



**Die Ultrastruktur von Aktiven Zonen
in hippocampalen Moosfaserboutons**

The ultrastructure of active zones
in hippocampal mossy fiber boutons

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Neurowissenschaften

vorgelegt von

Katharina Lichter

aus

München

Würzburg 2022



Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto

1. Betreuerin: Prof. Dr. Anna-Leena Sirén, MD PhD

2. Betreuerin: Prof. Dr. med. Esther Asan

3. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Christian Stigloher

4. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Markus Sauer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Meinen Großeltern

“At each stage I reach a balance, a conclusion. At the next sitting, if I find that there is a weakness in the whole, I make my way back into the picture by means of the weakness – I re-enter through the breach – and I reconceive the whole.

Thus, everything becomes fluid again.”

Henri Matisse, 1936
(Flam 1995)

Die vorliegende Dissertation ist in einem Anteil in einer Originalpublikation der Promovendin veröffentlicht.

Autorenliste:

Lichter Katharina, Paul Mila Marie, Pauli Martin, Schoch Susanne, Kollmannsberger Philip, Stigloher Christian[#], Heckmann Manfred[#], Sirén Anna-Leena[#]

#shared contribution

Titel der Publikation:

Ultrastructural analysis of wildtype and RIM1 α knock-out active zones in a large cortical synapse

Journal:

Cell Reports (accepted in principle, Status 22.08.22)

Eine explizite Erlaubnis zur Wiederverwendung der Daten/Abbildungen in dieser Arbeit ist nicht erforderlich, da die Publikation unter der *Creative Commons Attribution (CC-BY-NC)* erfolgen wird. Weiterführend siehe <https://www.elsevier.com/about/policies/open-access-licenses> (zuletzt aufgerufen am 22.08.22).

Der für die Analysen verwendete Programmiercode ist auf einer öffentlichen Internetseite für Softwareentwicklungsprojekte (*GitHub*) veröffentlicht und unter einer *GNU General Public License 3.0* auf Herrn Prof. Dr. rer. nat. Philip Kollmannsberger und die Promovendin lizenziert.

Veröffentlichungsinformation DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.6952807>

Konferenzbeiträge und Beiträge zu anderen wissenschaftlichen Formaten, die die Dissertation betreffen, sind dem *Curriculum vitae* der Promovendin zu entnehmen.

Inhalt

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Synaptische Kommunikation.....	5
3.2	Synaptische Transmission	7
3.3	Präsynaptische Aktive Zonen	11
3.4	<i>Rab3 Interacting Molecule 1α</i>	15
3.5	Hippocampale Moosfaserboutons.....	20
3.5.1	Hippocampus.....	20
3.5.2	Moosfasertrakt.....	22
3.5.3	Synapse des großen hippocampalen Moosfaserboutons.....	23
3.6	Ultrastrukturanalyse von Aktiven Zonen.....	24
3.6.1	Rationale	24
3.6.2	Hochdruckgefrierung und Gefriersubstitution	25
3.6.3	Elektronentomographie.....	25
3.7	Zielsetzung der Dissertation	27
4	Material und Methoden	29
4.1	Material.....	29
4.1.1	Lösungen und Chemikalien	29
4.1.2	Labormaterial.....	31
4.1.3	Geräte	32
4.1.4	Software	32
4.2	Methoden	34
4.2.1	Allgemeines.....	34
4.2.2	Ethik- und Versuchstiervotum	34
4.2.3	Versuchstiere.....	34
4.2.4	Übersicht der experimentellen Abläufe	34
4.2.5	Präparation von akuten Schnitten des Mausgehirns	35
4.2.6	Hochdruckgefrierung von akuten Schnitten des Mausgehirns.....	37
4.2.7	Gefriersubstitution	39
4.2.8	Flacheinbettung der Gewebeproben.....	40
4.2.9	Gezielte Ultramikrotomie der Gewebeproben	41
4.2.10	Elektronenmikroskopie	44
4.2.11	Selektion der Analyseproben und Aufnahmeposition	44
4.2.12	Segmentierung und Annotation der Tomogramme.....	46

4.2.13	Quantitative Datenanalyse.....	49
4.2.14	Statistik.....	51
5	Ergebnisse	53
5.1	Nativere EM-Probenpräparation an hippocampalen MFBs vermittelt einen neuartigen Detailreichtum.....	53
5.2	Hochwertige Qualität der AZ-Ultrastruktur in hippocampalen MFBs von RIM1 $\alpha^{+/+}$ und RIM1 $\alpha^{-/-}$	59
5.3	Variabilität und Komplexität der AZ-Membranfläche in hippocampalen MFBs...	61
5.4	Größenzunahme der AZ-Membranfläche in hippocampalen MFBs in RIM1 $\alpha^{-/-}$	62
5.5	Höhen- und Volumenzunahme des synaptischen Spaltes in RIM1 $\alpha^{-/-}$	66
5.6	Akkumulation von Mitochondrien an RIM1 $\alpha^{-/-}$ AZs	66
5.7	Hochaufgelöste 3D-Visualisierung von synaptischen Vesikeln in AZs des hippocampalen MFBs.....	70
5.8	<i>Docked SV pool</i> – Reduktion und Delokalisation der gedockten SVs in RIM1 $\alpha^{-/-}$ AZs des hippocampalen MFBs.....	70
5.8.1	Reduziertes SV- <i>Docking</i> in RIM1 $\alpha^{-/-}$	70
5.8.2	Distanzzunahme der perisynaptischen SVs (0-10 nm) in RIM1 $\alpha^{-/-}$	71
5.8.3	Reduziertes elektronendichtes Material an eng gedockten SVs in RIM1 $\alpha^{-/-}$	72
5.8.4	Delokalisation des eng gedockten SV-Pools in RIM1 $\alpha^{-/-}$	75
5.9	Die Organisation des SV-Pools (0-200 nm) in AZs des hippocampalen MFBs..	79
5.9.1	Reduktion des SV-Pools in RIM1 $\alpha^{-/-}$	79
5.9.2	Direkte Korrelation der AZ-Membranfläche und der Größe des SV-Pools in beiden Genotypen.....	80
5.9.3	Veränderte 3D-Organisation des SV-Pools in RIM1 $\alpha^{-/-}$	80
6	Diskussion	83
6.1	Multidimensionale Alteration der AZ-Ultrastruktur in RIM1 $\alpha^{-/-}$	84
6.1.1	Abhängigkeit der Ausdehnung und Größe der AZ-Membran von RIM1 α	84
6.1.2	Abhängigkeit der Höhe und des Volumens des synaptischen Spaltes von RIM1 α	86
6.1.3	Abhängigkeit der Anzahl, Lokalisation und des EDMs eng gedockter SVs von RIM1 α	88
6.1.4	Abhängigkeit der SV-Pool-Organisation von RIM1 α	91
6.1.5	Abhängigkeit der Lokalisation von Mitochondrien an AZs von RIM1 α	92
6.1.6	Funktionelle Implikationen	93
6.2	<i>Nearer-to-native?</i> – AZ-Ultrastruktur und HPF/FS-Techniken	95
6.3	Ausblick	97

7	Referenzen	99
8	Appendix	115
8.1	Abkürzungsverzeichnis	115
8.2	Abbildungsverzeichnis	119
8.3	Tabellenverzeichnis	120
8.4	Appendix	121
8.4.1	Programmierskripte	121
8.4.2	Fixationsprotokolle	129
8.5	Danksagung	131
8.6	<i>Curriculum vitae</i>	133
8.7	Affidavit	137

1 Zusammenfassung

In Nervensystemen bedürfen Informationsweitergabe und Gedächtnisformation eines präzisen Zusammenspiels von Synapsen in Zeit und Raum. Synaptische Transmission basiert strukturell auf mesoskopischen cytosolischen Kompartimenten an der präsynaptischen Membran, sogenannten Aktiven Zonen (AZ). Ihre Cytomatrix, bestehend aus zentralen Gerüstproteinen wie *Rab3 interacting molecule* (RIM), ermöglicht eine schnelle Freisetzung synaptischer Vesikel. Die Defizienz der lokal häufigsten Isoform RIM1 α resultiert an einer komplexen zentralen Säugersynapse, die des hippocampalen Moosfaserboutons (MFB) zu im *Cornu ammonis* (CA)3 befindlichen Pyramidalzellen, in einer dezimierten Langzeitplastizität. Auf Verhaltensebene zeigen diese Mäuse eine reduzierte Lernfähigkeit.

Die vorliegende Dissertation widmet sich grundlegend der bisher unbekanntem dreidimensionalen (3D) AZ-Ultrastruktur des MFB in akuten Hippocampuschnitten der adulten Wildtyp- und RIM1 α -*Knock-Out*-Maus (RIM1 α ^{-/-}). In einer methodischen Entwicklungsphase wurde ein neuartiges, anspruchsvolles Protokoll der nahezu artefaktfreien (*near to native*) Synapsenpräparation am MFB mittels Hochdruckgefrierung und Gefriersubstitution sowie der 3D-Modellierung mittels Elektronentomographie etabliert. In einer zweiten Experimentier- und Analysephase ermöglichte die hochwertige synaptische Gewebeerhaltung in beiden Genotypen eine standardisierte, auf Programmierskripten basierte Quantifizierung der AZ-Ultrastruktur bis auf die Ebene eines individuell gedockten synaptischen Vesikels

Dieser Dissertation gelingt der Nachweis, dass eine Defizienz von RIM1 α zu einer multidimensionalen ultrastrukturellen Veränderung der AZ und ihres Vesikelpools am MFB führt. Neben einer Reduktion, Dezentralisierung und strukturellen Veränderung (eng) gedockter Vesikel – der ultrastrukturellen Messgrößen von unmittelbar freisetzungsfähigen Vesikeln – verdichtet sich der distaler lokalisierte Vesikelpool auf zugleich größeren, heterogenen AZ-Flächen mit erweitertem synaptischem Spalt. Vorliegende Untersuchungen tragen zum Verständnisgewinn über eine zentrale Rolle von RIM1 α für das Docking und die Organisation von Vesikeln der AZ im MFB bei. Darüber hinaus stellen die präzisen ultrastrukturellen Analysen eine morphologische Grundlage für weiterführende Studien mit Hilfe modernster Techniken dar, beispielsweise über die Auswirkungen der geänderten RIM1 α ^{-/-} AZ-Ultrastruktur auf die präsynaptische Plastizität sowie in Korrelation zum Gedächtnis und Lernen der Tiere.

2 Summary

In nervous systems, synapses precisely orchestrate information transfer and memory formation. Active zones (AZ) are specialized subcellular compartments at the presynaptic mesoscale which process synaptic transmission on an ultrastructural level. The AZ cytomatrix including the essential scaffold protein Rab3 interacting molecule (RIM) enables exocytosis of synaptic vesicles. A deficiency of the locally most abundant protein isoform RIM1 α diminishes long-term potentiation in a complex central mammalian synapse – the connection of hippocampal mossy fiber boutons (MFB) to *cornu ammonis* (CA)3 pyramidal neurons. Behaviourally, these mice present with learning impairment. The present MD thesis addresses the so far unknown three-dimensional (3D) AZ ultrastructure of MFBs in acute hippocampal slices of wild-type and RIM1 α ^{-/-} mice. In a first set of experiments, a standardized protocol for near-to-native synaptic tissue preparation at MFBs using high-pressure freezing and freeze substitution and 3D modelling using electron tomography was developed and established. Based on the excellent preservation of synaptic tissue using this protocol, the AZ ultrastructure in both genotypes was quantified in detail up to an individual docked synaptic vesicle using custom-written programming scripts.

The experiments demonstrate that deficiency of RIM1 α leads to multidimensional alteration of AZ 3D ultrastructure and synaptic vesicle pools in MFBs. (Tightly) docked synaptic vesicles – ultrastructural correlates of the readily releasable pool – are reduced, decentralized, and structurally modified, whereas the more distant vesicle pool clusters more densely above larger and more heterogenous AZ surfaces with higher synaptic clefts. The present thesis contributes to a more comprehensive understanding regarding the role of RIM1 α for (tight) vesicle docking and organization at MFBs. Furthermore, the precise 3D ultrastructural analysis of MFB AZs in this thesis provides the necessary morphological basis for further studies to correlate synaptic ultrastructure with presynaptic plasticity and memory dysfunction in RIM1 α ^{-/-} mice using advanced electrophysiological and behavioral techniques.

3 Einleitung

3.1 Synaptische Kommunikation

Prinzip der synaptischen Kommunikation

Neuronale Kommunikation befähigt tierische Organismen, motorische und sensorische Informationen innerhalb ihres Körpers zu transportieren und zu modifizieren. Spezialisierte subzelluläre Kontaktbereiche der Nervenzellen (Neurone), sog. Synapsen, bilden die morphologische Basis, über die Signale durch elektrische oder chemische Mechanismen unterschiedlicher Stärke, Variabilität und Komplexität übertragen werden. Synaptische Netzwerke aus Neuronenpopulationen (neuronale Netzwerke) ermöglichen in gesunden Nervensystemen gerichtete, hochkomplexe Verarbeitung von bestehenden und neuen Informationen. Synaptische Reifung und Aktivitätsänderungen von unterschiedlicher Zeitdauer (Plastizität) innerhalb dieser Netzwerke scheinen grundlegend für höhere Kognition und Formation von Gedächtnis zu sein (Kandel et al. 2012; Abraham, Jones, and Glanzman 2019; Magee and Grienberger 2020).

Das Bild der *synapsis*

*“So far as our present knowledge goes
we are led to think that the tip
of a twig of the [axon's] arborescence
is not continuous with but merely in contact
with the substance of the dendrite
or cell body on which it impinges.
Such a special connection of one nerve cell
with another might be called a **synapsis**”*
(Foster and Sherrington 1897; Tansey 2022)

Im Jahr 1894 erhielt Ramón y Cajal für seine erstmalig erfolgten histologischen Visualisierungen von neuronalen Kontaktbereichen, u.a. des Kleinhirns, die Einladung zur ehrwürdigen *Croonian Lecture* der *Royal Society of London* (Cajal 1888, 1894). Vor Ort wurde er bei Anfertigung seiner Vorlesungsabbildungen durch Charles Sherrington, einen Assistenten des Physiologen Michael Foster, unterstützt. 1897 führte Sherrington für Cajals Kontaktbereiche zwischen Neuronen in Fosters *Textbook of Physiology*, 7. Edition, den heute gebräuchlichen Terminus der *synapsis* (Altgriechisch συνάπτω, verknüpfen, berühren) ein (Eccles and Gibson 1979; Liddell, Jones, and Scott 1996; De Carlos and Molnar 2020; Tansey 2022). Cajal sollten mit einer von Camillo Golgi entwickelten Silbernitratfärbung in den Folgejahren zahlreiche weitere synaptische Visualisierungen gelingen, u.a. der Retina und des optischen Hirnnervens (systematisch siehe (Golgi 1873; Cajal 1909), die in ihrer Gesamtheit den Beginn der mikroskopischen

Untersuchungen von Synapsen und ihrer (subzellulären) Struktur in gegenwärtig nahezu atomarer Auflösung ebneten (Goodsell, Olson, and Forli 2020; Werner, Sauer, and Geis 2021; Zuber and Lucic 2022).

Synaptische Entitäten

Elektrische Erregung und ihre Weiterleitung folgen dem Prinzip der Balance (Pereda 2014; Kandel et al. 2012). Transmembrane Proteinkanäle aus Connexinen bilden die strukturelle Grundlage elektrischer Synapsen (*gap junction*), die unter Neuronenpopulationen in schneller und stereotyper Art elektrische Aktivität weiterleiten und diese miteinander bidirektional koppeln (Connors and Long 2004). Komplexere Erregungsbildung und -amplifikation auf Einzelzell- und Netzwerkebene, sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch, bedürfen funktionell und strukturell spezialisierter chemischer Synapsen (Gray 1959a; Wichmann and Kuner 2022). Die vorliegende Dissertation fokussiert sich auf zentrale chemische Synapsen des adulten Maushippocampus, im Besonderen auf die Ultrastruktur des präsynaptischen Kompartiments, das in den folgenden Kapiteln eingeführt werden soll.

3.2 Synaptische Transmission

Ultrastruktur der chemischen Synapse

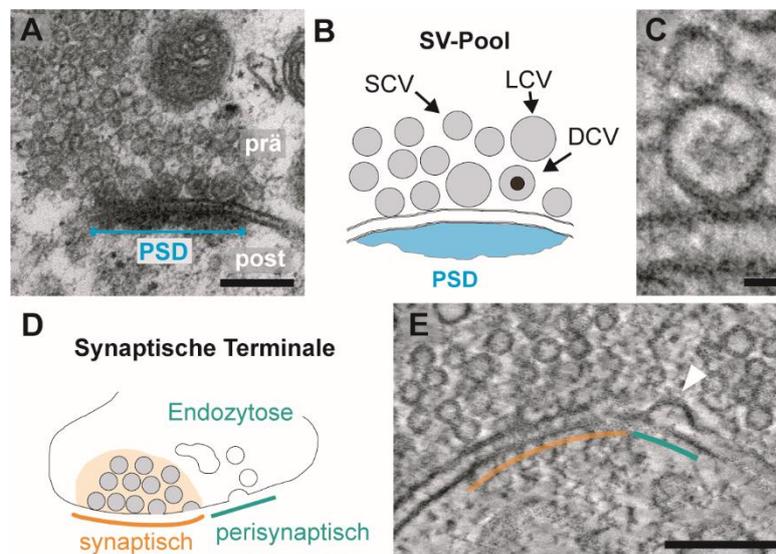


Abbildung 1. Die Ultrastruktur einer chemischen Synapse im zentralen Nervensystem der Maus.

(A) Elektronenmikrographie eines synaptischen Komplexes des hippocampalen Moosfaserboutons (MFBs), der mit einer klassischen Aldehyd-basierten Fixation behandelt wurde. Der synaptische Komplex besteht aus Präsynapse (prä), synaptischem Spalt und Postsynapse (post) mit postsynaptischer Dichte (PSD). (B) Schemazeichnung des Pools aus synaptischen Vesikeln (SVs) mit kleinen klaren synaptischen Vesikeln (*small-clear vesicles*, SCVs), großen klaren SVs (*large-clear vesicles*, LCVs) und SVs mit dichtem Kern (*dense-core vesicles*, DCVs). (C) Elektrentomographischer Schnitt einer durch Hochdruckgefrierung (HPF) und Gefriersubstitution (FS) fixierten hippocampalen Präsynapse, an der sich ein DCV (unten) und ein SCV (oben) befinden. (D) Schemazeichnung der zu der AZ (orange-farbige Linie) perisynaptisch lokalisierten Endozytosezone (grün-farbige Linie) für SVs. (E) Elektronentomographischer Schnitt eines mit HPF/FS erhaltenen synaptischen Komplexes mit perisynaptischer Endozytosezone (weißer Pfeilkopf). Maßstab: (A, E) 250 nm, (C) 25 nm.

Synaptische Transmission als ein elementarer Vorgang der synaptischen Kommunikation involviert synaptische Ultrastruktur – die subzelluläre elektronendichte Architektur einer Synapse, die sich mit der von Ernst Ruska 1930-1931 entwickelten Elektronenmikroskopie (EM) visualisieren lässt (Ruska 1987). Die ultrastrukturelle Differenzierung der Synapse (**Abbildung 1A**) in einen prä- und postsynaptischen Anteil sowie eine separierende extrazelluläre Erweiterung, den synaptischen Spalt, wurde 1954 erstmals von George Emil Palade und Sanford Louis Palay veröffentlicht und später als synaptischer Komplex bezeichnet (Palade and Palay 1954; Palay and Palade 1955; Palay 1956, 1958). In elektronenmikroskopischen Visualisierungen imponieren an der Präsynapse Cluster von elektronendichten, sphärischen Organellen – synaptischen Vesikeln (SVs) – unterschiedlichen Durchmessers (Südhof 2013; Henze et al. 2002). So lassen sich ultrastrukturell Populationen von kleineren (*small-clear vesicles*, SCVs, ~ 40 nm) und

größeren klaren SVs (*large-clear vesicles*, LCVs, > 70 nm) (Amaral and Dent 1981; Henze et al. 2002; Rollenhagen et al. 2007), partiell auch SVs mit elektronendichtem Kern (*dense-core vesicles*, DCVs, ~ 80-200 nm) (De Camilli and Jahn 1990) identifizieren (**Abbildung 1B, C**) (Peters, Palay, and Webster 1991). Am Fusionsort setzen SVs als Teil des synaptischen Transmissionsvorgangs Neurotransmittermoleküle (erstmal bei (Heuser et al. 1979; Heuser and Reese 1981)) bzw. DCVs Neuropeptide frei (Salio et al. 2006). Die postsynaptischen Anteile, die sich intrazellulär an der postsynaptischen Membran anlagern, werden im klassisch Aldehyd-fixierten Gewebe aufgrund ihrer Elektronendichte als postsynaptische Dichte (PSD) bezeichnet (erstmal morphologisch bei (Couteaux 1944, 1946)). Nach früheren Klassifikationen von Gray lässt die Symmetrie der PSD Aufschluss über den exzitatorischen (asymmetrisch, Typ I) oder inhibitorischen (symmetrisch, Typ II) Charakter der synaptischen Verbindung zu (Gray 1959a, 1959b), wohingegen dieses Konzept nach gegenwärtigem Kenntnisstand der Komplexität von synaptischer Ultrastruktur nicht vollständig gerecht wird (Klemann and Roubos 2011). Perisynaptisch treten ultrastrukturell Zonen der Endozytose hervor, in denen Membrananteile ehemals fusionierter SVs invaginiert werden und als in Teilen verzweigte endosomale Strukturen in räumlicher Nähe zur SV-Population lokalisieren (**Abbildung 1D, E**) (erstmal bei (Heuser and Reese 1973; Südhof 2013; Chanaday et al. 2019). Die Visualisierung von ultrastrukturellen Elementen an chemischen Synapsen wird insbesondere in den vergangenen 20 Jahren durch die Kombination von speziellen Techniken des schnellen Gefrierens (*rapid freezing*), des Hochdruckgefrierens (*high-pressure freezing*, HPF), der Gefriersubstitution (*freeze substitution*, FS) und hochauflösender dreidimensionaler (3D) EM stetig erweitert. Unter besonderem Fokus stehen komplexe elektronendichte Filamente und Gerüstmaterial, die sich zwischen SVs, SVs und präsynaptischer Membran und im synaptischen Spalt lokalisieren und tiefergehend in folgenden Kapiteln betrachtet werden (Landis et al. 1988; Hirokawa et al. 1989; Harlow et al. 2001; Siksou et al. 2007; Siksou et al. 2009; Fernandez-Busnadiego et al. 2010; Stigloher et al. 2011; Fernandez-Busnadiego et al. 2013; Hallermann and Silver 2013; Imig et al. 2014; Cole, Chen, and Reese 2016; Neher and Brose 2018; Li et al. 2019; Radhakrishnan et al. 2021; Zuber and Lucic 2022).

Physiologie der synaptischen Transmission

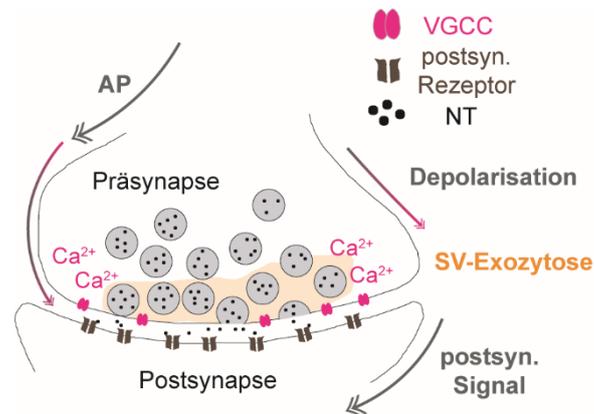


Abbildung 2. Ablauf der synaptischen Transmission an einer synaptischen Terminalen.

Das Aktionspotential (AP, Pfeil mit Doppelspitze) führt zu einer Depolarisation der Plasmamembran (magenta-grauer Pfeil) und zum Calciuminflux durch spannungsgesteuerte Calciumkanäle (*voltage gated calcium channel*, VGCC). Die dadurch initiierte SV-Exozytose an der Aktiven Zone (AZ) bewirkt eine Freisetzung von Neurotransmittern (NT) in den synaptischen Spalt, die an postsynaptische (postsyn.) Rezeptoren diffundieren. Dies führt durch Öffnen/Verschluss von Ionenkanälen zu einem exzitatorischen oder inhibitorischen postsynaptischen Potential (EPSP, IPSP). Im Fall einer exzitatorischen synaptischen Verbindung kann ein EPSP zur Generierung eines APs führen bzw. dazu beitragen (Pfeil mit Doppelspitze).

Die physiologische Entschlüsselung der synaptischen Transmission auf Einzelzellebene gelang den britischen Physiologen Alan Lloyd Hodgkin, Andrew Fielding Huxley und Bernard Katz Mitte des 20. Jahrhunderts (**Abbildung 2**): Das präsynaptische Aktionspotential (AP) propagiert bedingt durch eine veränderte Leitfähigkeit der Plasmamembran für Kalium-/Natriumionen mit konstanter Geschwindigkeit zu dessen Endigung, dem präsynaptischen Terminal. Dies bewirkt eine Öffnung der durch die Membranspannung gesteuerten präsynaptischen Calciumkanäle (*voltage gated calcium channel*, VGCC) (Hodgkin 1937a, 1937b; Hodgkin, Huxley, and Katz 1949; Hodgkin and Katz 1949; Hodgkin, Huxley, and Katz 1952). Der zytosolisch gerichtete Influx von Calciumionen ist entscheidender Signalgeber der Exozytose von SVs (Fatt and Katz 1952; Katz and Miledi 1965a). Freigesetzte Neurotransmittermoleküle diffundieren durch den synaptischen Spalt an postsynaptischen Rezeptoren (Katz 1969). Die Exozytose der Transmittermoleküle geschieht in Einheiten ähnlicher Molekülanzahl, sogenannter Quanten (Fatt and Katz 1952; Del Castillo and Katz 1954). Die Aktivierung der postsynaptischen Rezeptoren bewirkt eine Öffnung/Verschluss postsynaptischer Ionenkanäle (Fatt and Katz 1951). Das Zeitintervall zwischen ankommendem AP und Aktivierung der postsynaptischen Rezeptoren von weniger als einer Millisekunde bis zu mehreren Millisekunden wird als synaptische Latenz bezeichnet (Katz and Miledi 1965b) und lässt eine

quantitative Charakterisierung der Kinetik spezifischer Synapsen zu. Die postsynaptischen Ionenströme erzeugen eine Änderung des postsynaptischen Membranpotentials, die entweder einem exzitatorischen oder inhibitorischen postsynaptischen Potential (EPSP bzw. IPSP) entspricht. Im Falle einer exzitatorischen Verbindung kann dies die Generierung eines APs bewirken bzw. dazu beitragen (Fatt and Katz 1952; Katz 1969). Änderungen der synaptischen Aktivität über Millisekunden, Minuten oder Jahre, die durch Zu- oder Abnahme der AP-Frequenz und/oder AP-Amplitude mit einer veränderten synaptischen Übertragungsrate einhergehen, werden abhängig von ihrer Dauer als synaptische Kurz- (*short-term plasticity*, STP) bzw. Langzeitplastizität (*long-term plasticity*, LTP) bezeichnet. Die Kombination aus synaptischer Grundaktivität und synaptischen Aktivitätsveränderungen wird strukturell im Besonderen vom präsynaptischen Kompartiment der Aktiven Zonen (AZ) getragen (Atwood and Karunanithi 2002; Kandel 2009; Regehr 2012; Castillo 2012).

3.3 Präsynaptische Aktive Zonen

Konzept

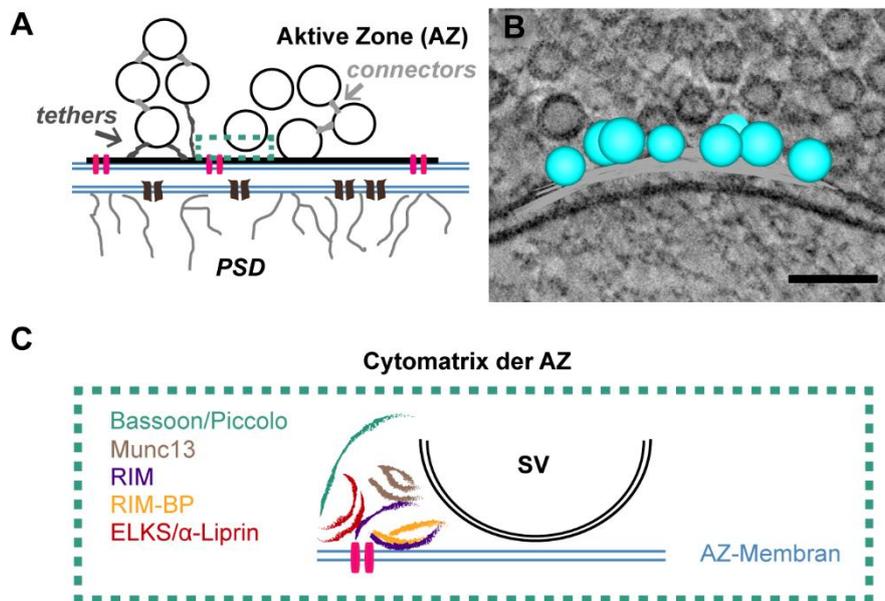


Abbildung 3. Präsynaptische Aktive Zonen.

