Hofer, K. Ohki, R. C. Reid, T. Bonhoeffer, und M. Hubener. Homeostatic regulation of eye-specific responses in visual cortex during ocular dominance plasticity. *Neuron*, 54(6):961–72, 2007.
- D. Muller, C. Wang, G. Skibo, N. Toni, H. Cremer, V. Calaora, G. Rougon, und J. Z. Kiss. PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron*, 17(3):413–22, 1996.
- H. Murakoshi und R. Yasuda. Postsynaptic signaling during plasticity of dendritic spines. *Trends Neurosci*, 35(2):135–43, 2012.
- U. V. Nagerl, N. Eberhorn, S. B. Cambridge, und T. Bonhoeffer. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*, 44(5):759–67, 2004.
- U. V. Nagerl, G. Kostinger, J. C. Anderson, K. A. Martin, und T. Bonhoeffer. Protracted synaptogenesis after activity-dependent spinogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 27(30):8149–56, 2007.
- V. Niederkofler, T. Baeriswyl, R. Ott, und E. T. Stoeckli. Nectin-like molecules/SynCAMs are required for post-crossing commissural axon guidance. *Development*, 137(3):427–35, 2010.

- E. A. Nimchinsky, B. L. Sabatini, und K. Svoboda. Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol*, 64:313–53, 2002.
- M. Oheim, E. Beaurepaire, E. Chaigneau, J. Mertz, und S. Charpak. Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth. *J Neurosci Methods*, 111(1):29–37, 2001.
- S. Oray, A. Majewska, und M. Sur. Dendritic spine dynamics are regulated by monocular deprivation and extracellular matrix degradation. *Neuron*, 44(6):1021–30, 2004.
- F. Pan und W. B. Gan. Two-photon imaging of dendritic spine development in the mouse cortex. *Dev Neurobiol*, 68(6):771–8, 2008.
- P. Penzes, A. Beeser, J. Chernoff, M. R. Schiller, B. A. Eipper, R. E. Mains, und R. L. Huganir. Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron*, 37(2):263–74, 2003.
- P. Penzes, M. E. Cahill, K. A. Jones, J. E. VanLeeuwen, und K. M. Woolfrey. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 14(3):285–93, 2011.
- M. Phillips und L. Pozzo-Miller. Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders. *Neurosci Lett*, 2015.
- L. Polo-Parada, C. M. Bose, F. Plattner, und L. T. Landmesser. Distinct roles of different neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in synaptic maturation revealed by analysis of NCAM 180 kDa isoform-deficient mice. *J Neurosci*, 24(8):1852–64, 2004.
- T. A. Pologruto, B. L. Sabatini, und K. Svoboda. ScanImage: flexible software for operating laser scanning microscopes. *Biomed Eng Online*, 2:13, 2003.
- P. Rakic und R. L. Sidman. Organization of cerebellar cortex secondary to deficit of granule cells in weaver mutant mice. *J Comp Neurol*, 152(2):133–61, 1973.

- P. Rakic, J. P. Bourgeois, M. F. Eckenhoff, N. Zecevic, und P. S. Goldman-Rakic. Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Science*, 232 (4747):232–5, 1986.
- P. Rakic, J.-P. Bourgeois, und P. S. Goldman-Rakic. Synaptic development of the cerebral cortex: implications for learning, memory, and mental illness. *Progress in brain research*, 102:227, 1994.
- A. C. Rapraeger. Syndecan-regulated receptor signaling. *J Cell Biol*, 149(5):995–8, 2000.
- J. Renart, J. Reiser, und G. R. Stark. Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(7):3116–20, 1979.
- E. M. Robbins, A. J. Krupp, K. Perez de Arce, A. K. Ghosh, A. I. Fogel, A. Boucard, T. C. Sudhof, V. Stein, und T. Biederer. SynCAM 1 adhesion dynamically regulates synapse number and impacts plasticity and learning. *Neuron*, 68(5):894–906, 2010.
- T. F. Roberts, K. A. Tschida, M. E. Klein, und R. Mooney. Rapid spine stabilization and synaptic enhancement at the onset of behavioural learning. *Nature*, 463(7283):948–52, 2010.
- P. Rubio-Garrido, F. Perez-de Manzo, C. Porrero, M. J. Galazo, und F. Clasca. Thalamic input to distal apical dendrites in neocortical layer 1 is massive and highly convergent. *Cereb Cortex*, 19(10):2380–95, 2009.
- U. Rudolph und B. Antkowiak. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci*, 5(9):709–20, 2004.
- T. Saito. In vivo electroporation in the embryonic mouse central nervous system. *Nat Protoc*, 1(3):1552–8, 2006.
- T. Saito und N. Nakatsuji. Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. *Dev Biol*, 240(1):237–46, 2001.