(A) Schemazeichnung einer AZ an einer chemischen Säugersynapse des zentralen Nervensystems mit SV-Pool, der durch elektronendichte Filamente zwischen den SVs (*connectors*) verbunden ist. SVs werden mit Hilfe von elektronendichten Filamenten (*tethers*) an der AZ-Membran angehaftet und zu dieser bewegt. Gegenüberliegend zur AZ-Membran befindet sich die an der postsynaptischen Membran befestigte PSD. (B) Elektronentomographischer Schnitt einer AZ im hippocampalen MFB aus einem HPF/FS-Präparat mit integrierter 3D-Modellierung (siehe Methoden). (C) Schemazeichnung einer Vergrößerung des in Bildteil A durch eine gestrichelte grüne Linie eingefassten Bereichs der AZ-Cytomatrix (CAZ). Die AZ-Proteine sind als Striche eingefügt. Ihre individuellen Proteindomänen werden damit nicht abgebildet. Maßstab: (B) 100 nm. Bildteil B ist eine modifizierte Darstellung der Abbildung 1, Bildteil E, der dazugehörigen Originalpublikation der Promovendin (Lichter et al. 2022).

Seit den 1960er Jahren existiert das von René Couteaux postulierte Struktur-Funktionskonzept der spezialisierten präsynaptischen Kompartimente, sog. *zones actives* (**Abbildung 3A, B**) (Couteaux and Pecot-Dechavassine 1970), durch die – funktionell definiert – Calcium getriggerte SV-Exozytose orchestriert und synaptische Transmission mit hoher zeitlicher und örtlicher Präzision vermittelt wird (Zhai and Bellen 2004; Südhof 2012; Ackermann, Waites, and Garner 2015; Emperador-Melero and Kaeser 2020). Nach Couteaux und Pecot-Dechavassine entspricht die AZ strukturell dem Anteil der präsynaptischen Plasmamembran mit elektronendichtem Material (EDM), an dem SV-Exozytose stattfindet (Couteaux and Pecot-Dechavassine 1970). Bis heute verbleibt die molekulare Feinmechanik der AZ als wesentliches Element des Transmissionsvorgangs nicht vollständig entschlüsselt, obgleich eine Vielzahl der molekularen Bestandteile bekannt sind (Takamori et al. 2006; Südhof 2012; Reshetniak et al. 2020). Eine erste Verschriftlichung

des Terminus der AZ – hervorgehend aus einer persönlichen Kommunikation mit René Couteaux – existierte bereits in John Eccles 1964 erschienenem Lehrbuch „*The physiology of synapses*“ (Eccles 1964; Tsuji 2006). Die Erforschung der Funktionsweise einer AZ ist nicht allein für das Verständnis von synaptischer Transmission und Plastizität wichtig, sondern auch für die molekulare Charakterisierung der Pathogenese zahlreicher neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen, für deren Entwicklung oder Verlauf Dysfunktionen präsynaptischer AZ-Elemente eine Rolle spielen könnten. Dieses Wissen ist für die Entwicklung von modernen nanotechnologischen Therapieansätzen, z.B. gentherapeutischen Verfahren, unerlässlich (Waites and Garner 2011; Asan et al. 2016; Huang et al. 2020; Zieger and Choquet 2021; Bonnycastle, Davenport, and Cousin 2021).

Morphologie der AZ

Die Morphologie der AZ ist als struktureller Motor der präsynaptischen Nanophysikologie zu begreifen. Die Cytomatrix der AZ (CAZ) besteht aus AZ-Proteinen mit spezialisierten Proteindomänen, die durch ihre Lokalisation und Anzahl die AZ spezifizieren (Südhof 2012). Neben der CAZ sind entsprechend der Definition nach Couteaux die AZ-Membran als präsynaptischer Plasmamembrananteil, an dem SV-Exozytose stattfindet, sowie der membran nahe SV-Pool weitere AZ-Strukturelemente. Zu den evolutionsbiologisch hochkonservierten Kernproteinen der AZ in der Säugersynapse zählen die Gerüstproteine *Rab3 interacting molecule* (RIM), welches durch seine Domäneninteraktionen mit wesentlichen AZ-Strukturelementen als zentraler Organisator gilt und dessen Isoform RIM1 α Forschungsgegenstand vorliegender Dissertation ist, sowie RIM *binding protein* (RIM-BP), Munc13 (*mammalian homolog of Caenorhabditis elegans uncoordinated gene 13*), α -Liprin und ELKS (*protein rich in the amino acids E, L, K and S*) (**Abbildung 3C**) (Südhof 2012). Die Proteine Piccolo and Bassoon unterstützen als lange zytosolische Filamente die Organisation des synaptischen SV-Pools (Gundelfinger, Reissner, and Garner 2015). Um synchrone oder asynchrone Fusionen der Vesikel an Freisetzungstellen (*release sites*) innerhalb der AZ zu gewährleisten, interagiert die CAZ eng mit Calciumsensoren und einem Proteinkomplex aus *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor* (SNARE)- und Sec1/Munc18 (SM)-*like*-Proteinen (Südhof 2013; Pulido and Marty 2017). Zu den auf der äußeren Vesikelmembran lokalisierten Calciumsensoren zählen z.B. Rab3 (Geppert et al. 1997) oder Synaptotagmine (Perin et al. 1991). Die in Teilen elektronendichte CAZ aus Kernproteinen ankert nach axonalem Transport an der AZ-Membran (Emperador-Melero and Kaeser 2020). Die Fläche und Ausdehnung einer AZ-Membran wird ultrastrukturell neben der Präsenz von an ihr

gedockten SVs durch die Ausdehnung der korrespondierenden PSD an der postsynaptischen Membran definiert (**Abbildung 3A, B**). Aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen an synaptische Signalweitergabe ist die Morphologie der AZ divers und differiert abhängig von ihrem Aktivitätsstatus, innerhalb einer Synapse, eines Synapsentyps, eines Organismus und/oder unter Organismen (Atwood and Karunanithi 2002; Zhai and Bellen 2004; Ehmann et al. 2014; Ackermann, Waites, and Garner 2015; Pauli et al. 2021). Die Diversität der AZ-Morphologie lässt sich anhand der AZ-Ultrastruktur in etablierten experimentellen Modellsynapsen exemplifizieren: An der AZ der neuromuskulären Endplatte (*neuromuscular junction*, NMJ) in *Drosophila melanogaster* befindet sich eine zweidimensionale T-förmige (T-bar) bzw. 3D fontänenartige elektronendichte Struktur u.a. aus Molekülen des präsynaptischen AZ-Proteins und ELKS-Homologs Bruchpilot, das vielfach in Form langer filamentöser Projektionen ins Zytosol hineinragt und plastizitätsabhängig seine molekulare Geometrie ändern kann (Kittel et al. 2006; Wagh et al. 2006; Ehmann et al. 2014; Ehmann, Oswald, and Kittel 2018; Mrestani et al. 2021; Paul et al. 2022). In *Caenorhabditis elegans* entspricht die AZ an cholinergen NMJs einer kompakt gelagerten Struktur mit elektronendichten Projektionen, über die die SVs verbunden sind und im Falle einer Defizienz der AZ-Proteine unc-10 (RIM), unc-13 (Munc13), syd-2 (α -Liprin) delokalisieren (Stigloher et al. 2011; Weimer et al. 2006). An der NMJ des Frosches formiert sich eine charakteristische gratförmige AZ mit länglicher, zweireihiger SV-Anordnung mit funktionell unterschiedlichen elektronendichten Strukturen (*ribs, beams, pegs*) (Harlow et al. 2001). Auch die AZ-Architektur von chemischen Synapsen des zentralen Nervensystems im Säuger wird durch elektronendichte Filamente unterschiedlicher Form und Länge geprägt, die SV-Populationen (SV-Pool) untereinander in AZ-Nähe organisieren (*connectors*) bzw. Anker- (*tethers*) und Dockverbindungen zwischen SVs und der AZ-Membran herstellen (**Abbildung 3A**) (Landis et al. 1988; Hirokawa et al. 1989; Siksou et al. 2007; Siksou et al. 2009; Fernandez-Busnadiego et al. 2010; Fernandez-Busnadiego et al. 2013; Cole, Chen, and Reese 2016; Radhakrishnan et al. 2021). Dieses EDM scheint trotz nicht vollständiger molekularer Entschlüsselung wesentlich für die Funktionsweise einer AZ zu sein (Fernandez-Busnadiego et al. 2010; Fernandez-Busnadiego et al. 2013; Hallermann and Silver 2013).

Funktionen der AZ

Grundaktivität und (präsynaptische) Plastizität flexibel zu adaptieren und in den molekularen Vorgang der SV-Exozytose zu transformieren, sind Kernaufgaben der (C)AZ (Atwood and Karunanithi 2002; Kittel and Heckmann 2016; Jackman and Regehr 2017;

Monday, Younts, and Castillo 2018). Die SV-Exozytose besteht aus den konsekutiven Vorgängen einer Bewegung des SVs zur AZ-Membran (*tethering*), der Vermittlung eines direkten Kontaktes zwischen dieser und der äußeren SV-Membran (*docking*), der Versetzung des SVs in einen fusionsbereiten Zustand (*priming*) und schließlich der Formation einer Fusionspore bzw. der Fusion des SVs (Südhof 2013). Dies impliziert als Funktion auch die räumliche Organisation eines membrannahen freisetzungsfähigen SV-Pools (*readily releasable pool*, RRP), dessen ultrastrukturelles Korrelat nach einer gängigen Definition die Anzahl von gedockten SVs an der AZ-Membran darstellt (Rizzoli and Betz 2004; Imig et al. 2014; Neher 2015; Kaeser and Regehr 2017). Aufgrund der beschriebenen Funktion der Calciumionen als Trigger der SV-Exozytose erfordern die Calciumsensoren auf der äußeren SV-Membran eine räumliche Anordnung zu VGCCs und umgekehrt (Miki et al. 2017; Rebola et al. 2019). Dieser als Kopplung (*coupling*) bezeichnete AZ-Prozess bestimmt die Freisetzungswahrscheinlichkeit des SVs und damit Reaktionsfreudigkeit einer Synapse (Eggermann et al. 2011; Neher 2015; Dolphin and Lee 2020). Die Kombination aus Kopplungsdistanz, der Größe des RRP, der Art des Calciumsensors und der endogenen Pufferfähigkeit für Calcium reguliert die synaptische Effizienz (Vyleta and Jonas 2014; Chen and Jonas 2017). Eine weitere Aufgabe der AZ besteht in der Vermittlung von transsynaptischen Organisationsprinzipien, z.B. sogenannten transsynaptischen Nanosäulen bzw. Nanoeinheiten zur strukturellen Befestigung/Lokalisation präsynaptischer Elemente in Relation zu z.B. postsynaptischen Rezeptorclustern (Tang et al. 2016; Martinez-Sanchez et al. 2021). Auf molekularer Ebene scheinen u.a. synaptische Adhäsionsmoleküle, wie Neurexine (Trotter et al. 2019) und Neuroligine (Ramesh et al. 2021), bzw. Lipide, z.B. das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) (de Jong et al. 2018), involviert zu sein. Diese Strukturadaptationen sind höchstwahrscheinlich ebenso für synaptische Plastizität bzw. die Plastizität der AZ relevant (Biederer, Kaeser, and Blanpied 2017).

3.4 Rab3 Interacting Molecule 1α

Grundlegendes

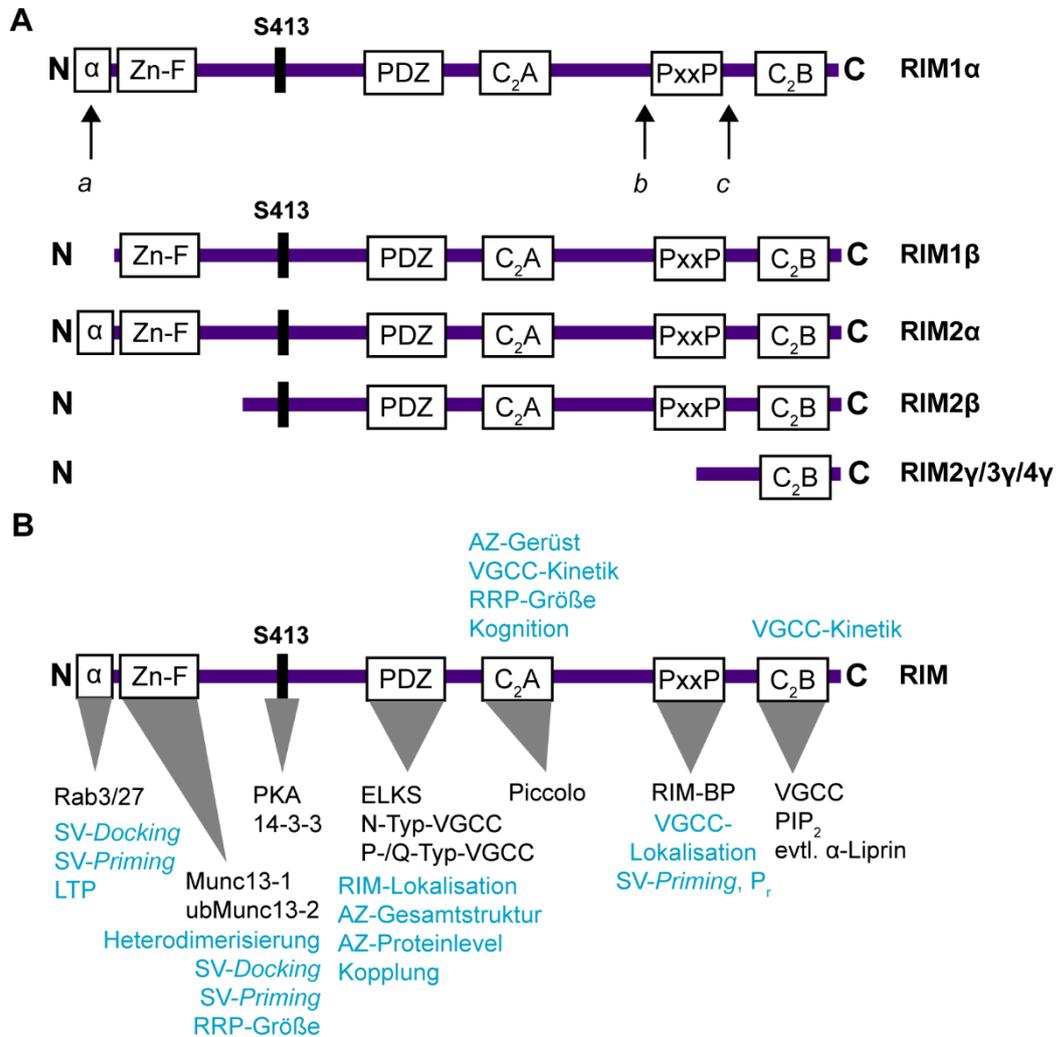


Abbildung 4. RIM-Isoformen des Säugers.

(A) Schemazeichnung der sieben RIM-Isoformen des Säugers inklusive der Proteindomänen und *Splice*-Stellen (*a*, *b*, *c*). (B) Bindungspartner und mögliche Funktionen (blau) der ausgewählten Domänen des Proteins. Abkürzungen: α = alpha-Helix, AZ = Aktive Zone, LTP = Langzeitplastizität, PIP₂ = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PKA = Proteinkinase A, P_r = *release probability* (Freisetzungswahrscheinlichkeit eines Vesikels), RRP = *readily releasable pool*, SV = synaptischer Vesikel, S413 = Serin413, VGCC = *voltage gated calcium channel*, Zn-F = Zinkfinger-Domäne.

Innerhalb einer AZ sind RIM-Proteine und ihre Homologe am *Tethering*, *Docking* und *Priming* der SVs, an der Rekrutierung von VGCCs sowie an Plastizitätsmechanismen beteiligt (Mittelstaedt, Alvarez-Baron, and Schoch 2010; Südhof 2012; Emperador-Melero and Kaeser 2020). Vorliegende Dissertation untersucht die strukturelle Rolle der im Maushippocampus häufigsten Isoform RIM1α an AZs der exzitatorischen Synapse des hippocampalen Moosfaserboutons (MFB) zu im *Cornu ammonis* (CA)3 befindlichen

Pyramidalzellen in einem murinen *Knock-Out* (KO) Modell (**Abbildung 4A**) (Schoch et al. 2006). In der folgenden Charakterisierung von RIM findet die ausgewählte Synapse besondere Beachtung.

Proteinfamilie

RIMs sind Multidomänenproteine modularen Aufbaus bestehend aus fünf Proteindomänen (N-terminaler Zinkfinger, PDZ, C₂A, PxxP (Prolin reiches Motiv), C₂B), die in Invertebraten über ein singuläres *Rim/unc10*-Gen und in Vertebraten über die vier Gene *Rims1-4* kodiert werden (Mittelstaedt, Alvarez-Baron, and Schoch 2010; Kaeser et al. 2012). Die Strukturen der sieben RIM-Isoformen (RIM1 α , RIM1 β , RIM2 α , RIM2 β , RIM2 γ , RIM3 γ , RIM4 γ) unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung von Proteindomänen und drei *Splice*-Stellen, was in unterschiedlichen Interaktionen innerhalb einer AZ resultiert (**Abbildung 4A**). α -RIMs enthalten alle Domänen und *Splice*-Stellen, während RIM1 β die Rab3 bindenden α -Helices bzw. RIM2 β die gesamte Zinkfingerdomäne sowie die dort lokalisierte *Splice*-Stelle A fehlt. Sowohl α - als auch β -RIMs können durch alternatives *Splicing* variiert werden, obgleich dessen Bedeutung nicht vollständig geklärt ist. Neben RIM2 γ bestehen die beiden Isoformen RIM3 γ und RIM4 γ , die von den beiden kleineren Genen *Rims3-4* kodiert werden, aus einer C-terminalen C₂B-Domäne sowie einer flankierenden spezifischen Aminosäuresequenz (Wang, Sugita, and Südhof 2000; Wang and Südhof 2003).

Spezialisierte Proteindomänen und ihre Funktionen

Die unterschiedlichen Proteindomänen in den RIM-Isoformen stellen eine strukturelle Verbindung zu der übrigen AZ-Cytomatrix, VGCCs sowie der AZ-Membran her und sind so entscheidend für die AZ-Funktionen von sowohl RIM im Allgemeinen als auch der Isoformen im Speziellen (**Abbildung 4B**). Über die vor dem **Zinkfinger lokalisierten α -Helices** binden α -RIMs an die kleinen GTP-bindenden Proteine Rab3a und Rab27 auf der Vesikelmembran (Wang et al. 1997; Wang, Sugita, and Südhof 2000; Fukuda 2003), deren alleinige Defizienz – im Fall von Rab3a – das LTP in hippocampalen Moosfaserboutons beeinträchtigt (Castillo et al. 1997). Der **Zinkfinger** selbst interagiert mit der C₂A-Domäne von Munc13-1 und ubMunc13-2 (Andrews-Zwilling et al. 2006). RIM unterbricht durch seine heterodimere Komplexbildung mit Munc13-1 dessen Homodimerisierung und nähert die SVs, zusammen mit Rab3a/27, räumlich an die für das *SV-Priming* nötige Komposition aus Munc13-Molekülen an (Dulubova et al. 2005; Lu et al. 2006; Gracheva et al. 2008; Camacho et al. 2017; Zarebidaki et al. 2020; Radhakrishnan et al. 2021). Dies kann als strukturelles Korrelat des *SV-Dockings* begriffen werden (Südhof 2012). Eine Defizienz von RIM1 α führt zu einer 60-70% Reduktion der Munc13-1

Proteinlevel im Gewebe (Schoch et al. 2002). Ein Verlust der Interaktion zwischen RIM und Munc13-1 kann sowohl die Fusionsbereitschaft der SVs als auch die Größe des RRP beeinträchtigen (Betz et al. 2001; Dulubova et al. 2005). Die Funktion des RIM-Munc13-Heterodimers an der AZ differiert jedoch unter Organismen, z.B. *C. elegans* (Liu et al. 2019).

Die **PDZ-Domäne** von RIM interagiert mit dem C-Terminus des ebenso für *Docking* und *Priming* relevanten AZ-Kernproteins ELKS (Wang et al. 2002; Ohtsuka et al. 2002; Lu et al. 2005; Held, Liu, and Kaeser 2016; Kawabe et al. 2017; Dong et al. 2018). Die Interaktion beider Gerüstproteine ist für die Lokalisation von RIM1, die strukturelle Gesamtheit der AZ-Cytomatrix sowie sowohl für das gegenseitige Proteinlevel als auch das der übrigen AZ-Kernproteine relevant (Ohtsuka et al. 2002; Kaeser, Kwon, Chiu, et al. 2008; Kaeser et al. 2009; Wang et al. 2016; Wong et al. 2018; Tan et al. 2022). VGCCs des N- und P-/Q-Typen als zweite bedeutende Bindungspartner der PDZ-Domäne können durch die Interaktion in Vesikelnähe rekrutiert und lokalisiert werden, wodurch RIM eine tragende Rolle in der Kopplung zwischen SV und VGCC zukommt (Kaeser et al. 2011; Han et al. 2011; Graf et al. 2012).

Die Funktion der beiden nicht Calcium bindenden **C2-Domänen** gilt weiterhin als enigmatisch. Für die **C₂A-Domäne** von RIM2 ist die Bildung eines Heterodimerkomplexes mit dem langen Gerüstprotein Piccolo beschrieben. Dies würde die Gerüstfunktion von RIM unterstützen (Fujimoto et al. 2002). Die 2005 veröffentlichte Kristallstruktur C₂A-Domäne weist hingegen – anders als *in vitro* beschrieben – keine hohe Bindungsaffinität zu den SNARE-Proteinen Synaptotagmin-1 und SNAP-25 auf (Coppola et al. 2001; Dai et al. 2005). Eine G-zu-A-Punktmutation im kodierenden Abschnitt für die C₂A-Domäne, die im Menschen zu einer autosomal-dominanten Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (*conerod dystrophy*) CORD7 führt (Johnson et al. 2003; Michaelides et al. 2005), bewirkt u.a. eine Veränderung VGCC-Ströme an der AZ (Miki et al. 2007) sowie – untersucht in *Drosophila* – eine Zunahme des RRP (Paul et al. 2022). Die **C₂B-Domäne** scheint die Kinetik von VGCCs u.a. durch Interaktion mit deren β 4-Untereinheit zu modulieren (Kiyonaka et al. 2007; Uriu et al. 2010). Unter möglichen weiteren beschriebenen Bindungspartnern der C₂B-Domäne konnten das AZ-Kernprotein α -Liprin und das SNARE-Protein Synaptotagmin-1 durch die entschlüsselte Kristallstruktur der C₂B-Domäne nicht vollständig bestätigt werden (Coppola et al. 2001; Schoch et al. 2002; Guan et al. 2007). Fragmente beider C₂-Domänen verbessern zumindest teilweise präsynaptische Übertragung bei Defizienz aller anderen RIM-Domänen (Kaeser et al. 2011). Jüngst konnte die

Bindung der C₂B-Domäne zu in der Membran befindlichem PIP₂ nachgewiesen werden (de Jong et al. 2018).

Das zwischen den C₂-Domänen lokalisierte Prolin reiche **PxxP-Motiv** bindet an die zweite *Src homology 3* (SH)-Domäne des in Teilen zu RIM funktionell redundanten AZ-Kernproteins RIM-BP und etabliert – am ehesten zur VGCC-Lokalisation – ein womöglich durch Phasenseparation geformtes triadisches Cluster aus RIM, RIM-BP und VGCCs (Hibino et al. 2002; Acuna, Liu, and Südhof 2016; Wu et al. 2019; Kushibiki et al. 2019; Butola et al. 2021). Ein Verlust der Interaktion von RIM, RIM-BP2 mit Munc13-1 scheint die Fusion und Freisetzungswahrscheinlichkeit von SVs u.a. auch an hippocampalen MFB-Synapsen zu beeinträchtigen (Brockmann et al. 2019; Brockmann et al. 2020).

Funktionen in synaptischer Aktivität, Plastizität und Verhalten

Singuläre und doppelte KO-Studien in Mäusen der RIM1/2-Isoformen haben in den letzten beiden Jahrzehnten versucht, deren spezifischen Einzelfunktionen herauszuarbeiten. Während eine singuläre RIM1 α - oder RIM2 α -Defizienz für Mäuse vital und fortpflanzungsfähig ist, versterben diese im doppelten KO (RIM1 α/β , RIM1 $\alpha/2\alpha$) kurz nach bzw. wenige Tage nach der Geburt (Schoch et al. 2002; Schoch et al. 2006). Auf Verhaltens-ebene zeigen RIM1 α defiziente Mäuse ausgeprägte Einschränkungen im Lernverhalten (Powell et al. 2004). Neben der Beeinträchtigung von Plastizitätsmechanismen in ausgewählten inhibitorischen Verbindungen (Chevaleyre et al. 2007; Kaeser, Kwon, Chiu, et al. 2008; Lachamp, Liu, and Liu 2009) verändern die Abwesenheiten von RIM1 α und RIM1 α/β in elektrophysiologischen Messungen vor allem präsynaptisch exprimiertes Proteinkinase (PKA)-abhängiges LTP in betreffenden exzitatorischen Synapsen (Castillo et al. 2002; Lonart et al. 2003; Simsek-Duran, Linden, and Lonart 2004; Fourcaudot et al. 2008; Pelkey et al. 2008). Prominentes Exemplum ist die vorliegend untersuchte Synapse des hippocampalen MFBs auf CA3-Pyramidalzellen, deren Basalaktivität und STP unbeeinträchtigt verbleibt (Castillo et al. 2002). RIM1 α besitzt eine spezifische Bindungsstelle (S413) für u.a. PKA, die jedoch gebunden an RIM1 α nicht kausal die LTP-Veränderungen zu erklären vermag (Lonart et al. 2003; Kaeser, Kwon, Blundell, et al. 2008). Vielmehr scheint die beschriebene Interaktion der α -RIMs mit Rab3a/b relevant zu sein (Castillo et al. 1997; Huang et al. 2005; Tsetsenis et al. 2011). In Synapsen mit postsynaptischer NMDA-Rezeptor-abhängiger LTP, wie in denen der hippocampalen Schaffer-kollateralen auf CA1-Pyramidalzellen, bewirkt eine Defizienz von RIM1 α bzw. RIM1 α/β Veränderungen in Bezug auf Wahrscheinlichkeit und Kinetik der (asynchronen) Vesikelfreisetzung, des SV-*Primings* als auch der STP (Castillo et al. 2002; Schoch et

al. 2002; Calakos et al. 2004; Kaeser, Kwon, Chiu, et al. 2008). Dass diese dichotome Trennung nach prä- oder postsynaptischer LTP-Expression den spezifischen Funktionen von RIM1 α und RIM1 α/β nicht vollständig gerecht wird, lässt sich an der zerebellären Parallelfaser-zu-Purkinjezell-Synapse exemplifizieren. Diese zeigte zwar Veränderungen ihrer klassisch PKA-abhängigen LTP in den KO-Modellen (Castillo et al. 2002; Lonart et al. 2003; Simsek-Duran, Linden, and Lonart 2004), jedoch konnte eine neuere Studie diesen Phänotyp nicht reproduzieren und beschreibt eine STP-Veränderung bei RIM1 α -Defizienz (Kintscher et al. 2013). Jüngste Studien zeigen, dass die Isoformen RIM2 α/β möglicherweise über die C₂B-Domäne und in Interaktion mit RIM-BP2 spezifisch in die Lokalisation von Ca_v1.3-Kanälen an auditorischen Synapsen der sensorischen inneren Haarzelle eingebunden sind (Jung et al. 2015; Picher et al. 2017; Ortner et al. 2020). An der Synapse der Stäbchen-Photorezeptoren wurde diese Funktion von RIM2 – der dort am häufigsten exprimierten Isoform – auch für Ca_v1.4-Kanäle demonstriert (Lohner et al. 2017; Dembla et al. 2020). Auch scheint RIM2 α einen stärkeren Suppressionseffekt auf die spannungsabhängige Inaktivierung von Ca_v2.1-Kanälen zu besitzen als RIM1 α (Hirano et al. 2017). Obgleich im Gegensatz zu RIM1 α bzw. RIM1 α/β RIM2 α -KO-Mäuse alleinig keine Veränderungen in Basalaktivität und Plastizität aufweisen, fordern diese jüngsten Studien die Perspektive auf RIM2 α als in seiner Funktion redundante Isoform zu RIM1 α heraus (Schoch et al. 2006). Dahingegen wird die Funktion von RIM1 β als zu RIM1 α überlappend angenommen (Kaeser, Kwon, Chiu, et al. 2008). Nur wenige Studien widmen sich schließlich der Funktion von γ -RIMs (Wang and Südhof 2003), die zum einen, RIM3 γ und RIM4 γ betreffend, in die Verzweigung neuronaler Axone und Dendriten involviert zu sein scheinen (Alvarez-Baron et al. 2013) und zum anderen, im Fall von RIM3 γ , möglicherweise mit Ca_v1.3-Kanälen interagieren (Picher et al. 2017).

RIM und AZ-Ultrastruktur

Veränderungen, die im Rahmen von RIM-Defizienzen in unterschiedlichen Organismen, Synapsen und synaptischen Gewebepreparationen demonstriert wurden, betreffen vor allem die Größe des (gedockten) SV-Pools, dessen Lokalisation sowie die Präsenz von EDM. Eine alleinige Defizienz der Isoform RIM1 α ließ in klassisch Aldehyd fixiertem Gewebe keine ultrastrukturellen Änderungen der AZ erkennen (Castillo et al. 2002), wohingegen Kryoelektronentomographie auf eine tragende Rolle dieser Isoform für die AZ-Struktur am Beispiel von kortikalen Synaptosomen hinweist (Fernandez-Busnadiego et al. 2013). Diese zeigen eine Reduktion des (gedockten) SV-Pools sowie eine Reduktion der sog. *tethers*. Sowohl in klassisch Aldehyd fixierten als auch hochdruckgefrorenen

hippocampalen Zellkulturen weisen die AZs bei Defizienz von RIM1, RIM2 bzw. RIM1/2 einen reduzierten Pool an gedockten SVs auf (Deng et al. 2011; Kaeser et al. 2011; Zarebidaki et al. 2020). Ein ähnliches Bild einer hauptsächlich Reduktion des in Teilen delokalisierten gedockten SV-Pools sowie einer Reduktion des EDMs (reduzierte T-bars) weisen AZs bei Defizienz der RIM-Homologe in der Fliege (*unc10*, *Fife*) und im Fadenwurm (*unc10*, *Clarinet*) auf (Koushika et al. 2001; Gracheva et al. 2008; Stigloher et al. 2011; Xuan et al. 2017; Bruckner et al. 2017).

3.5 Hippocampale Moosfaserboutons

3.5.1 Hippocampus

Anatomie der hippocampalen Formation

Auf morphologischer Ebene differenziert man zwischen Hippocampus und Hippocampusformation (*Formatio hippocampi*), zu welcher der Hippocampus als anatomischer Bestandteil zählt. Der *Hippocampus proper* umfasst das CA, die *Formatio hippocampi* zusätzlich *Gyrus dentatus* (DG), *Subiculum*, *Presubiculum*, *Parasubiculum* und *Area entorhinalis* (Andersen 2007). Das CA wird zytoarchitektonisch nach klassischer Definition in CA1-CA4 differenziert (Lorente De Nó 1934). In neueren Einteilungen, insbesondere des humanen Hippocampus, entsprechen die hilären Pyramidalzellen der CA4-Region aufgrund ihrer anatomischen Verwandtschaft zu CA3-Pyramidalzellen der hilären CA3-Region (CA3h) (Lim et al. 1997; Ding and Van Hoesen 2015).

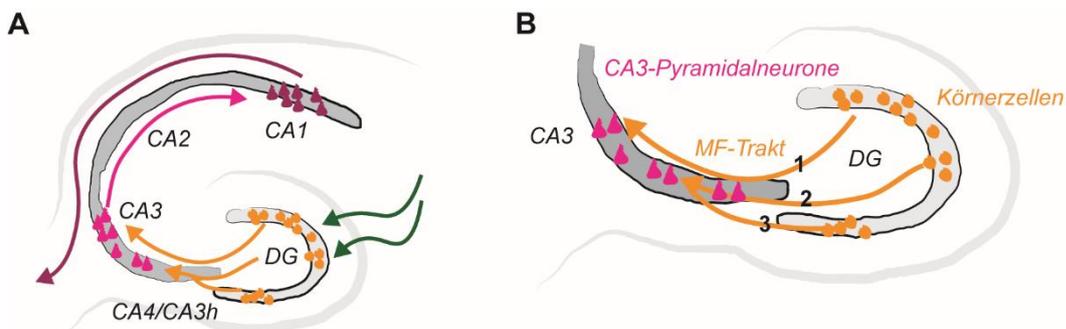


Abbildung 5. Der trisynaptische Schaltkreis des Hippocampus.

(A) Vereinfachte Schemazeichnung des trisynaptischen Schaltkreises im Hippocampus. Das Konzept nimmt eine unidirektionale Verbindung aus drei Synapsen an: i) der Synapse zwischen Afferenzen aus dem entorhinalen Cortex (grüne Pfeile) und der Körnerzellen des *Gyrus dentatus* (DG) (orange), ii) der Synapse zwischen den als Moosfasern (MF, orange-farbiger Pfeile) bezeichneten Axonen der Körnerzellen (orange) und den CA3-Pyramidalzellen (magenta), iii) der Synapse zwischen den Schaffer-Kollateralen (magenta-farbiger Pfeil) von Axonen der CA3-Pyramidalzellen und der CA1-Pyramidalzellen (dunkelrot). (B) Vereinfachte Schemazeichnung der supra- (1), intra- (2) und infrapyramidalen (3) MF-Bündel, die in die CA3-Region verlaufen. Weitere in DG und CA3 lokalisierte Neuronentypen, z.B. Mooszellen, Parvalbumin positive Korbzellen und Somatostatin positive Interneurone, sind in dieser Zeichnung nicht dargestellt.

Als vereinfachtes anatomisches Modell der synaptischen Projektionen dient die Annahme des exzitatorisch trisynaptischen Schaltkreises (**Abbildung 5A**), beginnend mit dem *Tractus perforans* als exzitatorische Projektion aus dem entorhinalen Cortex auf die Körnerzellen (*granule cells*, GC) im DG. Diese senden ihre als Moosfasern (MF) bezeichneten Axone in mehreren Bündeln zu den Pyramidalzellen der CA3-Region. Die Axone der CA3-Pyramidalzellen bilden über Kollateralen (Schaffer-Kollateralen) synaptische Verbindungen zu den Pyramidalzellen der CA1-Region aus. Intrahippocampal existieren zahlreiche synaptische Assoziationsverbindungen, die insbesondere das Autoassoziationssystem in der CA3-Region bedienen (Witter 2007).

Deklaratives Gedächtnis, räumliche Orientierung und Verhalten

Der Hippocampus ist nach übereinstimmender Forschungsmeinung für die Verschlüsselung, Speicherung, das Wiederabrufen sowie die Ordnung von individuellen deklarativen (expliziten) Gedächtnisinhalten zuständig, die ein Individuum im Takt von Millisekunden in Zeit und Raum sammelt (Scoville and Milner 1957; O'Keefe and Nadel 1978; Lisman et al. 2017; Buzsaki and Tingley 2018). Ein für die Formation des (räumlichen) Langzeitgedächtnisses höchstwahrscheinlich relevanter synaptischer Mechanismus ist die im Hippocampus wegweisend entdeckte und untersuchte LTP (Bliss and Lomo 1970, 1973; Bliss and Gardner-Medwin 1973; Lomo 2018; Nicoll 2017; Dringenberg 2020). Seit den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde die hippocampale Forschung ebenso von der Untersuchung der sowohl ego- als auch allozentrischen räumlichen Orientierung eines Lebewesens geprägt. Als funktionelle Korrelate wurden ubiquitär im Hippocampus lokalisierte Ortszellen (*place cells*) (O'Keefe and Dostrovsky 1971; O'Keefe and Nadel 1978) und im medialen entorhinalen Cortex existente Gitterzellen (*grid cells*) identifiziert (Fyhn et al. 2004; Hafting et al. 2005; Fyhn et al. 2007). Ortszellen weisen für örtlich spezifische Lokalisationen (*place fields*) selektiv erhöhte Feuerungsraten auf. Daraus resultiert die Generierung von flexibel adaptierbaren Ortskartierungen (*place maps*). Gitterzellen bilden bei Bewegung an zueinander hexagonal orientierten Positionen eine kontextunabhängige Referenzkartierung.

Im Hippocampus besteht eine strukturelle und funktionelle Heterogenität der synaptischen Verbindungen entlang einer dorsoventralen als auch transversalen Achse sowie interhemisphärisch, z.B. mit Implikationen auf angeborenes Angst-, Explorations-, Lernverhalten und emotionale Gedächtniskontrolle (Witter 2007; Kheirbek et al. 2013; El-Gaby, Shipton, and Paulsen 2015; Jordan 2020; Pauli et al. 2021). Kontrovers wird diskutiert, ob adulte Neurogenese im (menschlichen) DG zu hippocampalen Funktionen beiträgt (Zhao, Deng, and Gage 2008; Snyder 2019; Toda et al. 2019).

3.5.2 Moosfasertrakt

Axonale Projektionen

Die Axone der exzitatorischen (glutamatergen) Körnerzellen besitzen außergewöhnlich große, gelappte, vielgestaltige Endigungen (Terminale, Boutons), die an Moospflanzen erinnern und daher von Cajal als Moosfasern (MF) bezeichnet wurden (Cajal 1911). Sie verlaufen organisiert in infra-, intra- und suprapyramidalen Bündeln zu den Pyramidalzellen der CA3-Region und innervieren deren apikale Dendriten (**Abbildung 5B**) (Blackstad and Kjaerheim 1961; Laatsch and Cowan 1966; Amaral and Dent 1981). Ein hoher Anteil der Terminalen befindet sich in der suprapyramidalen Cortexschicht, die bedingt durch die fehlende axonale Myelinisierung der MF als *Stratum lucidum* bezeichnet wird. Darüber hinaus projizieren MF sowohl auf sog. Mooszellen im *Hilum* (Frotscher, Soriano, and Misgeld 1994) als auch GABAerge Interneurone in *Hilum* und *Stratum lucidum* (Acsády et al. 1998; Szabadics and Soltesz 2009). Die räumliche Organisation der MF besitzt eine hohe Komplexität: Die proximal-distale Termination der MF unterscheidet sich sowohl transversal als auch longitudinal (Lorente De Nó 1934; Kilmer and McLardy 1970; Swanson, Wyss, and Cowan 1978; Claiborne, Amaral, and Cowan 1986; Witter 2007), wodurch sich mögliche funktionelle Neuronenpopulationen innerhalb des DGs und der CA3-Region ergeben (Leutgeb et al. 2007; Lee et al. 2015; Lu et al. 2015).

Synaptische Terminalen

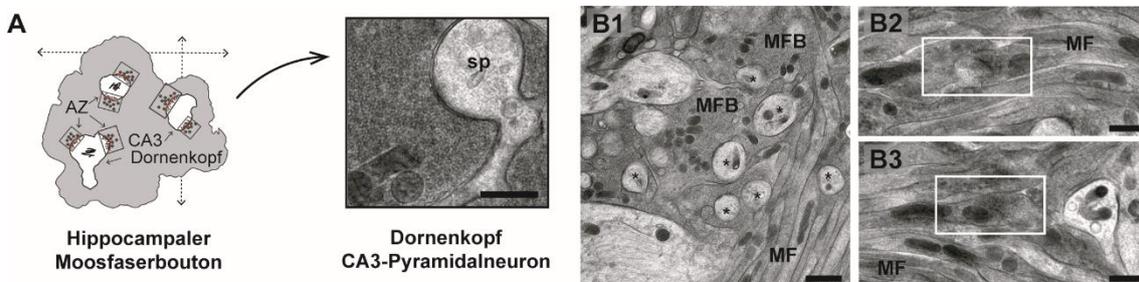


Abbildung 6. Synaptische Terminalen des hippocampalen Moosfasertraktes.

(A) Linksseitig: Schemazeichnung eines großen MFBs, der sog. Dornenköpfe (*spine heads*, sp) der Dendriten von CA3-Pyramidalzellen einhüllt und mit diesen Synapsen inklusive zugehöriger AZ ausbildet. Rechtsseitig: Elektronenmikrographie eines in einem MFB lokalisierten Dornenkopfes aus einem HPF/FS-Präparates. (B1) Elektronenmikrographie von Axonen des MF-Traktes (MF) und unmittelbar benachbarter MFBs aus einem HPF/FS-Präparat. (B2-3) Elektronenmikrographien, die kleinere *en passant* Synapsen (weißer Kasten) innerhalb des axonalen MF-Bündels illustrieren. Beide Aufnahmen entstammen einem HPF/FS-Präparat. Maßstab: (A, B2-3) 500 nm, (B1) 1 µm. Die linksseitige Schemazeichnung des Bildteils A ist in modifizierter Form dem Bildteil D, Abbildung 1, der Originalpublikation der Promovendin entnommen (Lichter et al. 2022).

Morphologisch komplexe, Vesikel gefüllte große Moosfaserboutons (MFBs) von 2-5 μm Durchmesser bilden die häufigste Terminale der MFs und umhüllen postsynaptische Spezialisierungen der apikalen Dendriten von CA3-Pyramidalzellen, sog. dornenartige Ausstülpungen (**Abbildung 6A, 6B1**) (*spiny* oder *thorny excrescences*) (Amaral and Dent 1981; Rollenhagen et al. 2007; Wilke et al. 2013). Große MFBs können ebenso auf hilären Mooszellen terminieren (Acsády et al. 1998). Innerhalb der CA3-Region bildet eine MF in spezifischen Abständen ca. 10-15 MFBs aus, die sich wiederum variabel zu kleineren satellitenartigen MFBs verzweigen (Galimberti et al. 2006; Galimberti et al. 2010). Eine weitere Terminale bilden kleinere *en passant* Boutons (**Abbildung 6B1-2**) sowie filopodienartige Ausstülpungen (*filopodial extensions*) der MFBs, die Dendriten der beschriebenen GABAergen Interneurone innervieren (Acsády et al. 1998; Szabadics and Soltesz 2009).

3.5.3 Synapse des großen hippocampalen Moosfaserboutons

Synapsen des großen hippocampalen MFBs gehören aufgrund ihrer komplexen Morphologie und Physiologie zu den außergewöhnlichsten Synapsen des zentralen Nervensystems. Bis heute sind sie in ihrer Struktur-Funktionsbeziehung nicht vollständig entschlüsselt. Im MFBs der adulten Maus finden sich in der Mehrheit 2-6 AZs von komplexer Form pro dornenartiger dendritischer Ausstülpung (Wilke et al. 2013), die in ihrer Größe entlang der dorsoventralen Achse variieren (Pauli et al. 2021). Eine einzelne CA3-Pyramidalzelle erhält Input von ca. 50 Körnerzellen (Amaral, Ishizuka, and Claiborne 1990). In MFBs finden sich außergewöhnlich große SV-Pools, die auf Basis von Kapazitätsmessungen auf ca. 1400 SVs pro MFB geschätzt werden (Geiger and Jonas 2000; Hallermann et al. 2003).

MFB-Synapsen gelten als konditionale Detonator-Synapsen, die unter bestimmten Bedingungen die Aktivität von CA3-Pyramidalzellen direkt kontrollieren können (Henze, Wittner, and Buzsaki 2002; Nicoll and Schmitz 2005). Die Basis für diese Annahme bilden ihre komplexen physiologischen Eigenschaften, die durch *in vitro* und *in vivo* Messungen insbesondere in Ratte und Maus herausgearbeitet wurden. Auf der einen Seite besitzen MFB-Synapsen durch ihre ausgeprägte *paired-pulse*-Fazilitation, Frequenzfazilitation (FF) und posttetanische Potenzierung (PTP) eine große synaptische Stärke (Salin et al. 1996; Dobrunz and Stevens 1999; Nicoll and Schmitz 2005; Jung and McNaughton 1993). *Paired-pulse*-Fazilitation, FF und PTP stellen dabei STP-Mechanismen dar. Auch wurde demonstriert, dass physiologisch auftretendes, hochfrequentes Feuerungsverhalten der Körnerzellen Aktivität in CA3-Pyramidalzellen initiieren kann (Henze, Wittner, and Buzsaki 2002). Auf der anderen Seite zeigten andere Studien, dass

MFB-Synapsen sowohl eine geringe Freisetzungswahrscheinlichkeit von SVs als auch eine lose Kopplungsdistanz zwischen VGCC und Calciumsensor besitzen, und dass ein einzelnes EPSP nicht ausreicht, um die Aktivität von CA3-Pyramidalzellen zu kontrollieren (Jonas, Major, and Sakmann 1993; Lawrence, Grinspan, and McBain 2004; Vyleta and Jonas 2014; Kim et al. 2012). Im Gegensatz zu anderen Säugersynapsen des zentralen Nervensystems besitzen MFB-Synapsen nach übereinstimmender Forschungsmeinung eine präsynaptisch exprimierte, zu einem Großteil NMDA-Rezeptor unabhängige LTP auf. Diese basiert u.a. auf einem cAMP-PKA-abhängigen Signalweg (Nicoll and Schmitz 2005). Das Feuerungsverhalten der Synapsen scheint in die Verarbeitung und das Abrufen des räumlichen Gedächtnisses und somit in das räumliche Verhalten eingebunden zu sein (Lisman 1999; Rebola, Carta, and Mulle 2017; Hainmueller and Bartos 2020). Zugrunde liegende Mechanismen sind u.a. die Mustertrennung (*pattern separation*) in Körnerzellen und die Mustervervollständigung (*pattern completion*) in CA3-CA3-Synapsen (Rebola, Carta, and Mulle 2017; Hainmueller and Bartos 2020).

3.6 Ultrastrukturanalyse von Aktiven Zonen

3.6.1 Rationale

Die elektronenmikroskopische Analyse von AZ-Ultrastruktur ist in die grundsätzliche Annahme einer Beziehung aus synaptischer Struktur und Funktion gebettet, deren Erforschung in einem optimalen Fall symbiotische und/oder korrelative Erkenntnis über den Vorgang der synaptischen Transmission und der Vesikelfreisetzung in höchster Auflösung zu liefern vermag. Wie kann eine möglichst native Visualisierung einer AZ-Architektur gelingen? Während aus modernen lichtmikroskopischen Verfahren der superauflösenden Mikroskopie (*super-resolution microscopy*), z.B. die direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (*direct stochastic optical reconstruction microscopy, dSTORM*), Erkenntnisse zur molekularen 2D/3D-Anordnung einzelner oder zugleich mehrerer AZ-Proteine auf Ebene eines einzelnen Moleküls gewonnen werden können (Werner, Sauer, and Geis 2021), vermitteln ausgewählte EM-Techniken nanoskopische Blickwinkel auf AZ-Ultrastruktur inklusive einer Darstellung der AZ-Flächen, SVs und EDM. Für eine stereogeometrische Interpretation der AZ-Architektur, der molekularen Konfigurationen der AZ-Proteine sowie einer zeitlich und örtlich hochaufgelösten Nanophysikologie einer Vesikelfreisetzung sind diese Bilddaten unerlässlich. Um die bisher unbekannte AZ-Ultrastruktur des hippocampalen MFBs im akuten Hippocampuschnitt adulter Mäuse in möglichst nativem Zustand zu untersuchen, wurde in vorliegender Dissertation der Goldstandard einer nativen synaptischen Gewebepräparation für EM, die

Technik der Hochdruckgefrierung und Gefriersubstitution (HPF/FS-Technik), mit einem nanoskopischen 3D EM-Verfahren, dem der Elektronentomographie, etabliert und kombiniert.

3.6.2 Hochdruckgefrierung und Gefriersubstitution

Die schnelle Kryoimmobilisation in Form der HPF/FS gilt als Goldstandard der synaptischen Gewebepreparation für elektronenmikroskopische Präparate (Weimer 2006; Stigloher et al. 2011; Zhao et al. 2012; Imig and Cooper 2017; Borges-Merjane, Kim, and Jonas 2020; Imig et al. 2020; Maus et al. 2020; Markert et al. 2020). In dem von Hans Moor und Udo Riehle erstmalig 1968 vorgestellten Verfahren wird das im Präparat befindliche Wasser in weniger als 10 ms unter hohem Druck (> 2100 bar) und schneller Temperaturänderung ($> 20\,000$ K/s) in einen amorphen, glasähnlichen Zustand (-196°C) transformiert bzw. vitrifiziert (Moor and Riehle 1968; Moor 1987). Diese Kombination verhindert eine Induktion der Eiskristallnukleation (Kanno, Speedy, and Angell 1975) und stabilisiert die zellulären Gewebekomponenten simultan. Modernste Ausführungen der HPF-Vorrichtungen lassen gegenwärtig die Manipulation synaptischer Aktivität mittels Optogenetik (*flash-and-freeze*) (Watanabe, Rost, et al. 2013; Watanabe, Liu, et al. 2013) oder Elektrostimulation (*zap-and-freeze*) zu (Kusick et al. 2020). *Flash-and-freeze*-Verfahren wurden in der Endphase vorliegender Dissertation von Arbeitsgruppen ebenso auf die Untersuchung synaptischer Aktivität hippocampaler MFB-Synapsen in akuten Hirnschnitten und organotypischer Schnittkultur der Maus angewandt (Borges-Merjane, Kim, and Jonas 2020; Maus et al. 2020; Imig et al. 2020). In dem temperaturkontrollierten Verfahren der Gefriersubstitution können die Proben konsekutiv für die Niedrigvakuumsäule des EMs dehydriert und mit u.a. vergleichsweise geringen Mengen von Aldehyden mild fixiert werden, i.a. (Markert et al. 2020). Dies soll eine Agglutination von Lipiden bzw. Alteration der nativen Proteinstruktur verhindern, wie sie typischerweise bei einer klassischen Aldehyd-basierten Fixation auftritt (Griffiths 1993). Darüber hinaus werden die AZ-Ultrastruktur bzw. die zu analysierenden AZ-Prozesse so vor chemisch induzierten, Artefakt behafteten Veränderungen bewahrt (Rostaing et al. 2006; Tanaka et al. 2010; Südhof 2012).

3.6.3 Elektronentomographie

Elektronentomographie (ET) ist eine Sonderform der EM, bei der Elektronenmikrographien der AZ durch eine in Winkeln definierte Neigung (*tilt*) des Probenhalters perpendicular zum Elektronenstrahl aufgenommen werden (McIntosh, Nicastro, and Mastrorade 2005). Durch Verrechnung der Einzelaufnahmen aus unterschiedlichen Winkeln (*tilt*-

Serie) erzeugen mathematische Algorithmen 3D-Elektronentomogramme mit nahezu isotroper Auflösung in allen räumlichen Achsen (Kremer, Mastrorade, and McIntosh 1996). Diese überwinden die räumliche Limitation einer 2D-Projektion der intrinsisch 3D biologischen Struktur und ermöglichen so den 3D-Kontext der AZ-Ultrastruktur bis auf eine Ebene eines individuellen gedockten SVs und seines EDMs in nanoskopischer Auflösung zu untersuchen (Stigloher et al. 2011; Imig et al. 2014; Imig and Cooper 2017; Maus et al. 2020; Imig et al. 2020; Markert et al. 2020).

3.7 Zielsetzung der Dissertation

Zielsetzung der vorliegenden Dissertation ist die Untersuchung des Einflusses einer RIM1 α -Defizienz – der in der CA3-Region am höchsten exprimierten Isoform – auf die Ultrastruktur AZs großer hippocampaler MFBs. Diese Arbeiten umfassen eine Etablierung der HPF/FS-Technik für akute Hirnschnitte des adulten Maushippocampus – der Standardpräparation für elektrophysiologische *patch-clamp*-Ableitungen von synaptischer Aktivität auf Einzelzellebene – und einer hochstandardisierten elektronentomographischen Darstellung der ausgewählten AZs. Dabei soll eine quantitative Analyse der bisher für diese Gewebepräparation unbekannten 3D AZ-Ultrastruktur im Wildtyp und RIM1 α ^{-/-}-Tier mit Hilfe von programmiergestützten stereogeometrischen Berechnungen erfolgen. Dies geschieht unter besonderer Beachtung von RIM1 α als zentraler Isoform des AZ-Kernproteins RIM. Auf methodischer Ebene fußt die Rationale insbesondere auf der Anwendung der nativeren, jedoch herausfordernden Probenpräparation von 200 μ m dicken akuten Hippocampusschnitten mittels HPF/FS-Technik und einer hohen Standardisierung der Datenaufnahme in einer heterogenen, anspruchsvollen Synapse. Auf Basis der dargelegten Forschungserkenntnisse werden folgende Fragestellungen in dieser Dissertation explizit adressiert:

- i) Ist eine suffiziente Erhaltung der AZ-Ultrastruktur in großen hippocampalen MFBs mit Hilfe der hochmodernen HPF/FS-Technik im Vergleich zur klassischen ausschließlich Aldehyd-basierten Fixation möglich, die quantitativen Ultrastrukturanalysen sachdienlich ist?
- ii) Welchen Einfluss besitzt die Defizienz von RIM1 α für die Gesamtheit der AZ-Ultrastruktur, im Besonderen bezogen auf die AZ-Membranfläche und ihre Ausdehnung sowie auf bisher nicht untersuchte transsynaptische Entitäten, wie den synaptischen Spalt?
- iii) Welchen Einfluss besitzt die Defizienz von RIM1 α auf die Gesamtheit des gedockten SV-Pools inklusive dessen Größe und Lokalisation sowie auf einen individuell gedockten SVs und sein EDM?
- iv) Welchen Beitrag hat die Defizienz von RIM1 α in einer ultrastrukturellen 2D-/3D-Organisation des gesamten SV-Pools an der AZ des großen hippocampalen MFBs?

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Lösungen und Chemikalien

Zum Ansetzen von Lösungen sowie im weiteren Experimentverlauf wurde doppelt destilliertes Wasser (d_dH_2O) verwendet, welches vorab durch Reinigungssysteme (z.B. Milli-Q[®]) behandelt worden war. Für die **Präparation der akuten Hirnschnitte** und **HPF-Probenpräparation** wurden folgenden Lösungen und Chemikalien eingesetzt:

Chemikalie	Hersteller	Kennung
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Sigma-Aldrich	223506; CAS: 10035-04-8
Carbogen (95% O_2 /5% CO_2)	Linde Gas	-
Glucose	Sigma-Aldrich	G7021; CAS: 50-99-7
Isofluran (1 ml/ml)	CP-Pharma	Y0000858
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich	P9333, CAS: 7447-40-7
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Sigma-Aldrich	M9272; CAS: 7791-18-6
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich	S7653; CAS: 7647-14-5
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Sigma-Aldrich	S5761; CAS: 144-55-8
Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Aldon CORP SE	SS0756-500GR; CAS: 7558-80-7
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Sigma-Aldrich	PVP40; CAS: 9003-39-8
Sucrose	Sigma-Aldrich	S0389; CAS: 57- 50-1
Flüssiger Stickstoff (LN_2)	Linde Gas	-
Sylgard 184	Sigma-Aldrich	761036; CAS: N/A
Lösungen		
<i>Artificial cerebrospinal fluid</i> (ACSF) (pH 7,3, äquilibriert mit Carbogen)	125 mM NaCl, 25 mM $NaHCO_3$, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH_2PO_4 , 25 mM Glucose, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$	
ACSF + Sucrose	ACSF, 75 mM Sucrose	
15% PVP in ACSF	ACSF, PVP	

Für die **Gefriersubstitution** und die **Probeneinbettung** wurden die Lösungen nach einem Protokoll von Stigloher et al. angesetzt (Stigloher et al. 2011). Epon wurde entsprechend der Bedienungsanleitung der Firma Serva Electrophoresis GmbH aus Glycidether 100, Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid (DDSA), Methylnadinsäureanhydrid (MNA) und 2,4,6-Trisdimethylaminomethylphenol (DMP-30) zubereitet.

Chemikalie	Hersteller	Kennung
Anhydriertes Aceton, 99%	AppliChem	481007; CAS: 67-64-1
10% anhydr. Glutaraldehyd (GA) in Aceton	EM Sciences	16530; CAS: N/A
Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid (C ₁₆ H ₂₆ O ₃ , DDSA)	Serva Electrophoresis GmbH	20755.02; CAS: 26544-38-7
25% GA-Lösung, wässrig	EM Sciences	16220, CAS: N/A
Glycidether 100 (EPON 812)	Serva Electrophoresis GmbH	21045.02, CAS: 90529-77-4
Methylnadinsäureanhydrid (C ₁₀ H ₁₀ O ₃ , MNA)	Serva Electrophoresis GmbH	29452.01; CAS: 25134-21-8
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (C ₁₅ H ₂₇ N ₃ O, DMP-30)	Serva Electrophoresis GmbH	26975.03, CAS: 90-72-2
Osmiumtetroxid (OsO ₄), kristallin, 99,95 %, 0,5 g	Science Services	E19110, CAS: 20816-12-0
Tanninsäure (TA)	AppliChem	141065, CAS: 1401-55-4
Lösungen		
FS-Lösung 1	0,5% GA, 0,1% TA in Aceton	
FS-Lösung 2	2% OsO ₄ in Aceton	
Epon	Komponente A: 62 ml Glycidether 100, 100 ml DDSA Komponente B: 100 ml Glycidether 100, 89 ml MNA Komponente C: 0,15 ml DMP-30	
Einbettungslösung	50/90/100% Epon in Aceton	

Für die **Positivkontrastierung** der Ultra- und Semidünnschnitte wurden folgende Lösungen und Chemikalien verwendet:

Chemikalie	Hersteller	Kennung
Ethanol absolut	Chemsolute	2246.2500, CAS: 64-17-5
Natriumhydroxid (NaOH), Pellet	Sigma-Aldrich	1.06482, CAS: 1310-73-2
Uranylacetatdihydrat (UA)	Merck aktuell z.B. Science Services	8473 E22400, CAS: 6159-44-0 (541-09-3)

Lösungen

Kontrastierlösung 1	5% UA in Ethanol absolut
Kontrastierlösung 2 (Reynolds 1963)	50% Reynolds Lösung in d_dH_2O

4.1.2 Labormaterial

Zur experimentellen Durchführung und als Zubehör zu den technischen Geräten wurde spezielles Labormaterial eingesetzt, das im Folgenden gesondert aufgeführt wird. Selbstgebaute Konstrukte werden in der entsprechenden Sektion in den Methoden beschrieben.