-
- C. Sala und M. Segal. Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiol Rev*, 94(1):141–88, 2014.
- Y. Sara, T. Biederer, D. Atasoy, A. Chubykin, M. G. Mozhayeva, T. C. Sudhof, und E. T. Kavalali. Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly. *J Neurosci*, 25(1):260–70, 2005.
- P. Scheiffele, J. Fan, J. Choih, R. Fetter, und T. Serafini. Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*, 101(6):657–69, 2000.
- D. Schmucker, J. C. Clemens, H. Shu, C. A. Worby, J. Xiao, M. Muda, J. E. Dixon, und S. L. Zipursky. Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell*, 101(6):671–84, 2000.
- E. Schnell, M. Sizemore, S. Karimzadegan, L. Chen, D. S. Brecht, und R. A. Nicoll. Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(21):13902–7, 2002.
- D. Schreiner und J. A. Weiner. Combinatorial homophilic interaction between gamma-protocadherin multimers greatly expands the molecular diversity of cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(33):14893–8, 2010.
- V. Schubert, D. Lebrecht, und A. Holtmaat. Peripheral deafferentation-driven functional somatosensory map shifts are associated with local, not large-scale dendritic structural plasticity. *J Neurosci*, 33(22):9474–87, 2013.
- A. S. Shai, C. A. Anastassiou, M. E. Larkum, und C. Koch. Physiology of layer 5 pyramidal neurons in mouse primary visual cortex: coincidence detection through bursting. *PLoS Comput Biol*, 11(3):e1004090, 2015.
- L. Shapiro und D. R. Colman. The diversity of cadherins and implications for a synaptic adhesive code in the CNS. *Neuron*, 23(3):427–30, 1999.

- K. Shen und P. Scheiffele. Genetics and cell biology of building specific synaptic connectivity. *Annu Rev Neurosci*, 33:473–507, 2010.
- C. Sheppard und M. Gu. Image formation in two-photon fluorescence microscopy. *Optik*, 86(3):104–106, 1990.
- P. J. Sjöström und M. Häusser. A cooperative switch determines the sign of synaptic plasticity in distal dendrites of neocortical pyramidal neurons. *Neuron*, 51(2):227–38, 2006.
- C. Sotelo. Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from mutant mice. II. Morphological study of cerebellar cortical neurons and circuits in the weaver mouse. *Brain Res*, 94(1):19–44, 1975.
- I. Spiegel, K. Adamsky, Y. Eshed, R. Milo, H. Sabanay, O. Sarig-Nadir, I. Horresh, S. S. Scherer, M. N. Rasband, und E. Peles. A central role for Necl4 (SynCAM4) in Schwann cell-axon interaction and myelination. *Nat Neurosci*, 10(7):861–9, 2007.
- A. Stan, K. N. Pielarski, T. Brigadski, N. Wittenmayer, O. Fedorchenko, A. Gohla, V. Lessmann, T. Dresbach, und K. Gottmann. Essential cooperation of N-cadherin and neuroligin-1 in the transsynaptic control of vesicle accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(24):11116–21, 2010.
- V. Stein, D. R. House, D. S. Brecht, und R. A. Nicoll. Postsynaptic density-95 mimics and occludes hippocampal long-term potentiation and enhances long-term depression. *J Neurosci*, 23(13):5503–6, 2003.
- T. C. Südhof. Neuroligins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, 455(7215):903–11, 2008.
- S. Sultan, E. Gebara, und N. Toni. Doxycycline increases neurogenesis and reduces microglia in the adult hippocampus. *Front Neurosci*, 7:131, 2013.
- H. Tabata und K. Nakajima. Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse

-
- brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience*, 103(4):865–72, 2001.
- M. Takeichi. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nat Rev Neurosci*, 8(1):11–20, 2007.
- H. Tanaka, W. Shan, G. R. Phillips, K. Arndt, O. Bozdagi, L. Shapiro, G. W. Huntley, D. L. Benson, and D. R. Colman. Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity. *Neuron*, 25(1):93–107, 2000.
- H. Taniguchi, L. Gollan, F. G. Scholl, V. Mahadomrongkul, E. Dobler, N. Limthong, M. Peck, C. Aoki, and P. Scheiffele. Silencing of neuroligin function by postsynaptic neuroligins. *J Neurosci*, 27(11):2815–24, 2007.
- L. A. Thomas, M. R. Akins, and T. Biederer. Expression and adhesion profiles of SynCAM molecules indicate distinct neuronal functions. *J Comp Neurol*, 510(1):47–67, 2008.
- A. M. Thomson und A. P. Bannister. Interlaminar connections in the neocortex. *Cereb Cortex*, 13(1):5–14, 2003.
- H. Togashi, K. Abe, A. Mizoguchi, K. Takaoka, O. Chisaka, and M. Takeichi. Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron*, 35(1):77–89, 2002.
- H. Togashi, J. Miyoshi, T. Honda, T. Sakisaka, Y. Takai, and M. Takeichi. Interneurite affinity is regulated by heterophilic nectin interactions in concert with the cadherin machinery. *J Cell Biol*, 174(1):141–51, 2006.
- H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9):4350–4, 1979.
- J. T. Trachtenberg, B. E. Chen, G. W. Knott, G. Feng, J. R. Sanes, E. Welker, and K. Svoboda. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, 420(6917):788–94, 2002.

- T. Uemura, S. J. Lee, M. Yasumura, T. Takeuchi, T. Yoshida, M. Ra, R. Taguchi, K. Sakimura, und M. Mishina. Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum. *Cell*, 141(6):1068–79, 2010.
- H. van Praag, G. Kempermann, und F. H. Gage. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*, 1(3):191–8, 2000.
- D. van Versendaal, R. Rajendran, M. H. Saiepour, J. Klooster, L. Smit-Rigter, J. P. Sommeijer, C. I. De Zeeuw, S. B. Hofer, J. A. Heimel, und C. N. Levelt. Elimination of inhibitory synapses is a major component of adult ocular dominance plasticity. *Neuron*, 74(2):374–83, 2012.
- F. Varoqueaux, G. Aramuni, R. L. Rawson, R. Mohrmann, M. Missler, K. Gottmann, W. Zhang, T. C. Sudhof, und N. Brose. Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron*, 51(6):741–54, 2006.
- C. L. Waites, A. M. Craig, und C. C. Garner. Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu Rev Neurosci*, 28:251–74, 2005.
- C. Y. Wang, K. Chang, R. S. Petralia, Y. X. Wang, G. K. Seabold, und R. J. Wenthold. A novel family of adhesion-like molecules that interacts with the NMDA receptor. *J Neurosci*, 26(8):2174–83, 2006.
- J. Wang, Y. Zhang, T. Xu, Q. Luo, und D. Zhu. An innovative transparent cranial window based on skull optical clearing. *Laser Physics Letters*, 9(6):469, 2012.
- P. Washbourne, A. Dityatev, P. Scheiffele, T. Biederer, J. A. Weiner, K. S. Christopherson, und A. El-Husseini. Cell adhesion molecules in synapse formation. *J Neurosci*, 24(42):9244–9, 2004.
- C. J. Wierenga, N. Becker, und T. Bonhoeffer. GABAergic synapses are formed without the involvement of dendritic protrusions. *Nat Neurosci*, 11(9):1044–52, 2008.

-
- T. N. Wiesel und D. H. Hubel. Single-Cell Responses in Striate Cortex of Kittens Deprived of Vision in One Eye. *J Neurophysiol*, 26:1003–17, 1963.
- L. Wilbrecht, A. Holtmaat, N. Wright, K. Fox, und K. Svoboda. Structural plasticity underlies experience-dependent functional plasticity of cortical circuits. *J Neurosci*, 30(14):4927–32, 2010.
- J. Woo, S. K. Kwon, und E. Kim. The NGL family of leucine-rich repeat-containing synaptic adhesion molecules. *Mol Cell Neurosci*, 42(1):1–10, 2009.
- R. M. Wyatt, E. Tring, und J. T. Trachtenberg. Pattern and not magnitude of neural activity determines dendritic spine stability in awake mice. *Nat Neurosci*, 15(7):949–51, 2012.
- H. T. Xu, F. Pan, G. Yang, und W. B. Gan. Choice of cranial window type for in vivo imaging affects dendritic spine turnover in the cortex. *Nat Neurosci*, 10(5):549–51, 2007.
- J. Xu, N. Xiao, und J. Xia. Thrombospondin 1 accelerates synaptogenesis in hippocampal neurons through neuroligin 1. *Nat Neurosci*, 13(1):22–4, 2010.
- T. Xu, X. Yu, A. J. Perlik, W. F. Tobin, J. A. Zweig, K. Tennant, T. Jones, und Y. Zuo. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature*, 462(7275):915–9, 2009.
- J. Xue, G. Li, E. Bharucha, und N. G. Cooper. Developmentally regulated expression of CaMKII and iGluRs in the rat retina. *Brain Res Dev Brain Res*, 138(1):61–70, 2002.
- G. Yang und W. B. Gan. Sleep contributes to dendritic spine formation and elimination in the developing mouse somatosensory cortex. *Dev Neurobiol*, 72(11):1391–8, 2012.
- G. Yang, F. Pan, und W. B. Gan. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*, 462(7275):920–4, 2009.
- G. Yang, F. Pan, C. N. Parkhurst, J. Grutzendler, und W. B. Gan. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nat Protoc*, 5(2):201–8, 2010.