Labormaterial	Hersteller	Kennung
<i>Präparation der akuten Hirnschnitte und HPF-Proben</i>		
Chirurgische Schere, groß	Fine Science Tools	14001-14
Chirurgische Schere, klein	Fine Science Tools	14060-094
Cyanoacrylat (Sekundenkleber)	Uhu	-
Einmalkanüle, 20G	B. Braun	5507660
Einmalkanüle, 23G	B. Braun	5507694
Einmalkanüle, 27G	B. Braun	5507652
Künstlerpinsel, Synthetik	Rico Design	7320.001
Mikrospatel, gerade	Fine Science Tools	10094-13
Pasteurpipette, Glas	Sigma-Aldrich	S6143-250EA
Petrischale, 15 x 100 mm	Sigma-Aldrich	P5731-500EA
Pinzette, gebogen	Fine Science Tools	11272-30
Rasierklinge, Modell Sword/Silver Blue	Wilkinson, Gillette	-
Skalpellhalter 1	Fine Science Tools	10004-13

Skalpellhalter 2	Fine Science Tools	10003-12
Skalpellklinge, Größe 11	Fine Science Tools	10011-00
Skalpellklinge, Größe 21	Fine Science Tools	10022-00
Tuberkulinspritze, 1 ml	BD Medical	STB2

<i>HPF</i>		
Trägerplättchen, Typ A, Ø 3 mm, 200 µm	Baltic Präparation	BP2135-3
Trägerplättchen, Typ B, Ø 3 mm, 300 µm	Baltic Präparation	BP2136-3
Probenhalterung, Halbzylinder	Leica Microsys- tems	16770135
Probenhalterung, Platte	Leica Microsys- tems	16770136
<i>Einbettung, Ultramikrotomie</i>		
ACLAR®, Dicke 0,19812 mm	Ted Pella	10501-10
Diamentmesser, Modell Histo	Diatome AG	Sonderanfertigung
Kupergrid, 50 Mesh	Plano	G2050C
Kupfergrid, 2 x 1 mm	Plano	G2500C

4.1.3 Geräte

Es wurden folgende technische Geräte zur Durchführung der experimentellen Schritte verwendet:

Experiment	Gerät	Hersteller
Akute Hirnschnitte	Leica VT1200s	Leica Microsystems
HPF	Leica HPM100	Leica Microsystems
FS	Leica AFS2	Leica Microsystems
Ultramikrotomie	Leica EM UC7	Leica Microsystems
Kohlestoffbeschichtung	CCU-010	Safematic
EM	JEM-2100	Jeol Ltd.
Kamerasystem	TemCam F416 4k x 4k	Tietz Video and Image Processing Systems

4.1.4 Software

Elektronenmikroskopie

Zur Steuerung des Transmissionselektronenmikroskops (TEM) JEM-2100 (JEOL) und zur Bildaufnahme wurde die Software EM-MENU 4.0 (Tietz Video and Image Processing Systems) genutzt. Zur Aufnahme von Tiltserien wurde die SerialEM Software (Version 3.7) verwendet (Mastrorade 2005). Die Tiltserie wurde mit der Software IMOD und seinen Funktionen eTomo (Tomogrammrekonstruktion) und 3Dmod (Modellerstellung) bearbeitet (Kremer, Mastrorade, and McIntosh 1996).

Programmierung

Die Programmierskripte wurden in der Programmiersprache Python (Version 3.7 und Version 3.9) verfasst. Zur Erstellung der Programmierskripte wurde die webbasierte Programmierungsumgebung Jupyter Notebook (Kluyver et al. 2016) in der Distribution Anaconda3 2019.10 und 2021.11 genutzt. Zur Berechnungen von stereogeometrischen Daten an der AZ wurden in die Programmierskripte Softwarepakete integriert, die mathematische Funktionen oder definierte geometrische Objekte zur Berechnung enthalten: „numpy“ (Harris et al. 2020), „scikit-learn“ (Pedregosa et al. 2011) und „shapely“ (Gillies et al. 2007). Die Programmierskripte sind dem **Appendix** zu entnehmen und sowohl auf der Entwicklungsplattform „GitHub“ als auch unter einem *Digital Object Identifier* (DOI) hinterlegt: 10.5281/zenodo.6952807 (Lichter and Kollmannsberger 2022). Die Programmierskripte sind mit einer GNU *General Public License* Version 3.0 auf den Namen der Promovendin sowie Prof. Dr. Philip Kollmannsberger lizenziert.

Statistik

Statistische Analysen wurden mit den Programmen Sigma Plot 14 (Systat Software GmbH) und OriginPro 2021 (Origin Lab), zweidimensionale stereologische Quantifikationen mit Fiji (Version v1.53n, (Schindelin et al. 2012)) durchgeführt. Für die Modellierung sowie für *Bootstrapping*-Analysen wurden Programmierskripte in der Programmiersprache Python (Version 3.9) unter Integration des Softwarepakets „statsmodels“ (Version v.0.13.2, (Seabold and Perktold 2010)) erstellt.

Visualisierung

Für die Standardisierung der hippocampalen Schnittebene sowie zur Visualisierung des Mausgehirns wurde der *Allen Mouse Brain Atlas* (Version: Mouse, Adult, 3D coronal) genutzt. Zur Erstellung der statistischen Graphen wurde OriginPro 2021 (Origin Lab) verwendet. Die statistischen Graphen, die die in Python durchgeführten Modellierungsrechnungen visualisieren, wurden mit Hilfe der Softwarepakete „matplotlib“ (Hunter 2007) und „dabest“ (Ho et al. 2019) erstellt. Alle verwendeten Elektronenmikrographien wurden von der Promovendin selbstständig aufgenommen. Die grafischen Zeichnungen, die statistischen Graphen und Elektronenmikrographien wurden mit Hilfe von Adobe Illustrator 2021 (Adobe Creative Cloud) zu finalen Abbildungen zusammengestellt.

4.2 Methoden

4.2.1 Allgemeines

Vorliegendes Kapitel ist im Vergleich zur Originalpublikation (Lichter et al. 2022) durch experimentelle Beschreibungen und Abbildungen erweitert. Der Abschnitt ist eine Erstbeschreibung der experimentellen Abläufe für die Ultrastrukturanalyse von AZs des hippocampalen MFBs im akuten Hirnschnitt der adulten Maus. Alle Datenanalysen wurden von der Promovendin verblindet zum Genotyp der Tiere ausgewertet.

4.2.2 Ethik- und Versuchstiervotum

Alle Experimente wurden nach den deutschen Vorgaben und Richtlinien, nach der EU-Direktive 2010/63/EU und den *United States Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals* für Tierexperimente durchgeführt. Der Tierversuch wurde durch die Regierung von Unterfranken als verantwortliche Behörde genehmigt (Tierversuchsgenehmigung RUF-55.2.2.-2532-2-571-11).

4.2.3 Versuchstiere

Zur Etablierung der Methodik, zur experimentellen Analyse und Versuchsreplikation wurden insgesamt 15 männliche RIM1 α *Knock-out* Tiere (RIM1 $\alpha^{-/-}$) und 19 männliche Wildtypiere (RIM1 $\alpha^{+/+}$) aus heterozygoten Verpaarungen von Mäusen der Linie B6;129P2-Rims1^{tm1Sud}/J (RIM1 α *Knock-out*, (Schoch et al. 2002)) prozessiert. Die Tiere waren zwischen 12-19 Wochen alt. Zwischen Juni 2017 und Mai 2018 wurden für die Untersuchungen sechs unabhängige Gewebepräparationen an der Hochdruckgefriermaschine durchgeführt. Für die experimentelle Analyse der Aktiven Zonen am hippocampalen Moosfaserbouton wurden drei RIM1 $\alpha^{-/-}$ -Tiere und drei Wurfgeschwister vom Wildtyp eingeschlossen. Das Alter der Tiere betrug 13-19 Wochen.

4.2.4 Übersicht der experimentellen Abläufe

Der Experimentablauf zur Untersuchung RIM1 $\alpha^{-/-}$ und RIM1 $\alpha^{+/+}$ AZs des großen hippocampalen MFBs (**Abbildung 7**) gliederte sich in die Präparation akuter Hirnschnitte der Mäuse am Vibratom (**Abbildung 7A**) unter strenger Standardisierung der Hirnschnitte auf den dorsalen linken Hippocampus (**Abbildung 7B**) und der Vorbereitung der akuten Hirnschnitte für die HPF-Maschine. Daran schloss der HPF-Vorgang an mit darauffolgender FS über sieben Tage. Die Einbettung der Proben erfolgte in einer für das hippocampale Gewebe spezifischen Flacheinbettung, sodass eine für den hippocampalen Moosfasertrakt gezielte Ultramikrotomie erfolgen konnte (**Abbildung 7C**). Dabei wurde eine strenge Standardisierung der Aufnahmeposition für ET auf die AZs der Synapse

zwischen großem MFB und den Dornenköpfen der CA3b-Pyramidalzellen durchgeführt (**Abbildung 7C**). Die durch Elektronentomographie (**Abbildung 7D**) gewonnenen Elektronentomogramme der Präsynapse wurden mit Hilfe von IMOD-Modellen durch programmiergestützte Analyse ausgewertet, um die Defizienz von RIM1 α quantitativ an den AZs des großen hippocampalen MFBs zu untersuchen (**Abbildung 7E**).

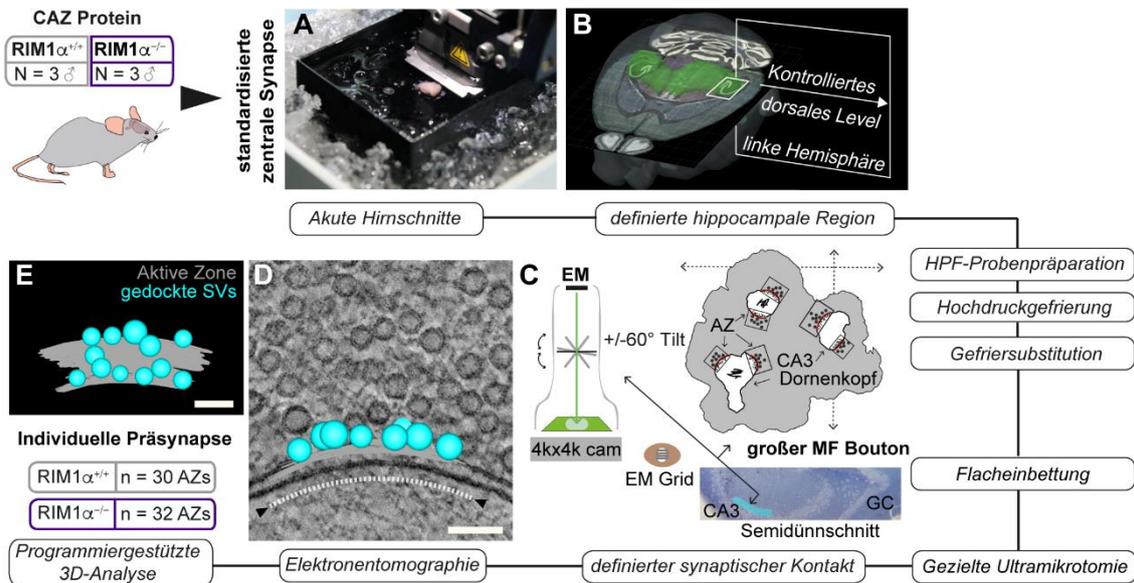


Abbildung 7. Experimentelle Abläufe zur Untersuchung der Aktiven Zonen des großen MFBs in RIM1 $\alpha^{-/-}$ und RIM1 $\alpha^{+/+}$.

(A) Präparation akuter Hirnschnitte der Maus. (B) Standardisierung der hippocampalen Akut-schnitte auf den dorsalen linken Hippocampus. Die Darstellung ist dem *Allen Reference Atlas – Mouse Brain 3D coronal*, verfügbar unter atlas.brain-map.org (zuletzt aufgerufen am 22.08.22), für den Zweck einer wissenschaftlichen Illustration entnommen. (C) Standardisierte elektronentomographische Aufnahme an den AZs des großen hippocampalen MFBs im *Stratum lucidum* der CA3-Region. (D) Elektronentomographischer Schnitt einer AZ mit integrierter IMOD-Modellierung in RIM1 $\alpha^{+/+}$. Die weiße Linie zwischen den Pfeilköpfen gibt die Ausdehnung der postsynaptischen Filamente an, die zur Definition der AZ dienen. (E) IMOD-Modell einer AZ des in (D) gezeigten elektronentomographischen Schnittes. Maßstab: (D, E) 100 nm. Die Abbildung ist eine modifizierte und übersetzte Version der Abbildung 1 aus der Originalpublikation der Promovendin (Lichter et al. 2022).

4.2.5 Präparation von akuten Schnitten des Mausgehirns

Die Präparation der akuten Gehirnschnitte des Mausgehirns wurde nach einem Präparationsprotokoll für elektrophysiologische *patch-clamp*-Aufzeichnungen im hippocampalen Moosfasertrakt angefertigt (Bischofberger et al. 2006). Dieses wurde für die vorliegende Versuchsreihe adaptiert. Die Anästhesie der Mäuse erfolgte mit Isofluran (1 ml/ml, CP-Pharma, Y0000858). Nach Überprüfung der Narkosetiefe wurde eine Dekapitation der Maus auf Höhe der *Medulla cervicalis* mit Hilfe einer großen chirurgischen Schere (Fine Science Tools, 14001-14) durchgeführt. Der Kopf der Maus wurde daraufhin kurz

in eine eiskalte Pufferlösung (*artificial cerebrospinal fluid*, ACSF) getaucht. Mit einer kleinen chirurgischen Schere (Fine Science Tools, 14060-09) wurde die Fellhaut vorsichtig vom Schädel abgetrennt und die Schädelkalotte mit einem durchgehenden sagittalen Schnitt von *Foramen magnum* zum *Bulbus olfactorius* hin geöffnet. Beide Seiten der Schädelkalotte wurden ohne Kontakt zur ventralen Gewebeoberfläche des Mausgehirns mit Hilfe einer gebogenen Pinzette (Fine Science Tools, 11272-30) entfernt. Während der gesamten Präparation des Gehirns aus der Schädelkalotte und in Vorbereitung für den Schneidevorgang am Vibratom wurde darauf geachtet, mögliche Kontakte der Instrumente mit dem Gehirngewebe oder dessen Kompression auf ein Minimum zu reduzieren. Mit einem Skalpell (Skalpellhalter, Fine Science Tools, 10003-12; Skalpellklinge, Größe 21, Fine Science Tools, 10022-00) wurden auf Höhe von *Cerebellum* und *Bulbus olfactorius* zwei coronale Schnitte gesetzt. Dies ermöglichte das Lösen des Gehirns von der Schädelbasis mit Hilfe eines kleinen Spatels (Fine Science Tools, 10094-13). Aufgrund von Veränderungen der zerebralen Zellmorphologie bei zu langen Präparationszeiten wurden die beschriebenen Abläufe auf eine Zeit von 60 bis 90 Sekunden minimiert (Bischofberger et al. 2006).

Die akuten Schnitte wurden in einer Schnittkammer eines Vibratoms (Leica VT1200 Vibratom, Leica Microsystems) präpariert. Dessen Schnittklinge (Modell „Sword“, Wilkinson, und Modell „Silver Blue“, Gillette) wurde vorab mit Hilfe eines Zubehögerätes (Leica VT1200 Vibratom, Leica Microsystems) in horizontaler Ebene kalibriert. Zum Schneiden wurde das Gehirn ventral mittels flüssigem Cyanoacrylat (handelsgebräuchlicher Sekundenkleber, Firma Uhu) auf eine Halterung fixiert. Die Halterung wurde in die thermoisolierte Schnittkammer des Vibratoms eingesetzt. Die Schnittkammer enthielt eine mit Sucrose angereicherte, eisgekühlte ACSF-Lösung. Es wurden für die zu analysierenden Tiere vier konsekutive Horizontalschnitte mit einer Gewebedicke von 200 µm angefertigt. Die Schnittgeschwindigkeit betrug 0,03 mm/s. Die Schnittpräparation wurde an einer definierten Höhe des dorsalen Hippocampus durchgeführt, welche im *Allen Mouse Brain Atlas* (Version: Mouse, Adult, 3D coronal) circa 2600 µm unterhalb der dorsalen Gehirnoberfläche lag. Darüber hinaus sollten beide für den Hippocampus charakteristischen Strukturen (*Gyrus dentatus*, *Cornu ammonis*) durch das Stereomikroskop detektierbar sein. Die rechte Hemisphäre (Gegenseite) wurde mit einem kleinen Einschnitt an der kortikalen Oberfläche markiert, um später die Hemisphären am Stereomikroskop differenzieren zu können.

4.2.6 Hochdruckgefrierung von akuten Schnitten des Mausgehirns

Transfer der akuten Gehirnschnitte in Petrischalen

Mit Hilfe der Rückseite von handelsüblichen Glaspipetten (Sigma-Aldrich, S6143-250EA) wurden die akuten Gehirnschnitte aus der Schnittkammer vorsichtig auf in Eis vorgekühlte Petrischalen (Sigma-Aldrich, P5731-500EA) transferiert. Ein direkter Kontakt mit dem Gehirngewebe durch ein Instrument wurde vermieden. Die Petrischalen waren mit einem Silikonelastomer (Sylgard 184, Sigma-Aldrich, 761036) beschichtet und eisgekühltem ACSF gefüllt. Unter einem Stereomikroskop mit Auflichtbasis wurden die Schnitte auf die linke intakte Hippocampusformation zugeschnitten, um eine weitere Manipulation von DG oder CA-Region durch die Schnittklinge zu vermeiden. Zur Schnitterfertigung wurde ein Skalpell mit DIN-Norm Klingengröße Nr. 11 benutzt (Skalpellhalter, Fine Science Tools, 10004-13; Skalpellklinge, Fine Science Tools, 10011-00). Wenn eine Positionierung des Gewebes innerhalb der Petrischale nötig war, wurde dies mit Hilfe von kleinen, feinhaarigen Künstlerpinseln aus Synthetik (Rico Design, 7320.001) durchgeführt.

Transfer der akuten Hippocampusschnitte in HPF-Probenträger

Um die Schnitte in die unteren Probenträger (*carrier*) der Hochdruckgefriermaschine (Typ A, 3 mm Durchmesser, 200 μm Tiefe, Baltic Präparation) zu transferieren, wurden diese in Tropfen aus ACSF eingeschlossen (**Abbildung 8A, B**). Die Tropfen wurden an den Spitzen steriler Einmalkanülen (B. Braun, 20G: 5507660, 23G: 5507694, 27G: 5507652) unterschiedlicher Größe erzeugt, die mit einer sterilen Tuberkulinspritze (1 ml, BD Medical) verbunden waren. So wurde erneut ein direkter Kontakt zwischen Instrument und Gewebe vermieden.

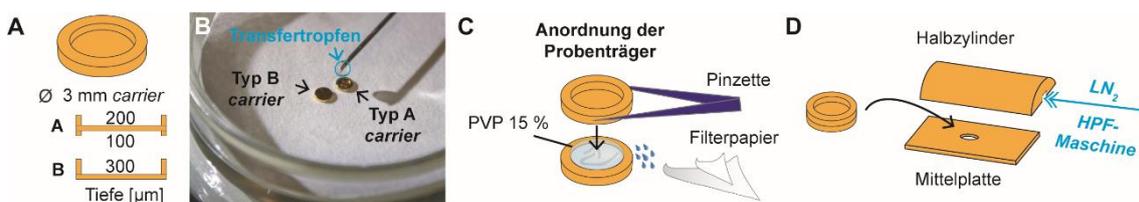


Abbildung 8. Präparation der Probenträger für die Hochdruckgefrierung.

(A) Für den HPF-Vorgang wurden 3 mm breite Probenträger (*carrier*, PT), Typ A und B verwendet. (B) Der Transfer des akuten Hippocampusschnittes erfolgte mit einer entwickelten Tropfentechnik. (C) Zum luftblasenfreien Verschluss der beiden PT wurde der zweite PT mit Hilfe einer thermostabilen Pinzette auf einen konvex gefüllten unteren PT gesetzt. An den Rändern auslaufendes 15% PVP wurde mit Filterpapier aufgesogen. (D) Für die HPF-Maschine wurden die geschlossenen PT in einer Mittelplatte gesetzt, die zwischen zwei Halbzylindern positioniert wurde. Während des HPF-Vorgangs fließt der flüssige Stickstoff (LN_2) wie gezeichnet an der Probe vorbei. Die Zeichnung des unteren PT in Bildteil C ist unverändert der Abbildung 1, Bildteil C, aus der Originalpublikation der Promovendin entnommen (Lichter et al. 2022).

Präparation der HPF-Probenträger

Die weitere Präparation erfolgte unter einem Stereomikroskop direkt an der Hochdruckgefriermaschine EM HPM100 der Firma Leica Microsystems. Mit einer Pipette von 2 µl Volumen und feinen Spitzen steriler Einmalkanülen wurde überständiges ACSF abgesaugt, ohne das Gewebe direkt zu berühren, und dann durch eine vorgekühlte ASCF-Lösung, zugesetzt mit 15% PVP als Gefrierschutz, ausgetauscht. Es erfolgte eine leichte Überfüllung des Probenträgers, sodass die Flüssigkeit eine konvexe Form annahm. Ein zweiter Probenträger (Typ B, 3 mm Durchmesser und 300 µm Tiefe, Baltic Präparation), der als Deckel diente, wurde mit einer thermoisolierten Pinzette vorsichtig auf den unteren Probenträger gesetzt (**Abbildung 8C**). Die hydrostatischen Kräfte der konvexen Flüssigkeitshülle bewirkten, dass der zweite Probenträger ohne die Formation von Luftblasen auf den unteren gezogen wurde und eine geschlossene Hochdruckgefrierkammer aus den beiden Probenträgern entstand. Luftblasen sowohl bei diesem Schritt als auch in der Füllflüssigkeit würden beim Hochdruckgefrieren sich ausdehnende Eiskristalle bewirken und einen Gefrierschaden verursachen. Austretende Flüssigkeit an den Seiten der nun verschlossenen Hochdruckgefrierkammer konnte mit einem kleinen Stück Filterpapier abgesaugt werden.

Hochdruckgefrieren der Proben

Mit Hilfe einer thermoisolierten Pinzette wurden die Hochdruckgefrierkammer in die Mittelplatte der Trägerhalterung gesetzt (**Abbildung 8D**). Hierbei war darauf zu achten, dass sich das Ensemble aus unterem und oberem Probenträger nicht erneut öffnet. Die Mittelplatte wurde dann zu der Schussvorrichtung der Hochdruckgefriermaschine geschoben. Zur Weiterverarbeitung der Probe wurde die Mittelplatte wiederum in die Mitte zweier halbzylinderförmigen Verschlusshalterungen positioniert, die einen optimalen Fluss des flüssigen Stickstoffs zu den Probenträgern ermöglichten (**Abbildung 8D**). Die Proben wurden im Anschluss mit einer Gefriereschwindigkeit von > 20000 K/s und einem Druck von > 2100 bar in der Hochdruckgefriermaschine prozessiert.

Nachbereitung der Proben

Nach dem Vorgang des Hochdruckgefrierens wurde die Probe an der Seite des Gerätes in eine mit flüssigem Stickstoff (*liquid nitrogen*, LN₂, Temperatur -196°C) gefüllte Halterung ausgeworfen. Es erfolgte ein Transfer in ein zweites thermoisoliertes Behältnis, in dem die Halbzylinder geöffnet und die Hochdruckgefrierkammer vorsichtig aus der Mittelplatte gelöst wurden (**Abbildung 9A**). Um einen zu starken Temperaturkontrast zwischen LN₂ und der ersten Substitutionslösung in der Gefriersubstitutionsmaschine (-90 °C) zu vermeiden, wurden die Zylindergefäße aus der Gefriersubstitutionsmaschine (EM

AFS2, Leica Microsystems) mit jeweils vier flüssigkeitsdurchlässigen Tefloncontainern stufenweise im thermoisolierten Behältnis herabgekühlt (**Abbildung 9B**). Dies führte zum Einfrieren der ersten Substitutionslösung, sodass ein Ablegen der einzelnen Hochdruckgefrierkammern auf dieser möglich war. Jeder hochdruckgefrorene Akutschchnitt wurde einzeln nach Reihenfolge seines HPF-Zeitpunktes in einen Tefloncontainer abgelegt (**Abbildung 9C**). Nach Befüllen eines Zylindergefäßes wurde dieses in die Kammer des Gefriersubstitutionsgerätes überführt.

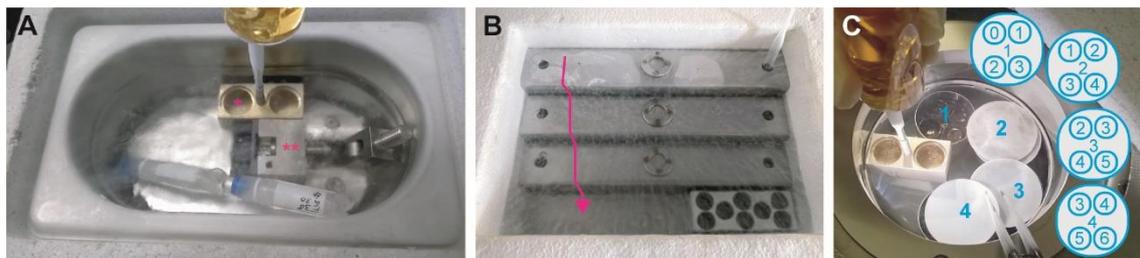


Abbildung 9. Probenvorbereitung für die Gefriersubstitutionsmaschine.

(A) Nach der HPF wurde das Sandwich aus den beiden Probenträgern mit Hilfe einer speziellen Vorrichtung (doppeltes Sternchen) aus der Mittelplatte gelöst und bei direkt anschließender FS mit Hilfe eines Transferwerkzeugs in die Aluminiumzylinder der Gefriersubstitutionsmaschine transferiert (Sternchen). (B) Die Inkubationslösungen in den Aluminiumzylindern wurden vorab stufenweise herabgekühlt (Verlaufspfeil in magenta). (C) Danach erfolgte ein Einsetzen in die Gefriersubstitutionsmaschine nach standardisiertem Protokoll. Die Ziffern in den schematisch gezeichneten Aluminiumzylindern 1-4 geben eine Kerbenmarkierung der Tefloncontainer an, so dass jeder akute Hirnschnitt einzeln bearbeitet werden konnte.

4.2.7 Gefriersubstitution

Wissenschaftliche Grundlage für die Gefriersubstitution bildeten Protokolle für Ultrastrukturanalysen der synaptischen Kontakte in *C. elegans*, die durch Philippe Rostaing und Robby Weimer etabliert (Rostaing et al. 2006; Weimer 2006) und durch das Labor von Christian Stigloher weiterentwickelt wurden (Stigloher et al. 2011; Markert et al. 2020). Aufgrund der erzielten Kontrastierung der Membranstrukturen in diesem Protokoll, die für die Analyse der SV-Positionen an der AZ-Membran von hoher Bedeutung waren, wurde das Protokoll unverändert genutzt. Die Arbeit an der Gefriersubstitutionsmaschine gliederte sich in folgend dargestellte Schritte: Beim Transfer der Aluminiumzylinder in die Gefriersubstitutionsmaschine wurden die Hochdruckgefrierkammern bestehend aus oberem Probenträger, Gewebeprobe und unterem Probenträger vorsichtig geöffnet, um eine bessere Penetration der Lösungen in der Gefriersubstitution zu erreichen. Die Gefriersubstitution setzte sich aus den in **Tabelle 1** aufgeführten Einzelschritten zusammen, die in der Maschine bei automatisiert eingestellter Temperatur aufeinander folgten. Austausch von Lösungen und die Waschvorgänge wurden manuell unter

Schutzvorrichtungen innerhalb der gekühlten Gerätekammer durchgeführt. Um einen abrupten Temperaturwechsel durch frische Lösungen in der Gerätekammer zu vermeiden, wurden diese ca. 20-30 Minuten in der Gerätekammer vorgekühlt und mit vorgekühlten Einmalpipetten sowie thermostabilen Pinzetten ausgetauscht bzw. bewegt.

Tabelle 1. Experimentelle Schritte zur Gefriersubstitution in der AFS-Maschine.

GA: Glutaraldehyd, TA: Tanninsäure, OsO₄: Osmiumtetroxid, RT: Raumtemperatur. Der Pfeil symbolisiert einen graduellen Temperaturanstieg. Es wurde wasserfreies Aceton verwendet.

Experiment	Lösung	Temperatur [°C]	Dauer [h]
Inkubation	0,5% GA, 0,1% TA, Aceton	-90	20
Lösungswechsel			0,5
Inkubation			76
Waschvorgang (4 x)	Aceton	-90	ca. 4-6
Inkubation	2% OsO ₄ , Aceton	-90	28
		↑ bis -20	14
		-20	16
		↑ bis 4	4
Waschvorgang (min. 4 x)	Aceton	4	2-3 (à 0,5)
Inkubation	Aceton	↑ bis RT	1

Nach Abschluss der experimentellen Gefriersubstitutionsschritte wurden die Proben bei Erreichen der Raumtemperatur herausgesetzt und aus den Tefloncontainern in eine frisch zubereitete Epoxidharzlösung von 50% Epoxidharz (Epon) in Aceton überführt. Es erfolgte eine Inkubation für 3 h bei Raumtemperatur. Danach wurde die Epoxidharzlösung auf 90% Epon in Aceton gewechselt, es folgte eine Inkubation der Proben bei 4°C über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben innerhalb von 3-4 h dreimal in frisch zubereitete Epoxidharzlösung von 100% Epon transferiert. Um die Probeninfiltration mit Epoxidharz zu verbessern, wurden die intakten Gewebeproben vorsichtig vom Rand des Probenträgers mit feinen Spitzen steriler Einmalkanülen gelöst. In der Regel konnten intakte Gewebeproben gelöst werden.

4.2.8 Flacheinbettung der Gewebeproben

Da die üblichen Einbettungsarten in Kapseln, speziellen Einbettungsformen oder einfachen Laborgefäßen nicht sicherstellten, dass die Hippocampusformation mit den

anatomischen Strukturen (DG, CA) optimal zugänglich für das manuelle Trimmen und für die Ultramikrotomie lag, wurde für das vorliegende Experiment eine luftblasenfreie Flacheinbettung adaptiert (**Abbildung 10A**) (Kolotuev et al. 2012). Die einzelnen Gewebeprobe wurden mit Epoxidharzlösung von 100% Epoxidharz umgeben und separiert auf eine Folie aus transparenten Fluoropolymerfilm (ACLAR[®], Dicke 0,19812 mm) gelegt (Ted Pella, 10501-10). Eine zweite, zugeschnittene Folie gleicher Art wurde auf die Probe als Deckel positioniert, wobei sich keine Luftblasen zwischen den beiden Folien befinden durften. Um ein Auslaufen von Epoxidharz zu vermeiden, wurde die obere Folie an ihren Seiten mit Klebeband fixiert. Der Stapel aus Folien und dazwischen befindlicher Gewebeprobe in Epoxidharz wurde durch ein kleines, in der Werkstatt angefertigtes Gewicht beschwert. Die Proben wurden anschließend für 48 h bei 60°C in einem Wärmeschrank ausgehärtet.