- G. Yang, P. C. Chang, A. Bekker, T. J. Blanck, and W. B. Gan. Transient effects of anesthetics on dendritic spines and filopodia in the living mouse cortex. *Anesthesiology*, 115(4):718–26, 2011.
- G. Yang, C. S. Lai, J. Cichon, L. Ma, W. Li, and W. B. Gan. Sleep promotes branch-specific formation of dendritic spines after learning. *Science*, 344(6188):1173–8, 2014.
- Y. Yoshihara, M. De Roo, and D. Muller. Dendritic spine formation and stabilization. *Curr Opin Neurobiol*, 19(2):146–53, 2009.
- R. Yuste. The discovery of dendritic spines by Cajal. *Front Neuroanat*, 9:18, 2015.
- R. Yuste und T. Bonhoeffer. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci*, 5(1):24–34, 2004.
- Y. Zhiling, E. Fujita, Y. Tanabe, T. Yamagata, T. Momoi, und M. Y. Momoi. Mutations in the gene encoding CADM1 are associated with autism spectrum disorder. *Biochem Biophys Res Commun*, 377(3):926–9, 2008.
- W. R. Zipfel, R. M. Williams, und W. W. Webb. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature biotechnology*, 21(11):1369–1377, 2003.
- K. Zito und V. N. Murthy. Dendritic spines. *Curr Biol*, 12(1):R5, 2002.
- N. E. Ziv und S. J. Smith. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*, 17(1):91–102, 1996.
- Y. Zuo, A. Lin, P. Chang, und W. B. Gan. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron*, 46(2):181–9, 2005a.
- Y. Zuo, G. Yang, E. Kwon, und W. B. Gan. Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature*, 436(7048):261–5, 2005b.

Anhang

Daten aus den Abbildungen

Tabelle 6.1: Daten aus Abbildung 4.1A

Zeit(d)	Flag/Aktin
0	$0,0 \pm 0,13$
1	$0,0 \pm 0,20$
3	$2,4 \pm 0,11$
7	$5,1 \pm 0,11$
14	$5,1 \pm 1,41$
21	$4,5 \pm 1,98$
28	$4,7 \pm 2,02$
Ktr.	$0,0 \pm 0,00$
n = 2	

Tabelle 6.2: Daten aus Abbildung 4.1B

Zeit(d)	Flag/Aktin
Ktr.	$0,0 \pm 0,00$
0	$6,6 \pm 0,36$
3	$4,4 \pm 2,44$
7	$2,1 \pm 1,44$
30	$0,0 \pm 0,48$
n = 2	

Tabelle 6.3: Daten aus Abbildung 4.3A

Zeit (d)	Überexpression Spines ($1/\mu\text{m}$)	Kontrolle Spines ($1/\mu\text{m}$)	p-Wert
0	$0,34 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,01$	0,5367
3	$0,34 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,02$	0,6094
6	$0,36 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,02$	0,2031
9	$0,39 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,02$	0,0310
12	$0,39 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,02$	0,0102
15	$0,39 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,02$	0,0108
18	$0,41 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,02$	0,0056
21	$0,42 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,02$	0,0003
n = 29 Dendriten von 7 Mäusen		n = 32 Dendriten von 8 Mäusen	

Tabelle 6.4: Daten aus Abbildung 4.3C

Zeit (d)	Überexpression Spines (1/ μm)	Kontrolle Spines (1/ μm)	p-Wert
3	0,10 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,1654
6	0,11 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,0021
9	0,13 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,0012
12	0,11 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,0030
15	0,12 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,0008
18	0,11 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,0051
21	0,12 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,0001
n = 29 Dendriten von 7 Mäusen		n = 32 Dendriten von 8 Mäusen	