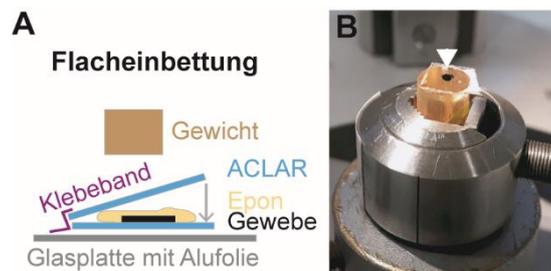


Abbildung 10. Flacheinbettung der Hippocampusproben.

(A) Schemazeichnung der verwendeten Komponenten zur Flacheinbettung der hippocampalen HPF/FS-Probe. Wichtig ist, dass sich zwischen den Fluoropolymerfilmen keine Luftblasen befinden. (B) Zum weiteren Trimmen der Probe wurde die Flacheinbettung (weißer Pfeilkopf) mit Hilfe von Cyanoacrylat auf einen vorgegossenen Eponblock geklebt.

4.2.9 Gezielte Ultramikrotomie der Gewebeprobe

Die im Folgenden durchgeführten Schritte der gezielten Ultramikrotomie (*targeted ultramicrotomy*) der HPF/FS-Schnitte intendierten, dass die Ultra- und Semidünnschnitte eine für EM und Elektronentomographie möglichst standardisierte, replizierbare und effiziente Aufnahme von Präsynapsen im hippocampalen MFB ermöglichten. Nach Entfernung der Fluoropolymerfolie auf einer Seite wurden die flach eingebetteten hippocampalen Schnitte mit direktem Kontakt des Gewebes auf eine glatte Fläche eines vorgegossenen Stückes Epoxidharz befestigt (**Abbildung 10B**). Als Klebstoff diente flüssiges Cyanoacrylat. Die vorbereiteten Epoxidharzhalterungen bestanden aus 100% ausgehärtetem Epoxidharz und wurden in Reaktionsgefäßen (Standardgröße, 1,5 ml) als Form gegossen. Die Gewebelöcke wurden manuell unter einem Stereomikroskop mit Rasierklingen zu Trapezformen getrimmt, die zunächst die gesamte CA- und DG-Region zur

Orientierung enthielten und nach weiterem Anschneiden der Probe am Ultramikrotom standardisiert auf die gesamte CA3-Region sowie einen Teil der Körnerzellregion minimiert wurden (**Abbildung 11A, B**).

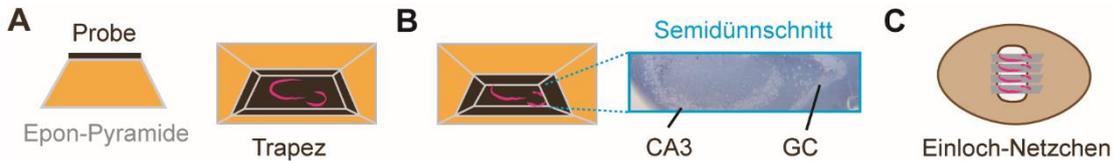


Abbildung 11. Gezielte Ultramikrotomie einer Hippocampusprobe.

(A) Der Eponblock wurde mit einer Rasierklinge manuell in eine 3D-Pyramide (linksseitige Schemazeichnung) und die Probe selbst in eine 2D-Trapezform getrimmt (rechtsseitige Schemazeichnung in Vogelperspektive). (B) Bei Verkleinerung der Probenfläche bleiben neben der CA3-Region charakteristische Landmarken wie Körnerzell-Anteile (*granule cell*, GC) erhalten (magenta-farbige Schemazeichnung). Zur Visualisierung der Fortschritte während des Trimmens wurden am Ultramikrotom Semidünnschnitte angefertigt, die mit Methylenblau angefärbt wurden. Diese dienen im weiteren Verlauf ebenso als Referenzen zum Auffinden des Moosfasertraktes am EM. (D) Für die Elektronentomographie wurden die 250 nm dicken Semidünnschnitte seriell auf Einzelloch-Netzchen (*single slot grids*) von 2 x 1 mm Größe positioniert.

Die Ultramikrotomie wurde mit einem Diamantmesser (Modell Histo, Diatome AG, Sonderanfertigung) an einem EM UC7 Ultramikrotom der Firma Leica Microsystems durchgeführt. Beim Anschneiden der Probe wurden zunächst Semidünnschnitte von 0,5-2 µm Schnittdicke angefertigt, die auf Glasobjektträger gezogen wurden und mit Hilfe einer Methylenblaufärbung die Orientierung im Gewebe und die Überprüfung auf Vollständigkeit der Hippocampusstrukturen ermöglichten (**Abbildung 11B**). Nach einem weiteren manuellen Trimmprozess wurden Ultradünnschnitte mit einer Schnittdicke von 60-70 nm angefertigt und auf elektronenmikroskopische Netzchen (*grid*) (50 Mesh, Plano GmbH, G2050C) transferiert. Dieser Vorgang geschah im Wasserbecken des Diamantmessers mit Hilfe von selbst gebauten Instrumenten (an Holzspieße geklebte Wimpern), die zur Positionierung der Schnitte auf dem Netzchen dienen. Die verwendeten Netzchen waren mit 0,8% Pioloform beschichtet und wurden zur Evaluation der HPF-Qualität und Gewebemorphologie am TEM herangezogen. Für die elektronentomographischen Aufnahmen wurden in einem zweiten Schritt hippocampale Semidünnschnitte von 250 nm Schnittdicke angefertigt. Die Semidünnschnitte wurden mit einer minimalen Distanz von 20-40 µm von der Gewebeoberfläche der optimalen Gewebeproben geschnitten. In diesen Fällen wurden keine zunehmenden morphologischen Veränderungen des Gewebes durch mögliche Schnittartefakte innerhalb eines Abstandes von 100 µm zur Gewebeoberfläche (Rostaing et al. 2006) oder eine zunehmende Formation von Eiskristallen mit zunehmender Distanz zur Mitte des Gehirnschnittes beobachtet (Siksou et al. 2007). In einer

seriellen Folge wurden vier bis fünf Semidünnschnitte Einzelloch-Netzchen (*single slot grid*) aus Kupfer positioniert (2 x 1 mm, Plano GmbH, G2500C), welche ebenfalls mit 0,8% Pioloform beschichtet waren (**Abbildung 11C**). Entgegen der sog. langen Schnittbändern (*ribbon(s)*), die bei kleineren Organismen oder Strukturen mit dem Diamantmesser geschnitten und in dessen Messertrog langgezogen werden können, ließen sich die hippocampalen Gewebelöcke aufgrund ihrer Größe nur so trimmen, dass sich auf einen Einzelloch-Netzchen seriell vier bis fünf Schnitte positionieren ließen (**Abbildung 11C**). In diesen Fällen befand sich die CA3-Region mittig über dem Einzelloch und die langen Seiten des trapezförmigen Schnittes überspannten mit Überstand das Einzelloch. Dies minimierte die Gefahr, dass sich Schnitte aufgrund einer langen Exposition durch den Elektronenstrahl vom Pioloformfilm während der Bildaufnahme lösten. Der Gewebelock wurde so am Ultramikrotom eingespannt, dass die beiden langen Trapezseiten parallel zum Diamantmesser orientiert waren; der Anschnitt erfolgte immer an der längeren von beiden Trapezseiten. In Einzelfällen wurden, wie in der Ultramikrotomie üblich, durch den Schnittvorgang komprimierte Semidünnschnitte vor dem Transfer auf das Netzchen mit Chloroformdämpfen gestreckt. Um elektrostatische Aufladungen, insbesondere in hohen Kippwinkeln am TEM zu vermeiden, erfolgte eine Kohlenstoffbeschichtung im Hochvakuum. Für diesen Vorgang wurde ein Hochvakuum-Kohlenstoffbeschichtungsgerät des Types CCU-010 der Firma Safematic GmbH genutzt. Im Fall der Semidünnschnitte wurde eine ca. 3 nm dünne Kohlenstoffschicht gewählt, die sich vorab durch ein Programmmenü einstellen ließ. Durch die geringe Ordnungszahl von Kohlenstoff ist dieses später nicht im Elektronenmikroskop sichtbar.

Um eine effektive Streuung der Elektronen zu ermöglichen und somit einen hohen Kontrastbildung, wurde vor Aufnahme eine Positivkontrastierung der Schnitte mit Schwermetallen hoher Elektronendichte durchgeführt. Zur Kontrastierung der Schnitte wurden die Netzchen für eine definierte Zeit mit der Schnittseite jeweils einzeln auf Tropfen (ca. 30 µl pro Tropfen) gelegt. Als Arbeitsunterlage diente eine mit Alkohol gereinigte Glasplatte, auf die ein Parafilm geklebt wurde. Beide Schnittarten wurden mit 5% Uranylacetat (UA) in Ethanol für 7,5 Minuten und 50% Bleicitratlösung nach Reynolds (Reynolds 1963) in d_4H_2O für 10 Minuten kontrastiert. Zwischen den Kontrastierschritten wurden die Schnitte in reinem Ethanol, in 50% Ethanol in d_4H_2O sowie reinem d_4H_2O gewaschen. Nach dem zweiten Kontrastierschritt wurden die Schnitte dreimalig in d_4H_2O gewaschen und mit einem Stück Filterpapier getrocknet. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit von UA wurden die Netzchen während der entsprechenden Kontrastierung durch eine lichtundurchlässige Box abgedeckt. Bei Bleicitrat war zu beachten, dass eine

Exposition mit CO₂ zu einem Ausfall von Bleicarbonat und somit Kontrastierartefakten auf den Netzchen führen konnte. Neben der Verwendung von ¹⁸O-H₂O wurden daher für eine CO₂-freie Versuchsumgebung in unmittelbarer Nähe zu den Bleicitrattropfen im Vorfeld NaOH in Pelletform (Bildung von Natriumcarbonat) abgelegt. Der Kontrastierschritt mit Bleicitrat wurde ebenfalls konstant mit einer staubfreien Petrischale abgedeckt.

4.2.10 Elektronenmikroskopie

Die Bildaufnahmen (Elektronenmikrographien, Tiltserien) erfolgten an einem 200 kV TEM, Modell JEM-2100 der Firma JEOL, welches mit einer mit einer TemCam F416 4kx4k Kamera (Tietz Video and Image Processing Systems) ausgestattet war. Zur Aufnahme der Tiltserien wurde das Softwarepaket SerialEM (Version 3.7) genutzt (Mastrojarre, 2005). Für die Aufnahme der Tiltserien wurde ein minimaler Bereich der Tiltwinkel von -60° bis +60° definiert. Dabei betrug die Winkelerhöhung jeweils 1°. Die maximale Differenz zwischen den Tiltwinkeln betrug -70° bis +70°, allerdings setzte dies einerseits optimal mittige Aufnahmepositionen auf dem Netzchen voraus, andererseits ein fehlerfreies Wiederauffinden der Aufnahmeposition nach Winkelveränderung durch die verwendete Software. Um eine möglichst hochaufgelöste Bilddatei zu erzeugen, wurde eine Pixelgröße von 0,287 nm ohne Pixelzusammenfassung für die Aufnahme verwendet. Am spezifischen Aufnahmegerät entsprach dies einer Vergrößerung von 40000-fach. Um die Aufnahme von präsynaptischen AZs sicherzustellen, die eine außergewöhnliche breite Profillänge in 2D besaßen, wurde in Einzelfällen die Auflösung auf 0,3897 nm pro Pixel justiert. Dies entsprach einer Vergrößerung von 30000-fach. Zur Optimierung der Aufnahmebedingungen wurde vor jeder Tiltserienaufnahme der Elektronenstrahl am Mikroskop mittig zentriert (*beam alignment*).

4.2.11 Selektion der Analyseproben und Aufnahmeposition

Alle HPF/FS- und in Epoxidharz eingebettete hippocampale Schnitte wurden in Hinblick auf mögliche Gefrierschäden und/oder Einbettungsartefakte evaluiert. Um eine voreingenommene Selektion der Proben zu vermeiden, wurden alle Gewebeproben in zufälliger Reihenfolge und kodiert über eine Einbettungsnummer betrachtet. Zu möglichen Gefrierschäden zählten die Formation von Eiskristallen, vor allem im Chromatin der Zellkerne, in dem sie typischerweise zuerst erscheinen, und Volumenverschiebungen der einzelnen Zellkompartimente und des extrazellulären Raumes (**Abbildung 12**). Darüber waren Qualitätsmerkmale für eine gute Gewebeerhalten die Detektion und Erhaltung von intakten Lipiddoppelmembranen und charakteristischen intrazellulären elektronendichten Strukturen wie Mitochondrien und Mikrotubuli.

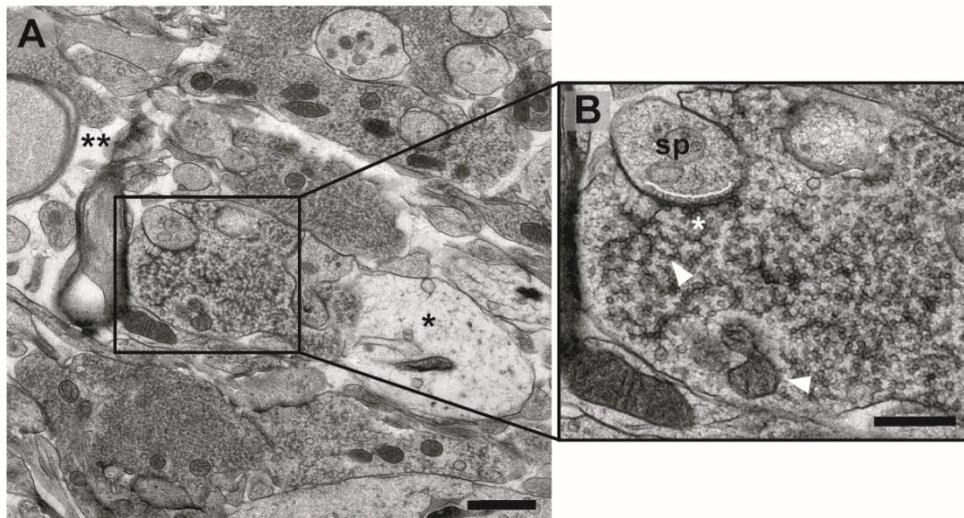


Abbildung 12. Gefrierschäden bei hippocampalen HPF/FS-Proben.

(A) Elektronenmikrographie einer gefriereschädigten Hippocampusprobe mit geschwollenen neuronalen Strukturen (Dendrit, schwarzes Sternchen) und erweitertem Extrazellularraum (doppelte schwarze Sternchen). (B) Ausschnitt aus (A) eines hippocampalen MFBs mit AZ (weißes Sternchen) an einem Dornenkopf (*spine head*, sp) einer CA3-Pyramidalzelle. Die weiße Linie verweist auf die Ausdehnung der PSD an der postsynaptischen Membran, über die sich die Ausdehnung der AZ definiert. Der SV-Pool zeigt sich filamentös verändert, das Mitochondrium ist voluminös verformt (weiße Pfeilköpfe). In diesem Fall stellen die Veränderungen durch Eiskristalle bedingte Artefakte dar. Maßstab: (A, B) 1 μ m.

Wenn die Gewebeprobe den Qualitätsmerkmalen für HPF/FS-Gewebe entsprachen (Weimer 2006), wurden diese für die Elektronentomographie weiter bearbeitet. Während der Methodenetablierung und -durchführung kam es bei der Evaluation der Gewebequalität zu der Beobachtung, dass diese möglicherweise in Abhängigkeit zum Zeitpunkt der Schnittpräparation am Vibratom stand. Die Gewebequalität nahm mit zunehmender Zeit ab. Dies kann auf ein kritisches (enges) Zeitfenster für die Präparationsschritte unmittelbar vor dem Hochdruckgefrieren hindeuten. Die Aufnahme wurde in Anbetracht der verschiedenen Synapsentypen im und am Moosfasertrakt und deren Heterogenität standardisiert. Die Tiltserien wurden an synaptischen Kontakten von intakten großen Moosfaserboutons mit einem Durchmesser von 2-5 μ m entlang des linken suprapyramidalen Moosfasertraktes (*Stratum lucidum*) der CA3b Region aufgenommen (**Abbildung 6, 7C**). Für die AZs und deren Aufnahme via Tiltserie musste erfüllt sein, dass postsynaptische Dornenköpfe der Pyramidalzellen in der CA3b-Region durch sog. Dornenapparate (Gray 1959b) und postsynaptische Filamente (PSF) an der postsynaptischen Membran identifizierbar waren. Membranen der Aktiven Zonen wurden durch korrespondierende PSF an der postsynaptischen Plasmamembran des Dornenkopfes identifiziert. Membranabschnitte mit und ohne PSF waren klar zu differenzieren. Es wurden nur

Tomogramme in die Analyse eingeschlossen, in denen sowohl prä- und postsynaptische Membran über die gesamte Tomogrammrekonstruktion durchgehend klar identifizierbar waren.

4.2.12 Segmentierung und Annotation der Tomogramme

Das Alignment der Tiltserien und die Rekonstruktion des Tomogramms wurde im Programm IMOD mit der Softwarefunktion eTomo durchgeführt (Kremer, Mastronarde, and McIntosh 1996). Zur Berechnung der Tomogramme wurde ein Protokoll mit systematisch platzierten digitalen Markierungen (*patches*) sowie der im Programm implementierte sog. *weighted back projection* Algorithmus gewählt (Kremer, Mastronarde, and McIntosh 1996). Die Markierungen wurden mit einer quadratischen Größe von 100-150 Pixel pro Seite sowie einer Anzahl von mind. 15 x 15 für die Rekonstruktion genutzt. Nach Korrektur des Modells sollte dieses stets einen Standardfehler < 2 besitzen. Eine Berechnung der Modelle und eine Verkleinerung bzw. Frequenzerhöhung der Markierungen kann die Rekonstruktionsqualität der Tomogramme erhöhen. Tomogrammrekonstruktionen nahmen pro Tomogramm in Einzelfällen zeitlich bis zu 3-4 h ein. Optimal rekonstruierte Tomogramme erlaubten durch ein qualitativ hochwertiges Alignment der Einzelbilder über die gesamte z-Achse der virtuellen elektronentomographischen Schnitte (*electron tomographic slices*) eine Segmentierung von Membranen und Vesikeln, ohne dass diese unscharf oder verzerrt erscheinen. Aufgrund der sphärischen Formation der prä- und postsynaptischen Membran am Dornenkopf konnte es in Einzelfällen durch eine suboptimale Orientierung von Membran und Aufnahmeachse (Abweichen von horizontaler Membranorientierung und vertikaler Aufnahmeachse) auch bei hochwertigen Rekonstruktionen zu nicht darstellbaren Abschnitten in den präsynaptischen Membranen führen. Diese Tomogramme wurden von der Segmentierung ausgeschlossen. Systematisch platzierte digitale Markierungen waren qualitativ einer Rekonstruktion mit physisch auf der Gewebeprobe platzierten Markierungen aus Goldpartikeln überlegen. Die hohe Aufnahmevergrößerung erforderte eine sehr dichte und gleichmäßige Distribution von Goldpartikeln auf dem Gewebe, welche in der Praxis in der Etablierung nicht zuverlässig erreicht werden konnte. Zugleich hätte eine hohe Dichte an Goldpartikeln dazu geführt, dass gegebenenfalls morphologische Strukturen durch Partikel überlagert werden und/oder bei Tiltaufnahmen in hohen Winkeln das Wiederfinden der spezifischen Aufnahmeposition durch die Partikel in der Software behindert wird.

Insgesamt wurden für die vorliegende Analyse 79 Tiltserien von AZs des hippocampalen Moosfaserboutons im Wildtyp und 55 Tiltserien im RIM1 α -KO-Tier aufgenommen und zu Tomogrammen rekonstruiert. Es wurden 10 Tomogramme pro Wildtypier und 10

Tomogramme bei zwei KO-Tieren eingeschlossen, bei einem KO-Tier wurden zwölf Tomogramme für die Segmentierung verwendet. Vor der Segmentierung und 3D-Rekonstruktion wurden alle Tomogramme durch die Zuordnung von zufälligen Nummern randomisiert. Beide Arbeitsschritte wurden ohne eine Pixelzusammenfassung (*binning*) und in voller Auflösung mit 3Dmod durchgeführt. Die Annotation von (3D-)Objekten in allen Tomogrammen wurde in Modelldateien (Dateityp *file-name.mod*) gespeichert. 3Dmod bietet eine Objekthierarchie an, in welcher der Punkt die kleinste Einheit darstellt. Mehrere Punkte ergeben eine Kontur, die wiederum einzeln oder in Mehrzahl ein Objekt darstellt. Konturen können offen (keine Verbindung der Konturenden) oder geschlossen vorliegen.

Bei den vorliegenden Annotationen wurde nach Standardregeln verfahren:

Synaptische Vesikel

SVs mit einem Abstand von 0-200 nm zur AZ-Membran wurden in die Annotation eingeschlossen und als der einer AZ zugehörige SV-Pool definiert (Rollenhagen et al. 2007). Vesikel mit einem Abstand von 0-2 nm und elektronendichter Verbindung zur AZ-Membran wurden als eng gedockt (*tightly docked*) definiert (Neher and Brose 2018). In einzelnen Originalarbeiten am hippocampalen Moosfaserbouton gelten SVs mit einem Abstand von 0-5 nm und einer Verbindung zur AZ-Membran als gedockt (Borges-Merjane, Kim, and Jonas 2020); diese Definition wurde übernommen. Der perisynaptische Bereich seitlich der AZs wurde in die Annotation der SVs bis zu einem Abstand von 200 nm zu den beiden Rändern der AZ sowie bis zu 10 nm Abstand zur Plasmamembran einbezogen. Diese Definition wurde auf der Basis einer mittleren Distanz zwischen AZs im Moosfaserbouton der Ratte von 0,40 (Alter = P28) bis 0,48 μm (adultes Tier) gewählt (Rollenhagen et al. 2007).

Die Annotation erfolgte als ideales sphärisches Objekt (Kugel), indem ein Punkt auf den Mittelpunkt des Vesikels gesetzt wurde. Dafür wurde die Einzelebene im Tomogramm herausgesucht, auf der der Vesikel den größten Durchmesser besaß. Dieser Punkt wurde mit dem Zeichenwerkzeug (*drawing tool*) im Modus „*normal*“ so vergrößert, dass der entstandene Kreis auf der äußeren SV-Membran saß. Die Größenveränderung des Punktes wurde über das Rad an einer Computermaus justiert. Alle annotierten SVs wurden mit Hilfe von Programmierskripten auf ihre exakte euklidische Distanz zur AZ-Membran geprüft und danach final in die Analyse eingeschlossen.

Um die nachfolgende Analyse der verschiedenen Vesikeltypen mit einer euklidischen Distanz von 0-10 nm zur AZ-Membran zu erleichtern, wurden unterschiedliche Objekte angelegt. Diese gliederten sich wie folgt auf:

- a) *Tightly docked SVs* (euklidische Distanz von 0-2 nm zur Membran der AZ)
- b) *Docked SVs* (euklidische Distanz von 2,1-5 nm zur Membran der AZ)
- c) *Tethered SVs* (euklidische Distanz von 5,1-10 nm zur Membran der AZ)
- d) *Perisynaptic docked SVs* (euklidische Distanz von 0-5 nm zur Plasmamembran im perisynaptischen Bereich)
- e) *Perisynaptic tethered SVs* (euklidische Distanz von 5,1-10 nm zur Plasmamembran im perisynaptischen Bereich)
- f) SVs mit einer euklidischen Distanz von 11-200 nm zur Membran der AZ

Die Illustration der SVs in dreidimensionalen IMOD-Modellen wurde im Programm einheitlich eingestellt, indem die Qualität der Punkte (*global quality*) auf den Grad 4 und der Zeichenstil (*drawing style*) im Modus „*fill*“ eingestellt wurden.

Bei SV-Annotationen für vorliegende Analyse wurde beobachtet, dass die Form der äußeren Vesikelmembran und das Volumen des Vesikels von einem idealen sphärischen Objekt wie einer Kugel abwich. Auch wenn möglicherweise eine Deformation vorlag, konnten die Vesikelvolumina bzw. -flächen klar von im Schnittbild morphologisch ähnlichen Strukturen, wie z.B. einem glatten endoplasmatischen Retikulum, unterschieden werden.

AZ-Membran

Doppellipidmembranen der AZ wurde als sog. offene Linienobjekte annotiert und mit dem Programmwerkzeug „*interpolator*“ alle 15-20 virtuellen Tomogrammschnitte mit linearer Einstellung interpoliert. Mögliche Abweichungen der Linienführung durch die Interpolation wurden manuell korrigiert.

Synaptischer Spalt

Der synaptische Spalt wurde als alleiniges oder aufgeteilt in mehrere sog. geschlossene Objekte annotiert (**Abbildung 13**). Die Annotation in mehrere Objekte ergab sich aufgrund der irregulären geometrischen Formen der Membranen und Volumina des synaptischen Spaltes mit in Teilen Ausstülpungen. Alle 20 virtuelle Tomogrammschnitte wurde die Fläche zwischen dem zum Spalt gerichteten Membrananteil der AZ-Membran und der postsynaptischen Membran annotiert.

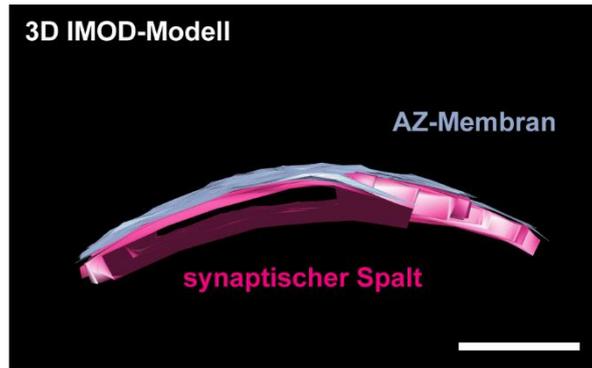


Abbildung 13. Der synaptische Spalt als 3D-IMOD-Objekt.

Seitliche Perspektive auf eine Modellierung aus dem Programm IMOD (siehe Methoden) mit den Objekten der AZ-Membran (grau) und des synaptischen Spaltes (magenta). Die Objektgrenzen des synaptischen Spaltes können in 3D-Koordinaten zur weiteren Berechnung extrahiert werden. Maßstab: 100 nm.

Zwischen den Annotationen wurde erneut mit dem Interpolator-Werkzeug in der Einstellung „smooth“ interpoliert und bei Abweichung der Linienführung manuell korrigiert. Die laterale Ausdehnung des synaptischen Spaltes orientierte sich an der Detektion von PSFs an der postsynaptischen Membran, kohärent zur AZ-Definition.

4.2.13 Quantitative Datenanalyse

Zur Analyse der annotierten Objekte und Konturen innerhalb der AZ wurden Einzelinformationen aus der IMOD-Modelldatei extrahiert. Die Informationen lagen entweder in Form von dreidimensionalen Koordinaten oder berechneten Längen-, Flächen- und Volumenmaßen vor. Eine Flächen- oder Volumenberechnung wurde in 3Dmod im Programm über die sog. „mesh“-Funktion per Objekt generiert. Diese Berechnungen basieren mathematisch auf Triangulationen zwischen Einzelpunkten. Für die Datenextraktion stehen Programmierkommandos namens „*imodinfo*“ und „*model2point*“ innerhalb des IMOD Softwarepaketes zur Verfügung. Es erfolgte die Extraktion von dreidimensionalen Koordinaten (x-, y-, z-Koordinate) der Vesikelmittelpunkte sowie von Einzelpunkten einer Membrankontur, von Längen der offenen und geschlossenen Membrankonturen sowie Vesikelradien, angegeben in Nanometer, darüber hinaus von Flächen der AZ-Membran sowie Volumina des synaptischen Spaltes, angegeben in Quadrat- bzw. Kubiknanonmeter. Die Koordinatenwerte beziehen sich auf die Position des Punktes im rekonstruierten Tomogrammvolumen und entsprechen der fortlaufenden Nummerierung der Pixel in einem Bild. Dreidimensionale Koordinaten von Membrankonturen und Vesikelmittelpunkten sowie Vesikelradien wurden genutzt, um weitere Abstandsmaße mit Hilfe von Programmierskripten zu bestimmen (**Appendix**) (Lichter and Kollmannsberger 2022). Zu den Messgrößen gehörten die euklidische Distanz der Vesikelaußenmembran zur AZ-

Membran, die euklidische Distanz eines Vesikels zu benachbarten Vesikeln im dreidimensionalen Vesikelpool (*nearest neighbour(s)*, NN), die euklidische Distanz eines gedockten Vesikels zu den Außenrändern der AZ sowie dem Massezentrum (*center of mass*) der AZ. Die Distanz der synaptischen Vesikel innerhalb von 0-10 nm zur AZ-Membran und das EDM, welches Vesikel und AZ-Membran verbindet, wurde manuell in 3Dmod gemessen. Dafür wurde das programmeneigene Längenmaßwerkzeug (*measuring tool*) verwendet. Standardisiert wurde die Messung auf der Schnittebene des Tomogramms durchgeführt, auf der sich der Vesikelmittelpunkt befand. Das EDM wurde in seiner Weite am größtmöglich zusammenhängenden Bereich von elektronendichten Pixeln, der sich parallel zur Membrankontur befand, gemessen. Die Visualisierungseinstellung von 3Dmod entsprach dabei dem sog. *slicer*-Fenster, in dem die Segmentierung des Tomogramms in Einzelschnittebenen aus allen Achsen und somit eine 3D-Betrachtung einer elektronendichten Struktur möglich ist.