Tabelle 6.5: Daten aus Abbildung 4.3D

Zeit (d)	Überexpression Spines (1/ μm)	Kontrolle Spines (1/ μm)	p-Wert
3	0,10 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,0966
6	0,09 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,1439
9	0,10 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,0960
12	0,11 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,0399
15	0,12 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,0000
18	0,10 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,0464
21	0,11 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,0820
n = 29 Dendriten von 7 Mäusen		n = 32 Dendriten von 8 Mäusen	

Tabelle 6.6: Daten aus Abbildung 4.4A

Zeit (d)	Überexpression Spines (1/ μm)	Kontrolle Spines (1/ μm)	p-Wert
3	0,24 \pm 0,02	0,24 \pm 0,01	0,8833
6	0,25 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01	0,8288
9	0,26 \pm 0,02	0,25 \pm 0,01	0,4730
12	0,28 \pm 0,02	0,24 \pm 0,01	0,1106
15	0,27 \pm 0,02	0,24 \pm 0,01	0,2050
18	0,29 \pm 0,02	0,24 \pm 0,02	0,0463
21	0,30 \pm 0,02	0,24 \pm 0,02	0,0141
n = 29 Dendriten von 7 Mäusen		n = 32 Dendriten von 8 Mäusen	

Tabelle 6.7: Daten aus Abbildung 4.4B

Zeit (d)	Überexpression Anteil stabiler Spines	Kontrolle Anteil stabiler Spines	p-Wert
3	0,70 ± 0,02	0,75 ± 0,02	0,1536
6	0,73 ± 0,02	0,76 ± 0,02	0,3671
9	0,72 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,4194
12	0,72 ± 0,02	0,73 ± 0,02	0,6973
15	0,69 ± 0,02	0,75 ± 0,01	0,0117
18	0,76 ± 0,02	0,76 ± 0,02	0,9226
21	0,74 ± 0,02	0,73 ± 0,02	0,7909
n = 29 Dendriten von 7 Mäusen		n = 32 Dendriten von 8 Mäusen	

Tabelle 6.8: Daten aus Abbildung 4.6A

Zeit (d)	Überexpression Spines (1/μm)	Kontrolle Spines (1/μm)	p-Wert
0	0,31 ± 0,02	0,32 ± 0,03	0,7090
30	0,42 ± 0,03	0,34 ± 0,04	0,0892
60	0,44 ± 0,03	0,35 ± 0,04	0,0550
93	0,47 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,0063
124	0,47 ± 0,03	0,33 ± 0,04	0,0076
162	0,46 ± 0,03	0,33 ± 0,04	0,0110
191	0,44 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,0494
n = 20 Dendriten von 5 Mäusen		n = 12 von 4 Mäusen	

Tabelle 6.9: Daten aus Abbildung 4.6B

Zeit (d)	Überexpression Spineumsatz	Kontrolle Spineumsatz	p-Wert
30	0,57 ± 0,03	0,39 ± 0,03	0,0007
60	0,41 ± 0,03	0,41 ± 0,04	0,9282
93	0,38 ± 0,02	0,35 ± 0,04	0,5510
124	0,34 ± 0,02	0,39 ± 0,04	0,2175
162	0,36 ± 0,02	0,39 ± 0,04	0,4259
191	0,33 ± 0,02	0,39 ± 0,03	0,0865
n = 20 Dendriten von 5 Mäusen		n = 12 von 4 Mäusen	

Tabelle 6.10: Daten aus Abbildung 4.6C

Zeit (d)	Überexpression Spines (1/ μm)	Kontrolle Spines (1/ μm)	p-Wert
30	0,23 \pm 0,02	0,14 \pm 0,02	0,0031
60	0,17 \pm 0,02	0,14 \pm 0,02	0,2099
93	0,18 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	0,0071
124	0,15 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02	0,1961
162	0,16 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02	0,2478
191	0,14 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,4710
n = 20 Dendriten von 5 Mäusen		n = 12 von 4 Mäusen	

Tabelle 6.11: Daten aus Abbildung 4.6D

Zeit (d)	Überexpression Spines (1/ μm)	Kontrolle Spines (1/ μm)	p-Wert
30	0,11 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02	0,7997
60	0,16 \pm 0,01	0,14 \pm 0,02	0,2901
93	0,14 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02	0,4679
124	0,15 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,2289
162	0,16 \pm 0,01	0,14 \pm 0,02	0,2476
191	0,16 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02	0,4356
n = 20 Dendriten von 5 Mäusen		n = 12 von 4 Mäusen	