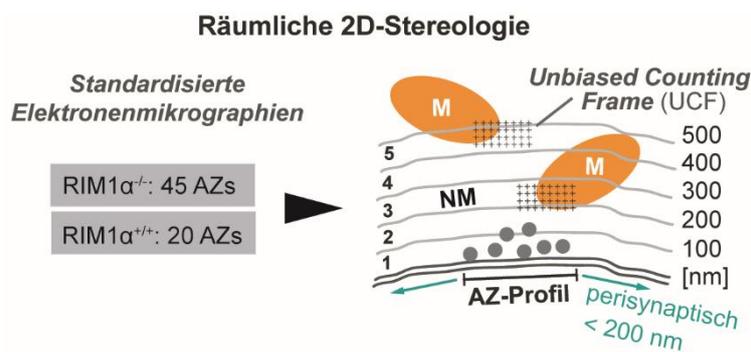


Abbildung 14. 2D-Stereologie zur Quantifizierung der mitochondrialen Fläche.

Schemazeichnung der Vorgehensweise zur Quantifizierung der 2D-Fläche mitochondrialer Profile in AZ-Nähe. Ein *unbiased counting frame* (UCF) diente als stereologische Methode; die Quantifizierung der mitochondrialen (M) und nicht-mitochondrialen (NM) Fläche erfolgte in fünf Distanzfraktionen (1-5) in bis zu 500 nm Distanz zur AZ-Membran. Die Schemazeichnung ist ein modifizierter Bildteil des Supplements Abbildung 3 aus der Originalpublikation der Promovendin (Lichter et al. 2022).

Zur Quantifizierung von mitochondrialen Profilen wurde eine 2D-Methode der räumlichen Stereologie nach C. Hacker und J. Lucocq (Hacker and Lucocq 2014) genutzt (**Abbildung 14**). Dazu wurden Elektronenmikrographien gleicher Vergrößerung (15000-fach) verwendet (RIM1 $\alpha^{-/-}$: N = 45, Wildtyp: N = 20), auf denen ein kästchenförmiges Gitter mit einer Einzellänge von 22,36 nm zufällig positioniert wurde. Es wurden mitochondriale Profile innerhalb von 500 nm zur AZ- und perisynaptischen Membran (0-200 nm zum AZ-Rand) quantifiziert. Dazu wurden Punkte (jeweilige Eckpunkte der Kästchen) gezählt, die entweder auf einem Mitochondrium (M) oder dem Cytosol (kein Mitochondrium, NM) lagen, und in fünf Banden je 100 nm Distanz zur Membran kategorisiert. Die AZ-Profile

in den großen MFBs wurden anhand einer klaren Detektion von Mitochondrien nahe der AZ und exzellenter Ultrastruktur des gesamten Boutons ausgewählt. Wenn mehrere AZs an einem Dornenkopf zu detektieren waren, wurde diejenige AZ ausgewählt, die dem Mitochondrium am nächsten lag. Mitochondrien, die klar zu einem AZ-Profil zuzuordnen waren, wurden ebenso perisynaptisch quantifiziert.

4.2.14 Statistik

Die Anzahl der Tiere und der eingeschlossenen Tomogramme wurde *a priori* anhand einer Standardpublikation im Bereich der Elektronentomographie von synaptischen Kontakten festgelegt ((Imig et al. 2014), im Speziellen für RIM1 α Untersuchungen (Fernandez-Busnadiego et al. 2013)). Die Anzahl der Tomogramme ist durch den aufwendigen experimentellen Vorgang sowie durch die (bisher) manuelle Annotation von AZs durch eine Einzelperson limitiert. Aufgrund des hohen experimentellen Charakters der Untersuchung wurde eine nicht-parametrische Verteilung der Daten angenommen. Für alle Datenverteilungen wurde ein Test auf Normalverteilung zur weiteren statistischen Berechnung durchgeführt. Für eine Anzahl von ≤ 5000 einzelnen Datenpunkten wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet, für eine höhere Anzahl von einzelnen Datenpunkten der Kolmogorov-Smirnov-Test. Wenn eine nicht-parametrische Datenverteilung vorlag, wurde die Differenz der beiden Gruppen mit einem nicht-parametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (WMWT) ermittelt. Im Fall von parametrisch verteilten Daten wurde die Varianz beider Gruppen aufgrund des experimentellen Charakters der erhobenen Parameter sowie der Seltenheit der untersuchten Phänomene als nicht gleich angenommen und die Differenz daher mit einem t-Test nach Welch getestet. Eine Poweranalyse wurde *post hoc* zur Einordnung des Wahrscheinlichkeitswertes (p-Wert) durchgeführt. Um zwei Parameter auf eine Korrelation hin zu untersuchen, wurde der Rangordnungskoeffizient r nach Spearman berechnet. Um die Datenverteilung von zwei Parametern in den beiden Untersuchungsgruppen auf eine Differenz zu testen, wurde das Akaike Informationskriterium sowie im Falle von parametrischen Datenverteilungen der F-Test genutzt. Wahrscheinlichkeitswerte wurden in einem Statistikprogramm mit einem Minimum von sechs Dezimalstellen berechnet. Zum Vergleich der AZ-Membranflächen unter den drei Tieren wurde nach Voraussetzung aller Testbedingungen eine Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Die gemischte lineare Modellierung (*linear mixed modeling*, LMM) der AZ-Membranfläche (ausführlich siehe **Appendix**) (Lichter and Kollmannsberger 2022) wurde unter der Annahme durchgeführt, dass eine Statistik basierend auf den Mediandifferenzen zwischen den Tieren eine nicht hinreichende Analyse der Komplexität entspricht. In der

Modellierung wurde die Proteindefizienz als fester Effekt und die Variabilität unter den Tieren als Zufallseffekt behandelt. Zur Feststellung des Konfidenzintervalls der LMM-Koeffizienten wurde eine *Bootstrapping*-Analyse mit 10000 Wiederholungen angewandt. Das Model wurde zusätzlich über einen randomisierten Austausch der Gruppenlabel validiert. Wenn Wahrscheinlichkeitswerte geringere Werte als $< 0,001$ aufwiesen, wurden sie als auf drei Dezimalstellen gerundete Werte angegeben. In der Datentabelle und in der Visualisierung als Boxplot wurden bei nicht-parametrisch verteilten Daten der Median sowie das 25. and 75. Perzentil berichtet, im Fall von parametrischen verteilten Daten der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD).

5 Ergebnisse

5.1 Nativere EM-Probenpräparation an hippocampalen MFBs vermittelt einen neuartigen Detailreichtum

Die Präparation von Hirngewebe in einem möglichst nativen Zustand und nach elektro-physiologischen Standards für HPF/FS ist komplex und anspruchsvoll. Zu Beginn der Experimente im Jahr 2016 war weder die HPF/FS-Technik für die verwendete Gewebepräparation etabliert, noch existierte aus dieser eine morphologische Beschreibung der AZs in hippocampalen MFBs. Vor Durchführung der quantitativen Analyse erfolgte daher auf deskriptiv-qualitativer Ebene ein Vergleich ultrastruktureller Merkmale des hippocampalen MFBs zwischen der klassischen ausschließlich Aldehyd-basierten Gewebefixation für EM und der zu etablierenden HPF/FS-Technik. Die Struktur-erhaltung der MFBs in der HPF/FS-Technik wurde nach den Kriterien der allgemeinen Gewebequalität sowie der Identifikation von morphologischen Charakteristika der Boutons beurteilt.

Klassische Aldehyd-basierte Fixation

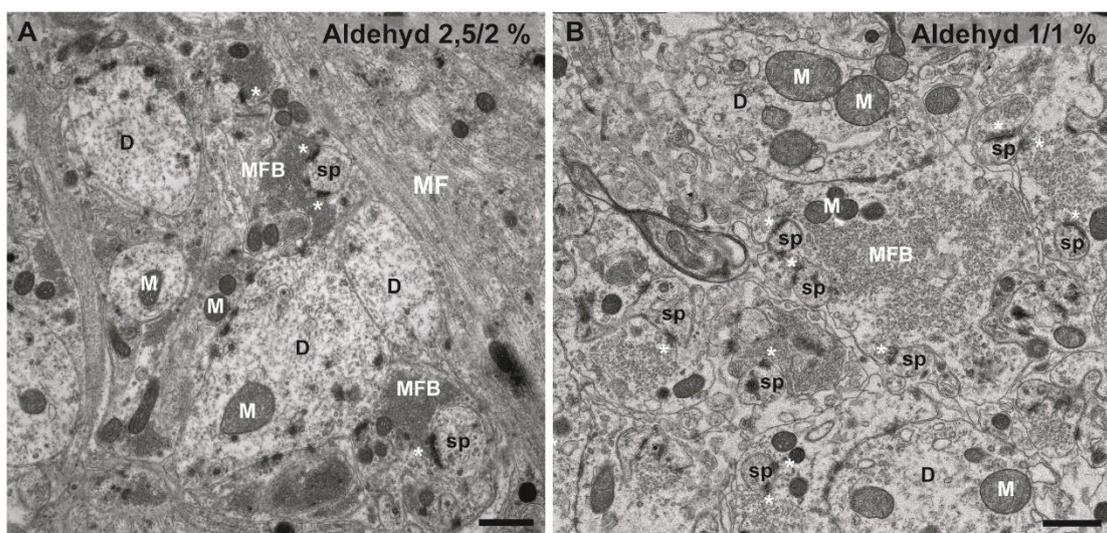


Abbildung 15. Struktur-erhaltung von hippocampalen Moosfaserboutons in Aldehyd-basierter Fixation.

(A) Elektronenmikrographie des MF-Traktes (MF) mit hippocampalen MFBs im *Stratum lucidum*. Auf Basis des Karnovsky-Fixativs (2% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd) zeigen sich strukturell gut erhaltene hippocampale MFBs, die von großkalibrigen Dendriten (D) umgeben sind. An den Dornenköpfen (*spine head*, sp) bzw. dendritischen Endigungen lokalisieren AZs (weiße Sternchen), die ausgeprägt elektronendichten PSDs gegenüberliegen. Mitochondrien (M) sind gut zu identifizieren. (B) Äquivalenter Bildausschnitt zu (A) mit variiertem Karnovsky-Fixation (1/1%) nach Palay und Chan-Palay. SV-Pools erscheinen weitläufiger verteilt als in (A) bei insgesamt ähnlicher Struktur-erhaltung. Maßstab: (A, B) 1 µm.

Als Vergleichsprobe zur HPF/FS-Technik dienten kontrastierte Ultradünnschnitte Aldehyd-fixierter Mausgehirne (vier C57Bl/6-Mäuse, Alter 14 Wochen, Zucht von Prof. Dr. Anna-Leena Sirén), die durch das EM-Labor des Anatomischen Institutes der Universität Würzburg angefertigt worden waren und in Teilen an einem TEM, Modell LEO 912 AB (Zeiss), des Anatomischen Institutes der Universität Würzburg durch die Promovendin analysiert wurden (**Appendix**). Die Applikation beider Fixative erfolgte durch eine kardi-ale Perfusion, die in tiefer Anästhesie der Tiere von Prof. Dr. Anna-Leena Sirén und Dr. med. Martin Pauli durchgeführt wurde. Die klassisch Aldehyd-basierten Fixationsprotokolle setzten das in der EM traditionell verwendete Karnovsky-Fixativ ein (2% Paraformaldehyd (PFA), 2.5% GA) (Karnovsky 1965; Korogod, Petersen, and Knott 2015) (**Appendix**). Zur Reduktion der Aldehyd-Menge wurde ein Protokoll mit 1% PFA und 1% GA nach einem Protokoll von Sanford Louis Palay und Victoria Chan-Palay eingesetzt (Seite 326-328, (Palay and Chan-Palay 1974)) (**Appendix**). Beide Fixationsvarianten wiesen ultrastrukturell vergleichbare Resultate auf und werden daher im Folgenden nicht weiter differenziert.

In den Aldehyd-fixierten EM-Präparaten zeigten sich hippocampale MFBs – entsprechend den Vorarbeiten – als große, SV-gefüllte Strukturen, die mehrere Dornenköpfe umrandeten und SVs unterschiedlichen Durchmessers aufwiesen (**Abbildung 15-17**). Die Membran der Boutons konnte klar identifiziert werden, ebenso waren AZs, auch in geringen Vergrößerungsstufen, durch die elektronendichte PSD deutlich zu erkennen (**Abbildung 15**).

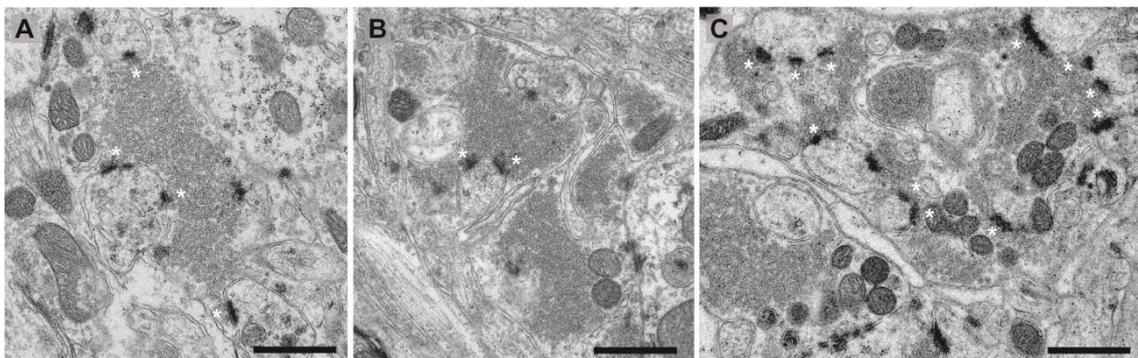


Abbildung 16. Ultrastrukturelle Organisation des SV-Pools in Aldehyd-fixierten hippocampalen MFBs.

(A, B) Elektronenmikrographien von Aldehyd-fixierten hippocampalen MFBs nach klassischen EM-Fixationsprotokollen. Der SV-Pool erscheint eng gedrängt und füllt weite Anteile des Boutons aus. Die Zuordnung zu einzelnen AZs (weiße Sternchen) ist vorhanden, der SV-Pool verbleibt jedoch insgesamt als zusammenhängendes Cluster. (C) Elektronenmikrographie eines Aldehyd-fixierten hippocampalen MFBs nach klassischen EM-Fixationsprotokollen. In einer zweiten Art von Boutons erscheint der SV-Pool reduziert und einzelnen AZs zugeordnet mit deutlich erkennbaren freien Zytosolflächen. Maßstab: (A-C) 1 µm.

Der synaptische SV-Pool konnte in Form von SV-Clustern identifiziert werden, die sich in freien Bereichen des Zytosols, jedoch mit Abstand zu anderen Organellen, wie z.B. Mitochondrien, oder der Plasmamembran formierten (**Abbildung 16**). Eine weitere Form des SV-Clusters konnte einzelnen AZs klar zugeordnet und von weiteren SV-Clustern innerhalb des Boutons differenziert werden (**Abbildung 16C**). In höheren Vergrößerungsstufen erschienen die AZ-Profile durch elektronendichte Strukturen sowohl prä- als auch postsynaptisch sowie von perisynaptischen Bereichen und dem Zytosol abgrenzbar (**Abbildung 17A**). Neben der PSD waren sog. pyramidenförmige Partikel an der AZ-Membran zu erkennen (**Abbildung 17B**) (Phillips et al. 2001).

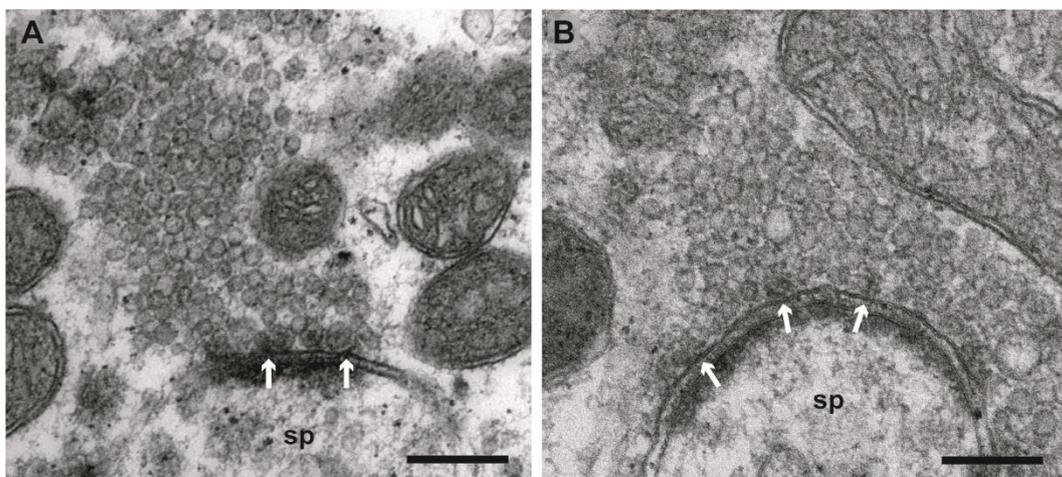


Abbildung 17. Ultrastruktur der AZ in Aldehyd-fixierten hippocampalen MFBs.
 (A) Elektronenmikrographie einer AZ mit gedockten DCVs und prominenter PSD an einem Dornenkopf (*spine head*, sp). Weiße Pfeile deuten auf elektronendichtes Material (EDM) an der AZ-Membran. (B) Elektronenmikrographie einer AZ mit EDM von unterschiedlicher Form. Maßstab: (A, B) 250 nm.

Probeweise durchgeführte ET an klassisch fixierten AZs im hippocampalen MFB konnte keine tiefere Differenzierung von prä- oder postsynaptischen EDM vermitteln (**Abbildung 18A**). Auf deskriptiver Ebene fiel eine Positionierung der elektronendichten pyramidenförmigen Partikel an der AZ-Membran in nahezu regelmäßigen Abständen auf (**Abbildung 18B**). Zusammenfassend gelang mit den Aldehyd-fixierten Präparaten eine aus der Literatur bekannte, morphologische Beschreibung komplexer MFBs.

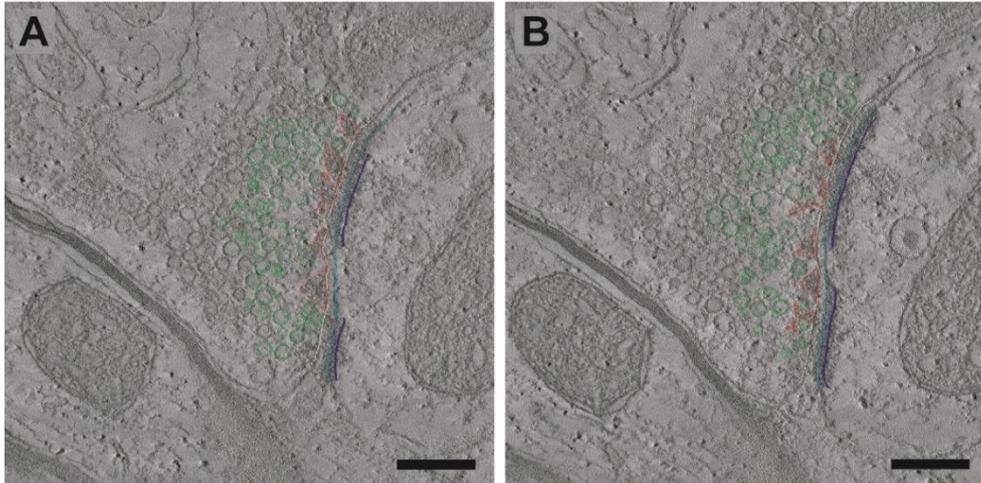


Abbildung 18. Elektronentomographie der AZ in Aldehyd-fixierten hippocampalen MFBs. (A, B) Elektronentomographische Schnitte einer verzweigten AZ mit SV-Pool (grün) und pyramidenförmigen EDM (rot) in regelmäßigen Abständen an der AZ-Membran. Die elektronentomographischen Schnitte sind einem Tomogramm an zwei unterschiedlichen Z-Positionen entnommen. Postsynaptische Membran (hellblau) und Lokalisation der PSD (dunkelblau) sind gesondert markiert. Maßstab: (A, B) 250 nm.

HPF/FS-Technik

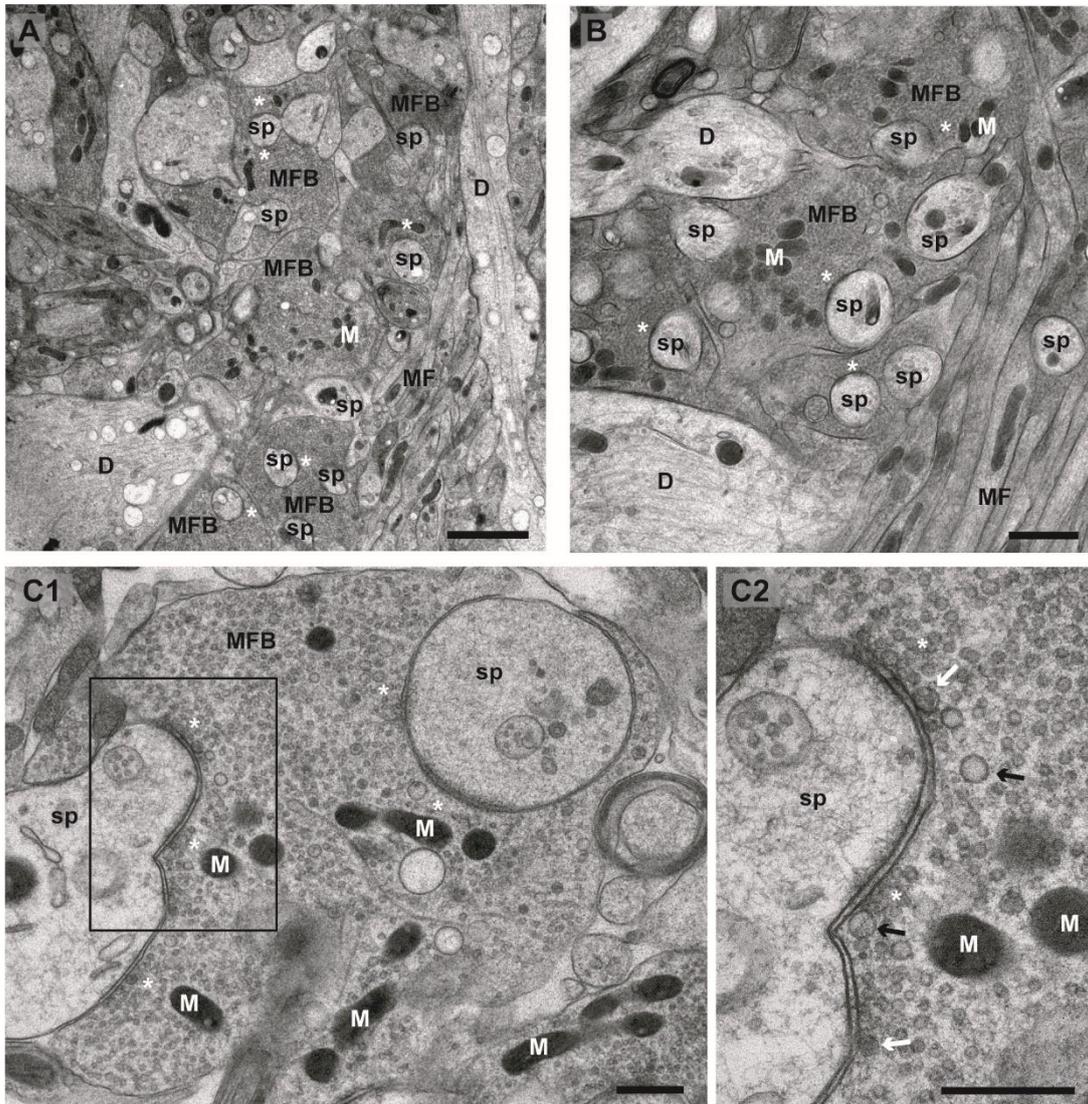


Abbildung 19. Strukturerhaltung von hippocampalen Moosfaserboutons in HPF/FS-behandelten akuten Hirnschnitten.

(A-B) Elektronenmikrographien von hippocampalen MFBs, die anhand ihrer uniformen SV-Dichte, Existenz von Mitochondrien (M) und umhüllten Dornenköpfen (*spine heads*, sp) auch in geringeren Vergrößerungsstufen gut zu identifizieren sind. Die AZs (weiße Sternchen) lokalisieren sich an den Dornenköpfen. (C1, C2) Elektronenmikrographien eines hippocampalen MFBs mit geringerer SV-Dichte mit Nahaufnahme eines ausgewählten Dornenkopfes (schwarzes Kästchen, C2). PSDs erscheinen weniger elektronendicht als in klassischer Aldehyd-basierter Fixation. Es lassen sich verschiedene SV-Typen (schwarze Pfeile deuten auf LCVs, schwarze Pfeile deuten auf DCVs) an der AZ-Membran und in AZ-Nähe identifizieren. Maßstab: (A) 2 μm , (B, C) 500 nm.

In den mit der HPF/FS-Technik behandelten EM-Präparaten ließen sich auf optisch-deskriptiver Ebene die charakteristischen morphologischen Merkmale des hippocampalen MFBs klar identifizieren (**Abbildung 19**). Membranstrukturen und Organellen, insbesondere Mitochondrien, erschienen anhand von EM-Standards, z.B. der Auflösung von

Doppellipidmembranen oder Membranfaltungen in Mitochondrien, von hoher struktureller Qualität.

In hippocampalen MFBs verteilte sich der SV-Pool im Gegensatz zu Aldehyd-fixierten MFBs in nahezu uniformer, dichter Art um die Dornenköpfe bzw. dendritischen Ausstülpungen sowie um Mitochondrien (**Abbildung 19**). Im Gegensatz zu Aldehyd-fixierten MFBs zeigten sich in der HPF/FS-Technik wenig freie Zytosolflächen. Eine optisch strenge Zuordnung einzelner SV-Cluster zu AZs, wie sie in Aldehyd-fixierten hippocampalen MFBs aufgefallen war, konnte in MFBs mit hoher SV-Dichte nicht getroffen werden. In Einzelfällen konnten MFBs mit geringerer SV-Dichte identifiziert werden, wobei der SV-Pool weiterhin uniform verteilt erschien (**Abbildung 19C**). In Ultradünnschnitten waren die AZs der hippocampalen MFBs sowohl anhand gedockter SVs an ihrer Membran als auch feinen elektronendichten PSF zu identifizieren, die als Äquivalent zu der optisch auffälligen, stark elektronendichten PSD in Aldehyd-fixierten Synapsen begriffen wurde. Innerhalb des SV-Pools waren SVs unterschiedlichen Durchmessers und Art zu erkennen, darunter SCVs, LCVs und DCVs (**Abbildung 19C2**). Diese erschienen in ihrer Form rundlicher und in der Verteilung weniger gestaucht als in der klassischen Fixation. Elektronendichte (pyramidenförmige) Partikel konnten an der Membran nicht identifiziert werden.

Unter Beachtung der Qualitätsstandards für synaptische Gewebeerhaltung in der HPF/FS-Technik und im Vergleich zu EM-/ET-Aufnahmen aus murinen organotypischen Schnittkulturen (Imig et al. 2014) erschien die erzielte MFB-Morphologie hochwertig und für eine Auflösung feiner filamentöser Strukturen an AZ- und SV-Membranen angemessen. Dies war für eine ultrastrukturelle Einordnung von RIM1 α in elektronentomographischen Aufnahmen von hoher Bedeutung. Nach mehrfacher Replikation der erzielten Gewebequalität und unter Beachtung der standardisierten Aufnahmekriterien, die in den Methoden ausführlich aufgeführt sind, wurde die neu etablierte HPF-FS-Präparations-technik für die quantitative Analyse der AZ-Ultrastruktur in hippocampalen MFBs eingesetzt.

5.2 Hochwertige Qualität der AZ-Ultrastruktur in hippocampalen MFBs von $RIM1\alpha^{+/+}$ und $RIM1\alpha^{-/-}$

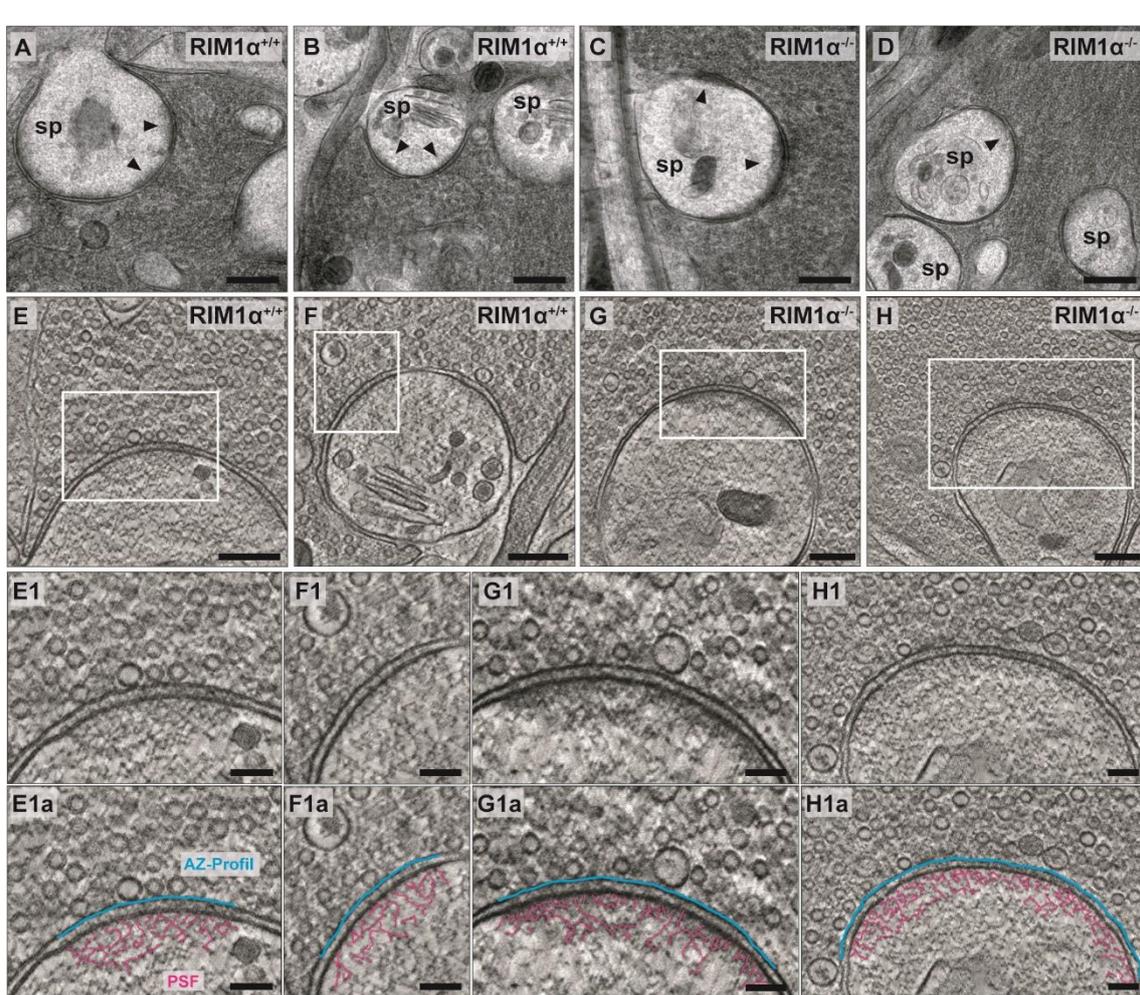


Abbildung 20. Hochwertige Qualität der AZ-Ultrastruktur in hippocampalen MFBs von $RIM1\alpha^{+/+}$ und $RIM1\alpha^{-/-}$.

(A-D) Exemplarische Elektronenmikrographien von AZs des hippocampalen MFBs an Dornenköpfen (*spine heads*, sp) der CA3-Pyramidalzellen in beiden Genotypen, die für Elektronentomographie ausgewählt wurden. Pfeilkopf deutet auf die PSD an den postsynaptischen Membranen, über die die Ausdehnung der AZ-Membran definiert wird. (E-H) Elektronentomographische Schnitte aus Tomogrammen von AZs (weiße Kästchen), die in A-D gezeigt werden. (E1-H1a) Vergrößerte Bildauschnitte der elektronentomographischen Schnitte aus E-H. Die blaue Linie markiert das zweidimensionale präsynaptische AZ-Profil. Dieses liegt feinen postsynaptischen Filamenten (PSF) gegenüber, die an der postsynaptischen Membran befestigt sind (in magenta nachgezeichnet) und der PSD nach klassischer Definition entsprechen. Maßstab: (A-H) 250 nm, (E1-H1a) 100 nm. Die Abbildung entspricht einer modifizierten Form der Abbildung 2, Bildteile A-H1a, der Originalpublikation der Promovendin (Lichter et al. 2022).

Für die quantitative Ultrastrukturanalyse der AZs in $RIM1\alpha^{+/+}$ (N = 30 3D AZ-Modelle aus individuellen MFBs) und $RIM1\alpha^{-/-}$ (N = 32 3D AZ-Modelle aus individuellen MFBs) wurden die Proben nach standardisierten Qualitätskriterien vorausgewählt, um eine Artefakt behaftete Analyse auszuschließen und um die notwendige ultrastrukturelle Grundlage

für Nanometer präzise geometrische Quantifikationen sicherzustellen. Eine AZ-Membranfläche (3D) / ein AZ-Profil (2D) definierte sich ultrastrukturell als die Membranfläche (3D) / die Membranlinie (2D), die – durch den synaptischen Spalt getrennt – der an der postsynaptischen Membran von CA3b-Dornenköpfen befindlichen PSF exakt gegenüberlag. Sowohl in RIM1 $\alpha^{+/+}$ als auch in RIM1 $\alpha^{-/-}$ konnten die AZs in morphologisch charakteristischen großen MFBs mit (nahezu) uniformer SV-Dichte identifiziert werden (**Abbildung 20A-H**). Die Morphologie der MFBs in beiden Genotypen wies auf deskriptiv-optischer Ebene keine auffälligen Unterschiede auf. Die MFBs enthielten einen dichten SV-Pool mit den vorbeschriebenen unterschiedlichen SV-Typen (Henze et al. 2002; Rollenhagen and Lübke 2010) (**Abbildung 20E1-H1a**). In der qualitativen Betrachtung der Präparate im TEM fiel auf, dass die AZ-Profile in 2D breiter und gedockte SVs in RIM1 $\alpha^{-/-}$ AZs reduziert erschienen (**Abbildung 20E1-H1a**). Auch bei RIM1 α -Defizienz erwies sich der synaptische Komplex inklusive der AZ auf deskriptiv-optischer Ebene als ultrastrukturell intakt. Ein extremer ultrastruktureller Phänotyp, wie beispielsweise eine durchgehende Depletion der SVs an der AZ-Membran, war in RIM1 $\alpha^{-/-}$ AZs nicht zu erkennen (**Abbildung 20E1-H1a**). Dies unterstrich die Bedeutung einer standardisierten quantitativen 2D- und 3D-Ultrastrukturanalyse der AZs des großen MFBs sowohl in RIM1 $\alpha^{-/-}$ als auch RIM1 $\alpha^{+/+}$ mit Hilfe von Elektronentomographie.

5.3 Variabilität und Komplexität der AZ-Membranfläche in hippocampalen MFBs

3D-Bilddaten des adulten murinen MFBs aus einer Technik der Volumen-EM, der sog. *serial-block face scanning electron microscopy* (SBF-SEM), legen nahe (Wilke et al. 2013), dass die AZ-Formen geometrisch heterogen sind und keine uniforme scheibenartige (*disc-like*) Struktur darstellen (Südhof 2012). α STORM-Aufnahmen des präsynaptischen AZ-nahen Proteins Bassoon in großen MFBs zeigten eine hohe Variabilität der AZ-Größe, gemessen an Einzellokalisierungen von Bassoon, innerhalb der CA3-Region und unter Tieren gleichen Genotyps auf (Pauli et al. 2021). Bei hoher Standardisierung der Aufnahmelokalisation wiesen die 3D AZ-Modelle aus Elektronentomogrammen von 250 nm dicken Semidünnschnitten in beiden Genotypen auf einem deskriptiv-optischen Level unregelmäßige und komplexe Formen mit Löchern, Verzweigungen und durch die Lokalisation am Dornenkopf bedingte langflächige Krümmungen auf (**Abbildungen 21, 22**).

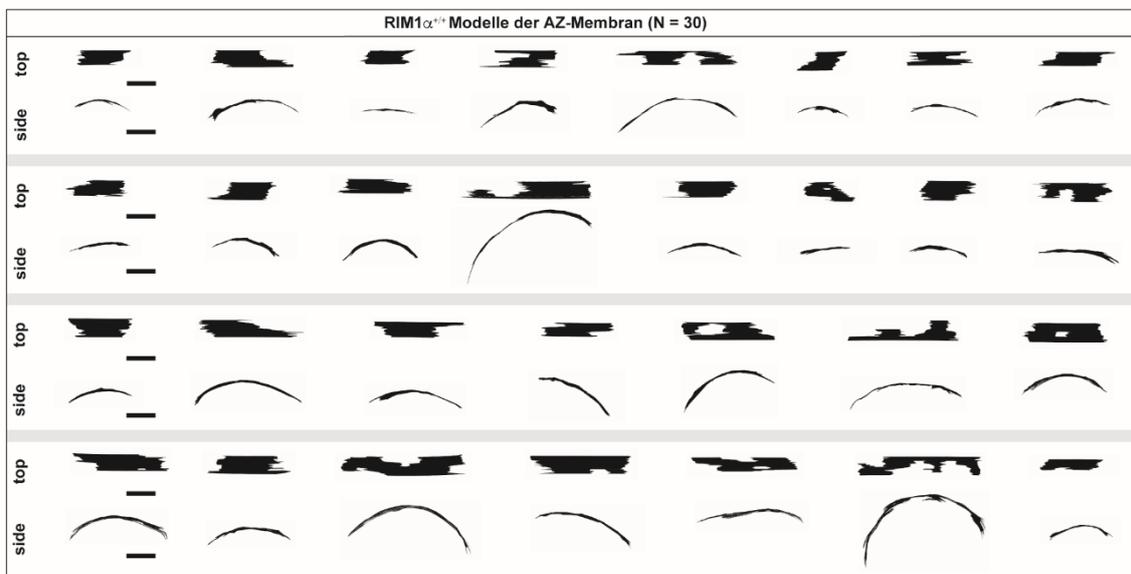


Abbildung 21. RIM1 $\alpha^{+/+}$ -Modelle der AZ-Membran in hippocampalen MFBs.

Standardisierte Auf- und Seitensicht der IMOD-Modellobjekte für die AZ-Membranen. Maßstab: 100 nm. Die Abbildung entspricht einer übersetzten Version des Supplements Abbildung 1, Bildteil A, aus der Originalpublikation der Promovendin (Lichter et al. 2022).

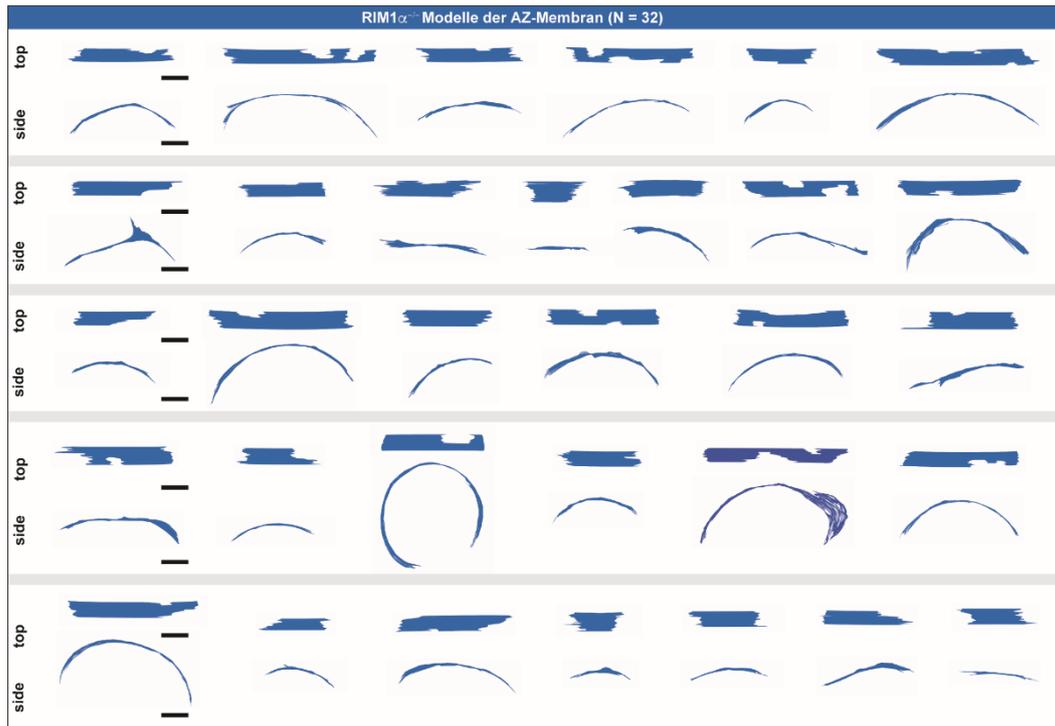


Abbildung 22. RIM1 α ^{-/-}-Modelle der AZ-Membran in hippocampalen MFBs.

Standardisierte Auf-/Seitensicht der IMOD-Modellobjekte für die AZ-Membranen. Maßstab: 100 nm. Die Abbildung entspricht einer übersetzten Version des Supplements Abbildung 1, Bildteil B, aus der Originalpublikation der Promovenden (Lichter et al. 2022).

5.4 Größenzunahme der AZ-Membranfläche in hippocampalen MFBs in RIM1 α ^{-/-}

In der quantitativen Analyse der AZ-Membranflächen zeigte sich eine hochsignifikante Zunahme von im Median 0,100 μm^2 (0,072-0,132, 25-75. Perzentile) in RIM1 α -defizienten AZs verglichen zu 0,068 μm^2 (0,048-0,098) in RIM1 α ^{+/+}-AZs ($p = 0,002$, WMWT, **Tabelle 2**) (**Abbildung 23A**). Innerhalb des jeweiligen Genotyps unterschieden sich die AZ-Membranflächen der drei Tiere nicht (RIM1 α ^{-/-}: $p = 0,987$, RIM1 α ^{+/+}: $p = 0,337$, beides KW ANOVA) (**Abbildung 23B**). Auf Basis der experimentellen Anzahl der eingeschlossenen 3D AZ-Modelle wurde die Differenz der AZ-Membranfläche in beiden Genotypen mit der Kovariablen einer angenommenen Variabilität zwischen den Tieren pro Genotyp simuliert. Die Zunahme der AZ-Membranfläche zeigte sich für den RIM1 α ^{-/-}-Genotyp konstant ($p = 0,001$) (**Abbildung 23C-F**) (**Tabelle 2**, siehe **Appendix** für Modellparameter). Als mathematische Grundlage der Modellierung wurde ein restriktives gemischt lineares Verfahren (*restricted LMM*) eingesetzt und durch eine *Bootstrapping*-Simulation mit 10000 Wiederholungen ergänzt. Eine signifikante Differenz in der 2D-Fläche der dendritischen Dornenköpfe, an denen sich die ausgewählten AZ befanden, bestand zwischen beiden Genotypen nicht ($p = 0,215$, WMWT) (**Abbildung 23F**).

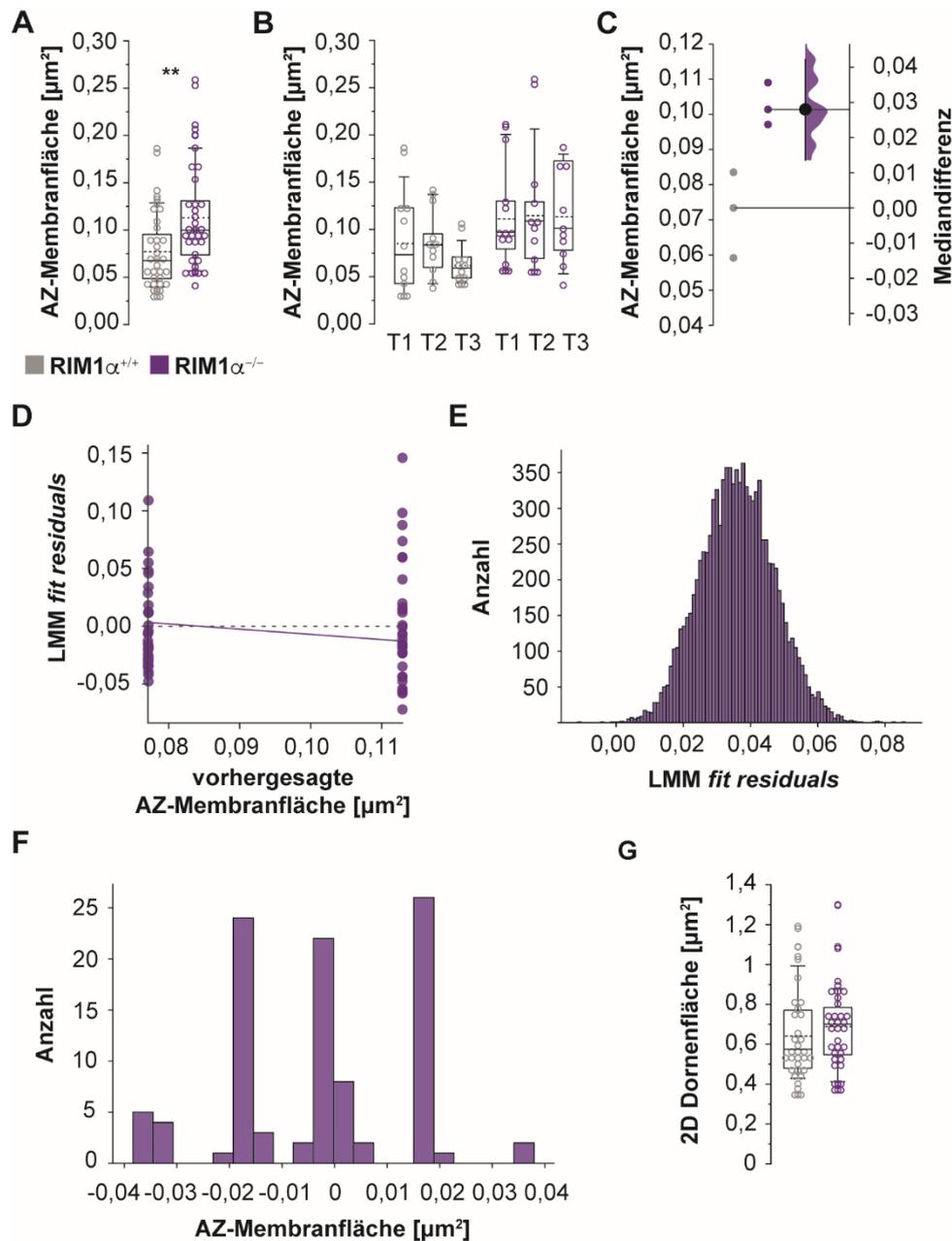


Abbildung 23. Zunahme der AZ-Membranfläche in $RIM1\alpha^{-/-}$.

(A) Diagramm der AZ-Membranfläche in beiden Genotypen. (B) Diagramm der AZ-Membranflächen pro Tier in beiden Genotypen. (C) Gardner-Altman-Diagramm zur Mediandifferenz der AZ-Membranfläche in beiden Genotypen. Die Kurve (violett) repräsentiert das 95-prozentige Konfidenzintervall der *Bootstrapping*-Analyse (5000 *Bootstraps*); auf der rechtsseitigen y-Achse ist die Effektgröße (Mediandifferenz) aufgetragen. (D, E) Diagramm und Histogramm der berechneten Modellresiduen der gemischten linearen Modellierung. (F) Histogramm des Mittelwertes aller randomisierten Koeffizienten. Deren Konfidenzintervall wurde durch eine *Bootstrapping*-Analyse mit 10000 Wiederholungen bestimmt. (G) Diagramm der zweidimensionalen (2D) dendritischen Dornenfläche an den untersuchten AZs, die sich unter beiden Gruppen nicht signifikant unterschied. Die Diagramme sind modifiziert der Abbildung 2, Bildteil I, und dem Supplement Abbildung 2 der Originalpublikation der Promovendin entnommen (Lichter et al. 2022).

Da die Untersuchung einer AZ-Größenveränderung in den KO-Modellen der AZ-Proteine gehäuft auf einer Quantifizierung eines 2D AZ-Profiles beruht und diese Größe in kürzlich veröffentlichten HPF/FS-Studien am hippocampalen MFB 28 Tage alter Mäuse verwendet wurde (Borges-Merjane, Kim, and Jonas 2020), wurde unter den Genotypen die Länge aller 2D AZ-Profile verglichen. Dies umfasste 12750 AZ-Profile in $RIM1\alpha^{-/-}$ und 13991 AZ-Profile in $RIM1\alpha^{+/+}$ und entsprach der Anzahl von elektronentomographischen Schnitten der eingeschlossenen Tomogramme. Äquivalent zu den 3D-Daten zeigte sich im $RIM1\alpha^{-/-}$ -Genotyp eine signifikant vergrößerte mediane AZ-Profillänge von 513,49 nm (330,33-665,85) mit einer hochverstreuten Verteilung der Einzellängen über den gesamten Wertebereich. Die mediane AZ-Profillänge im Wildtyp betrug dazu im Gegensatz 338,77 nm (241,16-460,77) in $RIM1\alpha^{+/+}$ ($p < 0,001$, WMWT) (**Abbildung 24A**).

Ein weiteres 3D-Maß stellt die maximale Ausdehnung der AZ-Membran als größter Durchmesser durch den Mittelpunkt der 3D rekonstruierten AZ-Membranfläche dar. Diese zeigte sich im $RIM1\alpha^{-/-}$ mit 802,50 nm (Standardabweichung (SD): 208,92) im Vergleich zu 602,31 nm (159,14) im $RIM1\alpha^{+/+}$ vergrößert ($p < 0,001$, Welch t-Test) (**Abbildung 24B**). Zusammenfassend ist daher von einer hochsignifikanten Größenzunahme der AZ-Membranfläche in $RIM1\alpha$ -defizienten AZs des hippocampalen MFBs auszugehen.

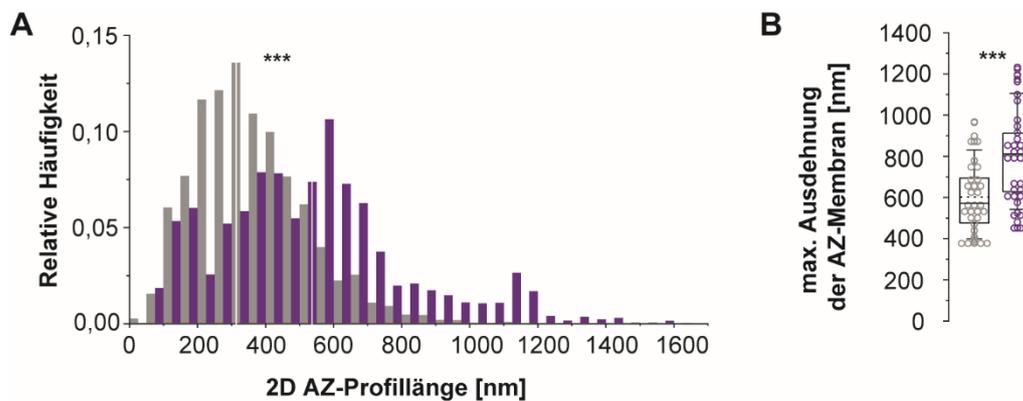


Abbildung 24. Zunahme der 2D AZ-Profillänge und max. Ausdehnung der AZ-Membran in $RIM1\alpha^{-/-}$.

(A) Histogramm der 2D AZ-Profillängen aus allen eingeschlossenen IMOD-Modellen in beiden Genotypen ($RIM1\alpha^{-/-}$: 12750 AZ-Profile, $RIM1\alpha^{+/+}$: 13991 AZ-Profile). (B) Diagramm der maximalen (max.) Ausdehnung der AZ-Membran in beiden Genotypen. Die Abbildung ist eine modifizierte Form der Bildteile J und K, Abbildung 2, der Originalpublikation der Promovenden (Lichter et al. 2022).

Tabelle 2. Zusammenfassung der numerischen und statistischen Werte zu AZ-Membranflächen in beiden Genotypen

Abkürzungen: KW ANOVA = Kruskal-Wallis ANOVA, pw = Analysepower, SD = *standard deviation* (Standardabweichung), T = Tier, WMWT = Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, W t-Test = t-Test nach Welch.

Parameter	RIM1 α ^{-/-}	RIM1 α ^{+/+}	p-Wert	Test	
	Median (25.-75. Perzentile)/ Mittelwert (SD)				
AZ-Membranfläche [μm^2]	0,100 (0,072- 0,132)	0,068 (0,048- 0,098)	0,002	WMWT	
	T1 (12 AZs): 0,097 (0,074-0,131), T2 (10 AZs): 0,109 (0,067-0,135) T3 (10 AZs): 0,101 (0,075-0,173)	-	0,987	KW ANOVA	
	-	T1 (10 AZs): 0,073 (0,041-0,123), T2 (10 AZs): 0,084 (0,057-0,105), T3 (10 AZs): 0,059 (0,049-0,071)	0,337	KW ANOVA	
2D AZ-Profillänge [nm]	513,49 (330,33- 665,85)	338,77 (241,16- 460,77)	< 0,001	WMWT	
Max. Ausdehnung AZ-Membran [nm]	802,50 (208,92)	602,31 (159,14)	< 0,001	W t-Test, pw = 0,99	
2D Dornenfläche [μm^2]	0,701 (0,542- 0,793)	0,575 (0,479- 0,733)	0,215	WMWT	
Linear mixed modelling (LMM): AZ-Membranfläche					
<i>Restricted maximum likelihood, Bootstrapping (BStr) mit 10000 Wiederholungen</i>					
Parameter	LMM	BStr Mittelwert	0,025	0,975	p-Wert
Effekt	0,036	0,036	0,015	0,058	0,001
<i>inter-animal variability</i>	0	-	-	-	-
<i>label swap</i>	-	0,001	-	-	-

5.5 Höhen- und Volumenzunahme des synaptischen Spaltes in RIM1 α ^{-/-}

Eine grundlegende Funktion der AZ besteht in der Vermittlung von transsynaptischen Organisationsprinzipien, in die RIM als zentrales AZ-Protein eingebunden ist (i.a. (Tang et al. 2016)). Die Höhe des synaptischen Spaltes in RIM1 α ^{-/-}-AZs des hippocampalen MFBs war mit einem Mittelwert von 10,08 nm (2,03) im Vergleich zu 8,45 nm im Wildtyp vergrößert ($p = 0,002$, Welch t-Test) (**Abbildung 25A**). Der Mittelwert entspricht einer für den synaptischen Spalt globalen Höhenangabe, der sich aus dem Gesamtvolumen des synaptischen Spaltes dividiert durch die AZ-Membranfläche ergibt. Das Volumen des synaptischen Spaltes war kongruent zur AZ-Membranflächenzunahme mit 947 494 nm³ im RIM1 α ^{-/-}-Genotyp im Vergleich zu 593 067 nm³ im RIM1 α ^{+/+}-Genotyp erhöht ($p < 0,001$, WMWT) (**Abbildung 25B**).

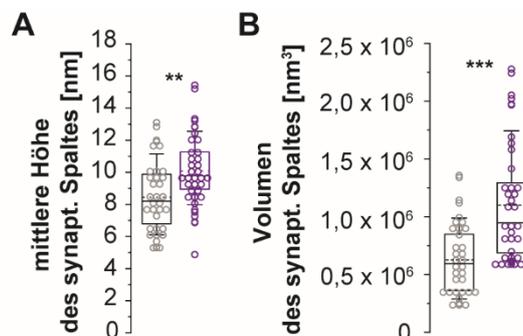


Abbildung 25. Höhen- und Volumenzunahme des synaptischen Spaltes in RIM1 α ^{-/-}.

(A) Diagramm der mittleren Höhe des synaptischen Spaltes in beiden Genotypen. (B) Diagramm des Spaltvolumens in beiden Genotypen. Bildteil A ist eine modifizierte Version des Bildteils L, Abbildung 2, der Originalpublikation der Promovendin (Lichter et al. 2022).

5.6 Akkumulation von Mitochondrien an RIM1 α ^{-/-} AZs

Mitochondrien in der Nähe zu Präsynapsen fungieren u.a. als interne Calciumspeicher, Regulatoren einer Calciumhomöostase und ATP-Produzenten (Devine and Kittler 2018). Während der quantitativen Ultrastrukturanalysen an den AZs beider Genotypen fiel auf deskriptiv-optischer Ebene auf, dass Mitochondrien bzw. mitochondriale Netzwerke eine hohe Präsenz an einzelnen AZs aufwiesen (**Abbildung 26A, B**). Für den hippocampalen MFB des Wildtyps ist die Präsenz von Mitochondrien beschrieben (Rollenhagen and Lübke 2010), eine quantitative Untersuchung in Bezug auf AZs wurde bisher nicht durchgeführt.

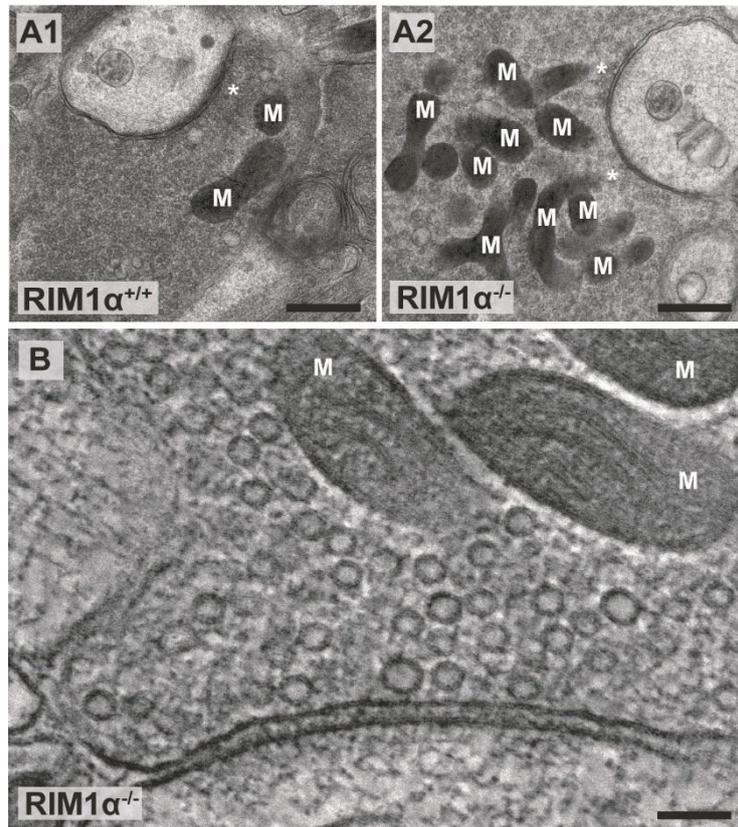


Abbildung 26. Akkumulation von Mitochondrien an RIM1 α ^{-/-} AZs.

(A1-2) Exemplarische Elektronenmikrographien von AZs mit örtlich assoziierten Mitochondrien (M) in hippocampalen MFBs in beiden Genotypen. Beide Elektronenmikrographien wurden für die stereologische Quantifizierung der mitochondrialen Fläche genutzt. (B) Elektronentomographischer Schnitt einer RIM1 α ^{-/-} AZ, an der membrannahen Mitochondrien assoziiert sind. Ultrastrukturell lassen sich die Einfaltungen der inneren Mitochondrienmembran (*Cristae*) identifizieren. Maßstab: (A1-2) 500 nm, (B) 100 nm. Die Bildteile sind in modifizierter Form dem Supplement Abbildung 3 der Originalpublikation der Promovendin entnommen (Lichter et al. 2022).