Tabelle 6.12: Daten aus Abbildung 4.8A

Zeit (d)	Überexpression Spines (1/ μm)	Kontrolle Spines (1/ μm)	p-Wert
0	0,37 \pm 0,02	0,30 \pm 0,02	
3	0,37 \pm 0,02	0,30 \pm 0,02	
6	0,37 \pm 0,02	0,32 \pm 0,03	
9	0,37 \pm 0,02	0,30 \pm 0,02	
12	0,38 \pm 0,02	0,32 \pm 0,02	
15	0,40 \pm 0,02	0,31 \pm 0,02	
18	0,39 \pm 0,03	0,32 \pm 0,02	
21	0,39 \pm 0,02	0,31 \pm 0,02	
n = 27 Dendriten von 7 Mäusen		n = 21 Dendriten von 7 Mäusen	
< 0.0001			

Tabelle 6.13: Daten aus Abbildung 4.8B

Zeit (d)	Überexpression Spineumsatz	Kontrolle Spineumsatz	p-Wert
3	0,23 ± 0,02	0,28 ± 0,03	
6	0,20 ± 0,01	0,30 ± 0,03	
9	0,21 ± 0,01	0,26 ± 0,02	
12	0,20 ± 0,01	0,29 ± 0,02	
15	0,21 ± 0,02	0,24 ± 0,02	
18	0,17 ± 0,01	0,25 ± 0,02	
21	0,19 ± 0,01	0,26 ± 0,03	
n = 27 Dendriten von 7 Mäusen		n = 21 Dendriten von 7 Mäusen	0,0003

Tabelle 6.14: Daten aus Abbildung 4.8C

Zeit (d)	Überexpression Spines (1/μm)	Kontrolle Spines (1/μm)	p-Wert
3	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	
6	0,07 ± 0,00	0,09 ± 0,01	
9	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	
12	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	
15	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01	
18	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01	
21	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	
n = 27 Dendriten von 7 Mäusen		n = 21 Dendriten von 7 Mäusen	0,4489

Tabelle 6.15: Daten aus Abbildung 4.8D

Zeit (d)	Überexpression Spines (1/μm)	Kontrolle Spines (1/μm)	p-Wert
3	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	
6	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	
9	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	
12	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	
15	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	
18	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	
21	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	
n = 27 Dendriten von 7 Mäusen		n = 21 Dendriten von 7 Mäusen	0,1389

Tabelle 6.16: Daten aus Abbildung 4.9A

Zeit (d)	Überexpression Überlebensrate	Kontrolle Überlebensrate	p-Wert
0	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	
3	0,77 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,2774
6	0,68 ± 0,02	0,61 ± 0,03	0,0633
9	0,60 ± 0,02	0,54 ± 0,03	0,0664
12	0,56 ± 0,02	0,50 ± 0,03	0,0871
15	0,55 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,0219
18	0,52 ± 0,02	0,42 ± 0,03	0,0159
21	0,49 ± 0,02	0,39 ± 0,03	0,0075
n = 27 Dendriten von 7 Mäusen		n = 21 Dendriten von 7 Mäusen	

Tabelle 6.17: Daten aus Abbildung 4.9B

Zeit (d)	Überexpression Anteil stabiler Spines	Kontrolle Anteil stabiler Spines	p-Wert
3	0,77 ± 0,02	0,74 ± 0,02	
6	0,81 ± 0,01	0,73 ± 0,03	
9	0,79 ± 0,02	0,72 ± 0,02	
12	0,83 ± 0,01	0,75 ± 0,02	
15	0,82 ± 0,02	0,76 ± 0,02	
18	0,81 ± 0,01	0,77 ± 0,03	
21	0,82 ± 0,02	0,73 ± 0,03	
n = 27 Dendriten von 7 Mäusen		n = 21 Dendriten von 7 Mäusen	
			0,0002

Tabelle 6.18: Daten aus Abbildung 4.9C

Zeit (d)	Überexpression Überlebensrate neuer Spines	Kontrolle Überlebensrate neuer Spines	p-Wert
0	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	
3	0,54 ± 0,03	0,43 ± 0,03	0,0191
6	0,41 ± 0,03	0,32 ± 0,02	0,0109
9	0,34 ± 0,03	0,26 ± 0,02	0,0396
12	0,28 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,0474
n = 27 Dendriten von 7 Mäusen		n = 21 Dendriten von 7 Mäusen	

Tabelle 6.19: Daten aus Abbildung 4.9D

Überexpression Neue beständige / Alle neuen Spines	Kontrolle Neue beständige / Alle neuen Spines	p-Wert
0,28 ± 0,02	0,22 ± 0,02	
n = 27 Dendriten von 7 Mäusen	n = 21 Dendriten von 7 Mäusen	0,0474

Tabelle 6.20: Daten aus Abbildung 4.10A

Überexpression Anteil Filopodia-ähnliche Spines	Kontrolle Anteil Filopodia-ähnliche Spines	p-Wert
0,07 ± 0,01	0,13 ± 0,01	
n = 19 Dendriten von 6 Mäusen	n = 17 Dendriten von 6 Mäusen	0,0004

Tabelle 6.21: Daten aus Abbildung 4.10B

Messtage	Überexpression Anteil der Spines	Kontrolle Anteil der Spines	p-Wert
1	0,40 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,0228
2	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,5788
3	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,9264
4	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,4597
5	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,5588
6	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,9779
7	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,9637
8	0,21 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,0081
	n = 27 Dendriten von 7 Mäusen	n = 21 Dendriten von 7 Mäusen	

Tabelle 6.22: Daten aus Abbildung 4.12A

Zeit(d)	Knockout Spines (1/μm)	Kontrolle Spines (1/μm)	p-Wert
0	0,41 ± 0,03	0,49 ± 0,03	
3	0,41 ± 0,03	0,49 ± 0,02	
6	0,41 ± 0,03	0,49 ± 0,03	
9	0,40 ± 0,02	0,48 ± 0,02	
12	0,40 ± 0,02	0,47 ± 0,02	
15	0,40 ± 0,03	0,47 ± 0,02	
18	0,38 ± 0,02	0,46 ± 0,02	
21	0,39 ± 0,03	0,47 ± 0,02	
	n = 29 Dendriten von 5 Mäusen	n = 33 Dendriten von 5 Mäusen	< 0.0001

Tabelle 6.23: Daten aus Abbildung 4.12B

Zeit(d)	Knockout Spineumsatz	Kontrolle Spineumsatz	p-Wert
3	0,38 ± 0,02	0,24 ± 0,02	
6	0,35 ± 0,02	0,25 ± 0,01	
9	0,35 ± 0,03	0,23 ± 0,01	
12	0,35 ± 0,02	0,23 ± 0,02	
15	0,33 ± 0,02	0,21 ± 0,01	
18	0,32 ± 0,02	0,23 ± 0,02	
21	0,37 ± 0,03	0,21 ± 0,01	
n = 29 Dendriten von 5 Mäusen n = 33 Dendriten von 5 Mäusen			< 0.0001

Tabelle 6.24: Daten aus Abbildung 4.12C

Zeit(d)	Knockout Spines (1/μm)	Kontrolle Spines (1/μm)	p-Wert
3	0,15 ± 0,01	0,11 ± 0,01	
6	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	
9	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01	
12	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01	
15	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01	
18	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	
21	0,14 ± 0,01	0,10 ± 0,01	
n = 29 Dendriten von 5 Mäusen n = 33 Dendriten von 5 Mäusen			0,0006

Tabelle 6.25: Daten aus Abbildung 4.12D

Zeit(d)	Knockout Spines (1/μm)	Kontrolle Spines (1/μm)	p-Wert
3	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,01	
6	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,01	
9	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,01	
12	0,14 ± 0,01	0,10 ± 0,01	
15	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	
18	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,01	
21	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,01	
n = 29 Dendriten von 5 Mäusen n = 33 Dendriten von 5 Mäusen			< 0.0001

Tabelle 6.26: Daten aus Abbildung 4.13A

Zeit(d)	Knockout Überlebensrate	Kontrolle Überlebensrate	p-Wert
0	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	
3	0,64 ± 0,02	0,77 ± 0,02	< 0.0001
6	0,51 ± 0,02	0,65 ± 0,02	< 0.0001
9	0,44 ± 0,03	0,58 ± 0,02	0,0001
12	0,38 ± 0,03	0,53 ± 0,02	< 0.0001
15	0,35 ± 0,02	0,50 ± 0,02	< 0.0001
18	0,33 ± 0,02	0,47 ± 0,02	< 0.0001
21	0,30 ± 0,02	0,46 ± 0,02	< 0.0001
n = 29 Dendriten von 5 Mäusen		n = 33 Dendriten von 5 Mäusen	

Tabelle 6.27: Daten aus Abbildung 4.13B

Zeit(d)	Knockout Anteil stabiler Spines	Kontrolle Anteil stabiler Spines	p-Wert
3	0,64 ± 0,02	0,77 ± 0,02	
6	0,65 ± 0,02	0,76 ± 0,02	
9	0,65 ± 0,03	0,76 ± 0,01	
12	0,66 ± 0,02	0,77 ± 0,02	
15	0,67 ± 0,02	0,80 ± 0,02	
18	0,67 ± 0,02	0,77 ± 0,02	
21	0,65 ± 0,03	0,79 ± 0,02	
n = 29 Dendriten von 5 Mäusen		n = 33 Dendriten von 5 Mäusen	
< 0.0001			

Tabelle 6.28: Daten aus Abbildung 4.13C

Zeit(d)	Knockout Überlebensrate neuer Spines	Kontrolle Überlebensrate neuer Spines	p-Wert
0	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	
3	0,39 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,0151
6	0,25 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,0114
9	0,18 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,0033
12	0,13 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,0002
n = 29 Dendriten von 5 Mäusen		n = 33 Dendriten von 5 Mäusen	

Tabelle 6.29: Daten aus Abbildung 4.13D

Knockout	Kontrolle	p-Wert
Neue beständige / Alle neuen Spines	Neue beständige / Alle neuen Spines	
0,13 ± 0,02	0,22 ± 0,02	
n = 29 Dendriten von 5 Mäusen	n = 33 Dendriten von 5 Mäusen	0,0002

Tabelle 6.30: Daten aus Abbildung 4.14A

Knockout	Kontrolle	p-Wert
Anteil Filopodia-ähnliche Spines	Anteil Filopodia-ähnliche Spines	
0,18 ± 0,01	0,08 ± 0,01	
n = 26 Dendriten von 5 Mäusen	n = 30 Dendriten von 5 Mäusen	< 0.0001

Tabelle 6.31: Daten aus Abbildung 4.14B

Messtage	Knockout	Kontrolle	p-Wert
	Anteil der Spines	Anteil der Spines	
1	0,57 ± 0,01	0,42 ± 0,01	< 0.0001
2	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,4963
3	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,0549
4	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,5273
5	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,0033
6	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,0063
7	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,7923
8	0,10 ± 0,01	0,21 ± 0,01	< 0.0001
	n = 29 Dendriten von 5 Mäusen	n = 33 Dendriten von 5 Mäusen	

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gebührt Prof. Valentin Stein, weil er mir die Arbeit in seiner Gruppe ermöglicht hat. Insbesondere die Hilfe beim Programmieren und der Konstruktion des Zwei-Photonen-Mikroskops sowie kritische Diskussionen der Ergebnisse haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Die Zusammenarbeit fand dabei stets in kollegialer Atmosphäre statt.

Prof. Walter Witke danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die damit verbundene Beaufsichtigung und Betreuung meiner wissenschaftlichen Arbeit. Bei Prof. Michael Hofmann und Prof. Alf Lamprecht bedanke ich mich für ihre Mitgliedschaft in der Promotionskommission. Herrn Prof. Swandulla danke ich, dass ich meine Arbeit am Institut für Physiologie II durchführen konnte.

Weiterhin möchte ich Prof. Thomas Biederer für die die Bereitstellung der Tiere sowie eine hilfreiche Diskussion der Ergebnisse danken.

Für die freundliche und erfolgreiche Zusammenarbeit mit der Werkstatt möchte ich mich bei Herrn Detlef Forst und Herrn Horst Gemein bedanken. Alle Bauteile wurden immer schnell und zuverlässig angefertigt, auch wenn meine Zeichnungen vor allem zu Beginn noch etwas uneindeutig waren.

Dorit danke ich vielmals für ihre Hilfe bei der Zucht und Versorgung der Tiere.

Für Korrekturen und kritische Kommentare zur Arbeit bin ich Marisa, Michael und meinen Eltern besonders dankbar.

Allen Mitgliedern des Instituts danke ich für die nette Aufnahme und die gute Zusammenarbeit.

Den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Marisa, Dorit, Michael, Marina, Ulf und Ira möchte ich herzlich für die Unterstützung und das freundliche Miteinander danken. Ich hatte eine schöne Zeit und hab die Arbeit mit euch sehr genossen.

Mein speziellen Dank für die Zeit auch außerhalb der Arbeit und ihre Freundschaft möchte ich Marisa, Dorit, Ira, Riad und André aussprechen.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern für die Unterstützung in jeder Lebenslage.