Unter Anwendung einer Methode der 2D-Stereologie (Hacker and Lucocq 2014) zeigte sich eine signifikant erhöhte Präsenz von mitochondrialer Fläche an RIM1 α ^{-/-} AZs zwischen 200-500 nm Distanz zur AZ-Membran (200-300 nm: p = 0,016, 300-400 nm: p = 0,038, 400-500 nm: p = 0,050, WMWT) (**Abbildung 27A-B**) (**Tabelle 3**). In beiden Genotypen konnte in den ausgewählten Elektronenmikrographen kein signifikanter Anteil mitochondrialer Fläche zwischen 0-200 nm nachgewiesen werden (**Abbildung 27B**). Perisynaptisch, d.h. in bis zu 200 nm Distanz zu den AZ-Rändern, wiesen 25 von 45 RIM1 α ^{-/-} AZs mitochondriale Fläche mit einem größten Anteil in einer Distanz von 300-400 nm zu der perisynaptischen Plasmamembran auf (**Abbildung 27B**). In RIM1 α ^{+/+} AZs wurde keine mitochondriale Fläche quantifiziert, die der ausgewählten AZ zugeordnet werden konnte (**Tabelle 3**). Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse auf eine Akkumulation von Mitochondrien an RIM1 α ^{-/-} AZs in großen hippocampalen MFBs hin.

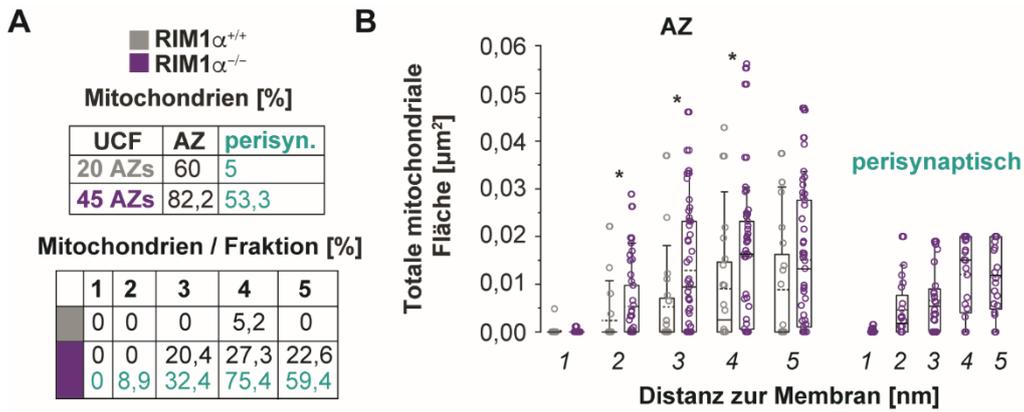


Abbildung 27. Quantifizierung der mitochondrialen 2D-Flächen in beiden Genotypen.

(A) Prozentuale Verteilung der mitochondrialen 2D-Fläche in beiden Genotypen. (B) Diagramm der totalen mitochondrialen Fläche an der AZ und perisynaptisch in beiden Genotypen. UCF = *unbiased counting frame*. Die Bildteile sind in modifizierter Form dem Supplement Abbildung 3 der Originalpublikation der Promovendin entnommen (Lichter et al. 2022).

Tabelle 3. Zusammenfassung der numerischen und statistischen Werte der 2D-Flächen von Mitochondrien in beiden Genotypen.

Abkürzungen: mito. = mitochondrial, pw = Analysepower, SD = *standard deviation* (Standardabweichung), WMWT = Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, W t-Test = t-Test nach Welch. Die EM-Aufnahmen entsprachen standardisierten Elektronenmikrographien bei 15 000-facher Vergrößerung. Details sind dem Methodenteil zu entnehmen.

Parameter	RIM1α^{-/-}	RIM1α^{+/+}	p-Wert	Test
	N = 45 EM-Aufnahmen	N = 20 EM-Aufnahmen		
	Median (25.-75. Perzentile)/ Mittelwert (SD)			
Mito. Gesamtfläche - AZ [μm^2]				
0-100 nm	1 von 45 AZ: 0,001	1 von 20 AZ: 0,005	-	-
100-200 nm	0	0	-	-
200-300 nm	0,009 (0,000-0,023)	0,000 (0,000-0,007)	0,016	WMWT
300-400 nm	0,016 (0,000-0,024)	0,003 (0,000-0,015)	0,038	WMWT
400-500 nm	0,013 (0,000-0,028)	0,000 (0,000-0,017)	0,05	WMWT
Mito. Gesamtfläche - perisynaptisch [μm^2]				
RIM1 α ^{-/-} : 25 von 45 EM-Aufnahmen, RIM1 α ^{+/+} : 1 von 20 EM-Aufnahmen				
0-100 nm	0	-	-	-
100-200 nm	0,002 (0,000-0,009)	-	-	-
200-300 nm	0,005 (0,000-0,009)	-	-	-
300-400 nm	0,015 (0,004-0,020)	-	-	-
400-500 nm	0,012 (0,004-0,020)	1 AZ: 0,111	-	-

5.7 Hochaufgelöste 3D-Visualisierung von synaptischen Vesikeln in AZs des hippocampalen MFBs

Die Kombination aus Elektronentomographie in hohen Vergrößerungen und HPF/FS-präparierten akuten Hirnschnitten vermittelten einen bisher unbekanntem visuellen Detailreichtum von individuellen SVs in 0-10 nm Distanz zur AZ-Membran (**Abbildung 28**). Optisch ließen sich in nanoskopischer Auflösung sowohl feine filamentöse Strukturen auf der äußeren SV-Membran identifizieren als auch EDM unterschiedlicher Gestalt zwischen SV und AZ-Membran.

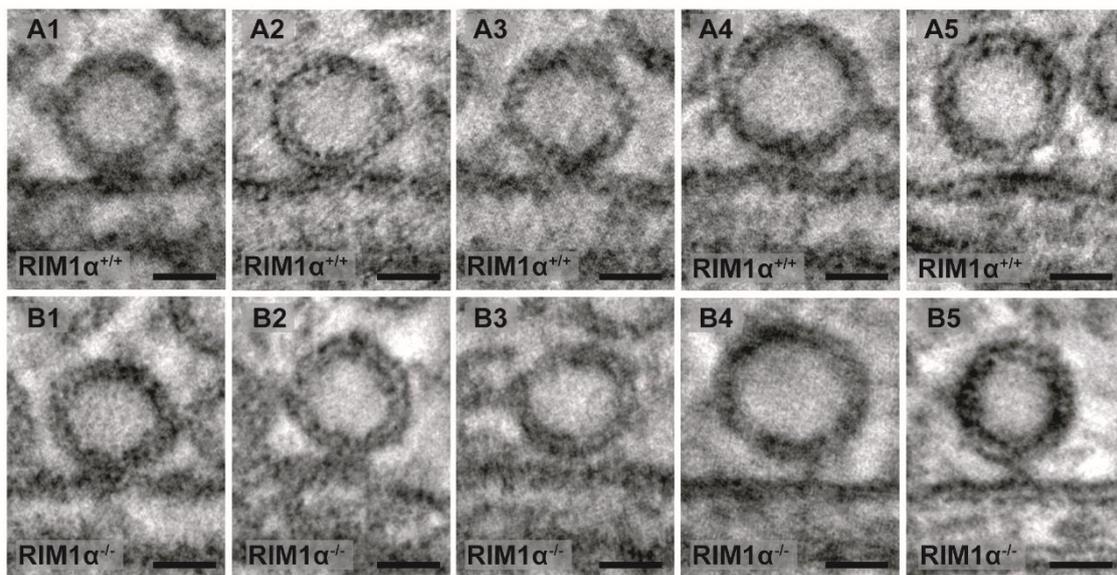


Abbildung 28. Hoचाufgelöste 3D-Visualisierung von synaptischen Vesikeln in AZs des hippocampalen MFBs.

(A1-A5) Exemplarische elektronentomographische Schnitte von SVs in unmittelbarer Nähe zur AZ-Membran in RIM1α^{+/+}. (B1-B5) Exemplarische elektronentomographische Schnitte von SVs in unmittelbarer Nähe zur AZ-Membran in RIM1α^{-/-}. Maßstab: (A, B) 25 nm. Die Bildteile A2, A4, B2 und B4 entsprechen den Bildteilen A1-A4 in Abbildung 3 der Originalpublikation der Promovendin (Lichter et al. 2022).

5.8 *Docked SV pool* – Reduktion und Delokalisation der gedockten SVs in RIM1α^{-/-} AZs des hippocampalen MFBs

5.8.1 Reduziertes SV-Docking in RIM1α^{-/-}

In RIM1α^{-/-} AZs des großen hippocampalen MFBs war der SV-Pool aus eng gedockten SVs (0-2 nm) mit 0,341 SVs pro 0,01 μm² AZ-Membranfläche (0,108-0,469) im Vergleich zu 1,133 SVs pro 0,01 μm² AZ-Membranfläche (0,674-1,410) in RIM1α^{+/+} AZs signifikant reduziert (p < 0,001, WMWT) (**Abbildung 29A**). In einer erweiterten Definition von SV-Docking (0-5 nm) verblieb das SV-Docking in RIM1α^{-/-} AZs mit 0,946 SVs pro 0,01 μm² AZ-Membranfläche (0,477) im Vergleich zu 1,662 SVs pro 0,01 μm² AZ-Membranfläche

(0,679) in RIM1 $\alpha^{+/+}$ AZs ebenfalls signifikant vermindert ($p < 0,001$, Welch t-Test, Power = 0,99) (**Abbildung 29A**). Unter Annahme des SV-Dockings als zeitlich konsekutiver Vorgang und einer funktionell begründeten Definition in eng und lose gedockte SVs (Neher and Brose 2018), wurden in beiden Genotypen gedockte SVs in 2,1-5 nm Distanz zur AZ-Membran quantifiziert. Es zeigte sich eine leichte, jedoch nicht signifikante Zunahme der gedockten SVs von 0,612 SVs pro 0,01 μm^2 AZ-Membranfläche (0,365) in RIM1 $\alpha^{-/-}$ AZs verglichen zu 0,488 SVs pro 0,01 μm^2 AZ-Membranfläche (0,256) in RIM1 $\alpha^{+/+}$ AZs ($p = 0,123$, Welch t-Test, Power = 0,34) (**Abbildung 29A**). Bei den sog. *tethered* SVs, d.h. durch EDM verbundene SVs in 5,1-10 nm Distanz zur AZ-Membran, bestand in der Anzahl der SVs pro 0,01 μm^2 AZ-Membranfläche keine Differenz ($p = 0,871$, WMWT). Durchschnittlich lokalisierten sich SVs in 0-10 nm Distanz zur AZ-Membran in RIM1 $\alpha^{-/-}$ AZs mit 3,36 nm (1,96-5,10; N = 429 SVs) doppelt so weit von der Membran entfernt als SVs mit 1,75 nm (0,00-3,88; N = 428 SVs) in RIM1 $\alpha^{+/+}$ AZs ($p < 0,001$, WMWT) (**Abbildung 29B**).

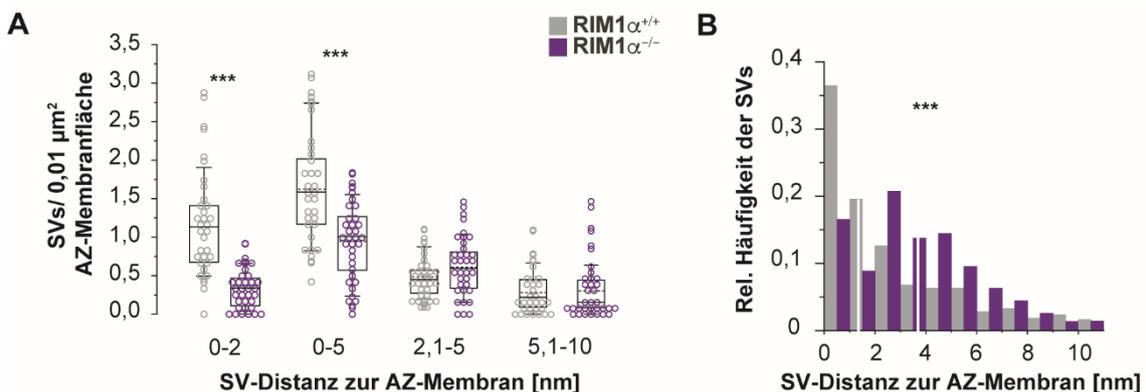


Abbildung 29. Reduziertes SV-Docking in RIM1 $\alpha^{-/-}$.

(A) Diagramm der zur AZ-Membranfläche normalisierten SV-Anzahl zwischen 0-10 nm Distanz zur AZ-Membran in beiden Genotypen. (B) Histogramm der relativen Häufigkeit der SVs in Relation zur Distanz des SVs zur AZ-Membran. Die Abbildung entspricht einer übersetzten und modifizierten Version des Bildteils B, Abbildung 3, der Originalpublikation der Promovendin (Lichter et al. 2022).

5.8.2 Distanzzunahme der perisynaptischen SVs (0-10 nm) in RIM1 $\alpha^{-/-}$

Untersuchungen in *C. elegans* zeigen, dass sich SVs bei RIM-Defizienz peripher in Relation zu der AZ lokalisieren (Stigloher et al. 2011). In vorliegender Quantifizierung waren gedockte SVs und „*tethered*“ SVs mit bis zu 200 nm Distanz zu den AZ-Rändern in beiden Genotypen selten (RIM1 $\alpha^{-/-}$: 91 SVs, RIM1 $\alpha^{+/+}$: 86 SVs). Betrachtet man die Distanz der SVs zur perisynaptischen Membran, befanden sich diese im RIM1 $\alpha^{-/-}$ -Genotyp - äquivalent zu den SVs innerhalb der AZ – mit 6,01 nm (3,75-8,12) nahezu doppelt so weit

entfernt von der Membran wie SVs mit 3,47 nm (1,46-6,75) im RIM1 $\alpha^{+/+}$ -Genotyp ($p < 0,001$, WMWT) (**Abbildung 30**).

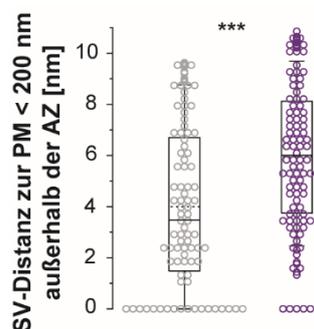


Abbildung 30. Distanzzunahme der perisynaptischen SVs in 0-10 nm Distanz zur Plasmamembran in RIM1 $\alpha^{-/-}$.

Diagramm der SV-Distanz zur perisynaptischen Plasmamembran (PM) mit < 200 nm Distanz zu den AZ-Rändern in beiden Genotypen. Die Abbildung entspricht einer modifizierten und übersetzten Version des Bildteils C, Abbildung 3, der Originalpublikation der Promovendin (Lichter et al. 2022)

5.8.3 Reduziertes elektronendichtes Material an eng gedockten SVs in RIM1 $\alpha^{-/-}$

Gedockte SVs sind mit der AZ-Membran durch EDM strukturell verbunden (**Abbildung 31A**), das sowohl ein ultrastrukturelles Korrelat der SV-Proteine auf der äußeren SV-Membran als auch von AZ- und SNARE-Proteinen auf der AZ-Membran darstellen kann. Bisher wurde dieses weder an gedockten SVs in akuten murinen Hirnschnitten untersucht noch existierte ein quantitatives Maß in den unterschiedlichen Definitionen der gedockten SVs.

Eng gedockte SVs in RIM1 $\alpha^{-/-}$ AZs ($N = 101$ SVs) des großen hippocampalen MFBs besaßen mit einer Breite von 17,87 nm (5,62) ein reduziertes EDM verglichen zu 19,43 nm (6,42) für eng gedockte SVs ($N = 188$ SVs) in RIM1 $\alpha^{+/+}$ AZs ($p = 0,033$, Welch t-Test, Power = 0,57) (**Abbildung 31B**). Wurde die EDM-Breite zum individuellen SV-Durchmesser normalisiert, verblieb das relative EDM des eng gedockten SVs im RIM1 $\alpha^{-/-}$ -Genotyp mit 39,6% des SV-Durchmessers (31,7-45,5) reduziert. Eng gedockte SVs in RIM1 $\alpha^{+/+}$ AZs des großen hippocampalen MFBs besitzen im Median ein mit 41,8% des SV-Durchmessers (32,2-51,8) im Vergleich zu RIM1 $\alpha^{-/-}$ signifikant größeres EDM ($p = 0,043$, WMWT) (**Abbildung 31C**). Das absolute EDM lose gedockter SVs (2,1-5 nm) unterschied sich hingegen zwischen beiden Genotypen nicht signifikant (RIM1 $\alpha^{-/-}$: 13,86 nm (9,69-18,53 nm), $N = 136$ SVs; RIM1 $\alpha^{+/+}$: 13,59 nm (10,68-17,00), $N = 62$ SVs; $p = 0,665$, WMWT) (**Abbildung 31B**). Dies ließ sich auch in einer normalisierten Rechnung bestätigen (RIM1 $\alpha^{-/-}$: 32% des SV-Durchmessers (22,4-41,9); RIM1 $\alpha^{+/+}$: 30,6% (23,5-

36,9); $p = 0,331$, WMWT) (**Abbildung 31C**). Unter Betrachtung der relativen EDM-Breite unter allen gedockten SVs zwischen 0-5 nm war diese in RIM1 $\alpha^{-/-}$ AZs mit 36,5% des SV-Durchmessers (26,5-43,8) verglichen zu RIM1 $\alpha^{+/+}$ AZs (38,5%, 29,9-48,7; $p = 0,003$, WMWT) reduziert. In beiden Genotypen differierte das relative EDM zwischen den beiden *Docking*-Kategorien hochsignifikant (RIM1 $\alpha^{-/-}$: $p < 0,001$, Welch t-Test, Power = 0,95; RIM1 $\alpha^{+/+}$: $p < 0,001$, WMWT) (**Abbildung 31C**).

In RIM1 $\alpha^{-/-}$ AZs des großen hippocampalen MFBs wiesen SVs des gesamten SV-Pools (N = 4079 SVs) einen gering vergrößerten, jedoch hochsignifikant unterschiedlichen SV-Durchmesser von 43,96 nm (41,33-46,7) im Vergleich zu 43,39 nm (41,33-46,15) der SVs in RIM1 $\alpha^{+/+}$ AZs auf ($p < 0,001$, WMWT) (**Abbildung 31D**). Zusammenfassend ist in RIM1 $\alpha^{-/-}$ AZs des großen hippocampalen MFBs nicht nur von einer Reduktion des (eng) gedockten SV-Pools, sondern ebenso von einer Reduktion und Veränderung des EDMs unmittelbar am individuell (eng) gedockten SV auszugehen.

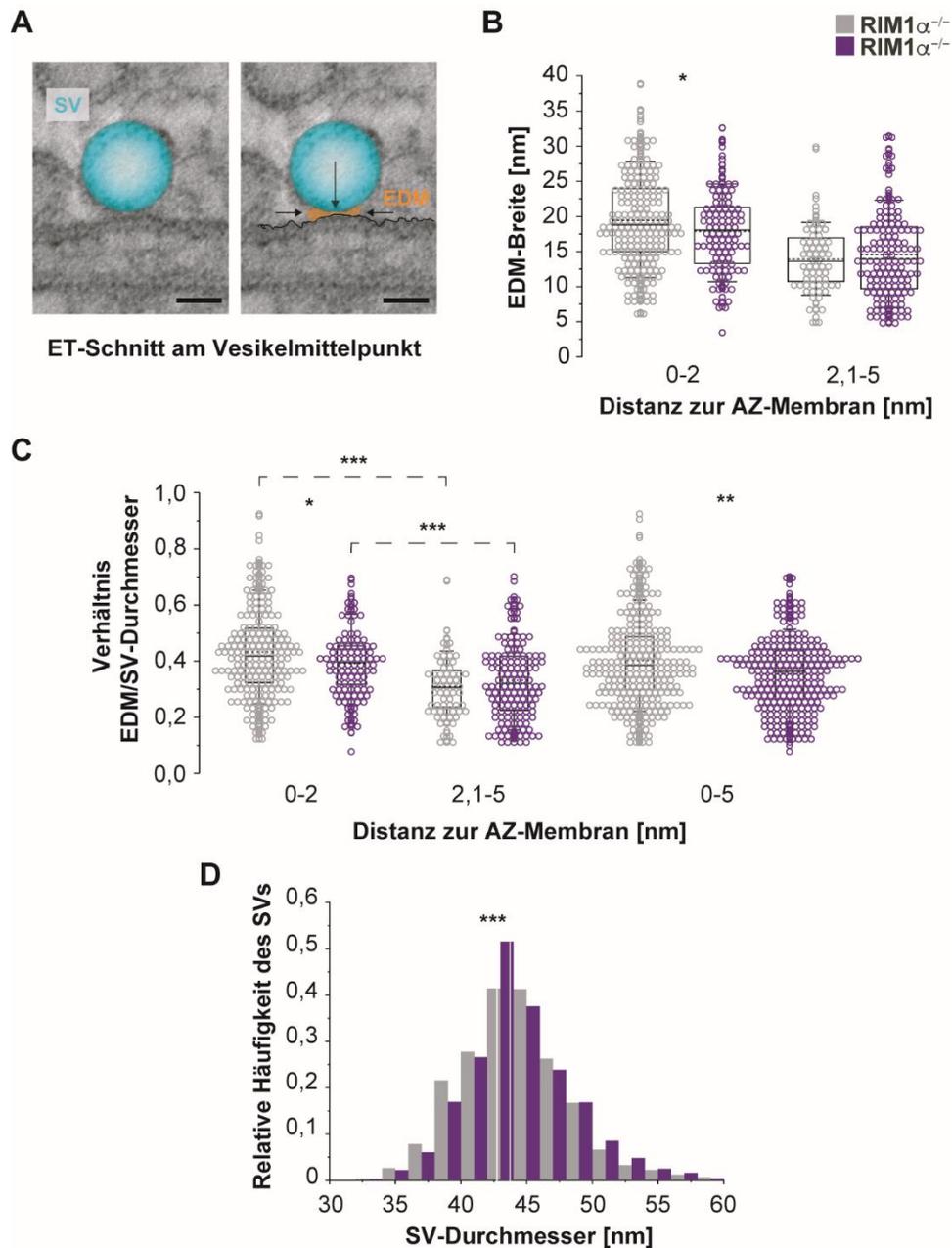


Abbildung 31. Reduziertes elektronendichtes Material an eng gedockten SVs in RIM1 $\alpha^{-/-}$. (A) Elektronentomographischer Schnitt eines gedockten SVs (cyan) am Vesikelmittelpunkt mit integrierter 3D-Modellierung (IMOD) und Annotation des elektronendichten Materials (EDM, orange), das den SV mit der AZ-Membran verbindet. (B) Diagramm der EDM-Breite in gedockten SVs der beiden Genotypen. (C) Diagramme der zum individuellen SV-Durchmesser normalisierten EDM-Breite in gedockten SVs der beiden Genotypen. (D) Histogramm der SV-Durchmessers in beiden Genotypen. Maßstab: (A) 25 nm. Die Bildteile A, B und D sind eine modifizierte und übersetzte Version der Bildteile D-F, Abbildung 3, der Originalpublikation der Promovendin (Lichter et al. 2022).

5.8.4 Delokalisation des eng gedockten SV-Pools in RIM1 $\alpha^{-/-}$

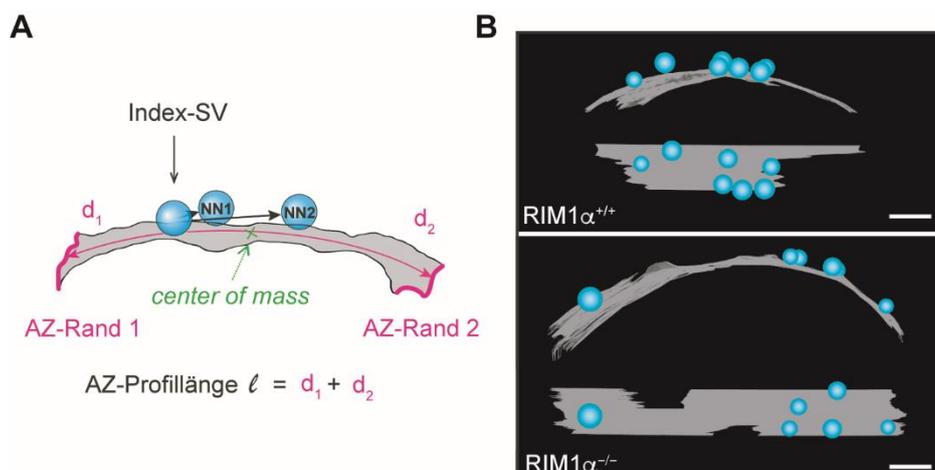


Abbildung 32. Die Geometrie des eng gedockten SV-Pools in AZs des hippocampalen MFBs.

(A) Schemazeichnung der geometrischen Parameter zur Quantifizierung des eng gedockten SV-Pools in AZs des hippocampalen MFBs. (B) Exemplarische Ansichten jeweils eines IMOD-Modells mit AZ-Membran (grau) und eng gedockten SVs (cyan). Maßstab: (B) 100 nm. Die Abbildung ist eine modifizierte und übersetzte Version der Bildteile A-B, Abbildung 4, der Originalpublikation der Promovendin (Lichter et al. 2022).

Die Lokalisation der Vesikelfreisetzung bzw. der gedockten SVs steht in Zusammenhang mit asynchronen und synchronen Formen der Vesikelfreisetzung an Synapsen (Kusick et al. 2020; Mendonca et al. 2022). In AZs des großen hippocampalen MFBs erfolgte bisher keine 3D-geometrische Quantifizierung der gedockten SVs (**Abbildung 32**).

Unter Anwendung programmiergestützter Berechnungen zu den nächsten Nachbar-SVs (*nearest neighbour (NN) calculation*, **Appendix**) verteilte sich der eng gedockte SV-Pool in RIM1 $\alpha^{-/-}$ AZs mit vergrößerten NN-Distanzen zwischen einem individuell eng gedockten SV und seinen nächsten eng gedockten Nachbar-SVs auf der gesamten AZ-Membranfläche (NN1-NN5: $p < 0,001$, WMWT) (**Abbildung 33A**) (**Tabelle 4**). Eng gedockte SVs in RIM1 $\alpha^{-/-}$ AZs befanden im Median nahezu doppelt so weit auseinander wie eng gedockte SVs in RIM1 $\alpha^{+/+}$ AZs (**Abbildung 33A**) (**Tabelle 4**). Setzt man die Position des individuell eng gedockten SVs in Relation zu den beiden AZ-Rändern, die sich klar im 3D-Tomogrammvolume der AZ identifizieren ließen, befanden sich diese in RIM1 $\alpha^{-/-}$ AZs (N = 108 SVs) im Median 404,65 nm (186,92-632,44) zum einen AZ-Rand und korrespondierend 550,76 nm (299,09-915,65) zum anderen AZ-Rand entfernt (**Abbildung 33B**). In einer normalisierten Rechnung zu der dazugehörigen AZ-Profillänge entsprach dies einem Verhältnis von 0,389 (0,207-0,643) zu 0,611 (0,357-0,793). Beide relative Distanzen unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$, WMWT) (**Abbildung 33C**). Das bedeutet, dass sich ein eng gedockter SV in Relation zu den AZ-Rändern im äußeren Drittel

der AZ-Membranfläche in RIM1 α ^{-/-} AZs befindet. Dies unterschied sich signifikant zu den eng gedockten SVs (N = 203 SVs) in RIM1 α ^{+/+} AZs, die mit 219,07 nm (120,55-341,93) zum einen AZ-Rand und mit 227,59 nm (107,09-381,22) korrespondierend zum anderen AZ-Rand geringere absolute Distanzen aufwiesen (p < 0,001, WMWT) (**Abbildung 33B**). Dies entsprach einem relativen Distanzverhältnis von 0,479 (0,251-0,744) zu 0,521 (0,256-0,748) zu beiden AZ-Rändern, wobei sich die beiden relativen Maße nicht signifikant voneinander unterschieden (p = 0,859, WMWT) (**Abbildung 33C**). Das bedeutet, dass sich ein eng gedockter SV in RIM1 α ^{+/+} AZs in Relation zu den AZ-Rändern nahezu mittig auf der AZ-Membran positioniert und die Entfernungen zu einem der beiden AZ-Ränder keinen signifikanten Unterschied untereinander besitzen. Dies differierte signifikant vom relativen Distanzverhältnis des eng gedockten SVs zu den AZ-Rändern in RIM1 α ^{-/-} AZs (p = 0,031, WMWT) (**Abbildung 33C**).

Als weiteres geometrisches Maß zur Beschreibung der 3D-Lokalisation eng gedockter SVs kann das Massezentrum (*center of mass*, c.o.m.) einer AZ dienen (Mrestani et al. 2021). In RIM1 α ^{-/-} AZs des großen hippocampalen MFBs waren eng gedockte SVs (N = 108 SVs) im Median mit 195,03 nm (118,28-312,79) weiter vom Massezentrum der AZ entfernt als eng gedockte SVs (N = 203 SVs) mit 110,59 nm (68,73-187,13) in RIM1 α ^{+/+} AZs (p < 0,001, WMWT) (**Abbildung 33D**).

Zusammenfassend ist von einer Veränderung des eng gedockten SV-Pools in hippocampalen MFBs des RIM1 α -defizienten Genotyps auf Basis unterschiedlicher quantitativer geometrischer 2D/3D-Maße auszugehen, die sich vor allem in der periphereren Lokalisation der eng gedockten SVs manifestiert.

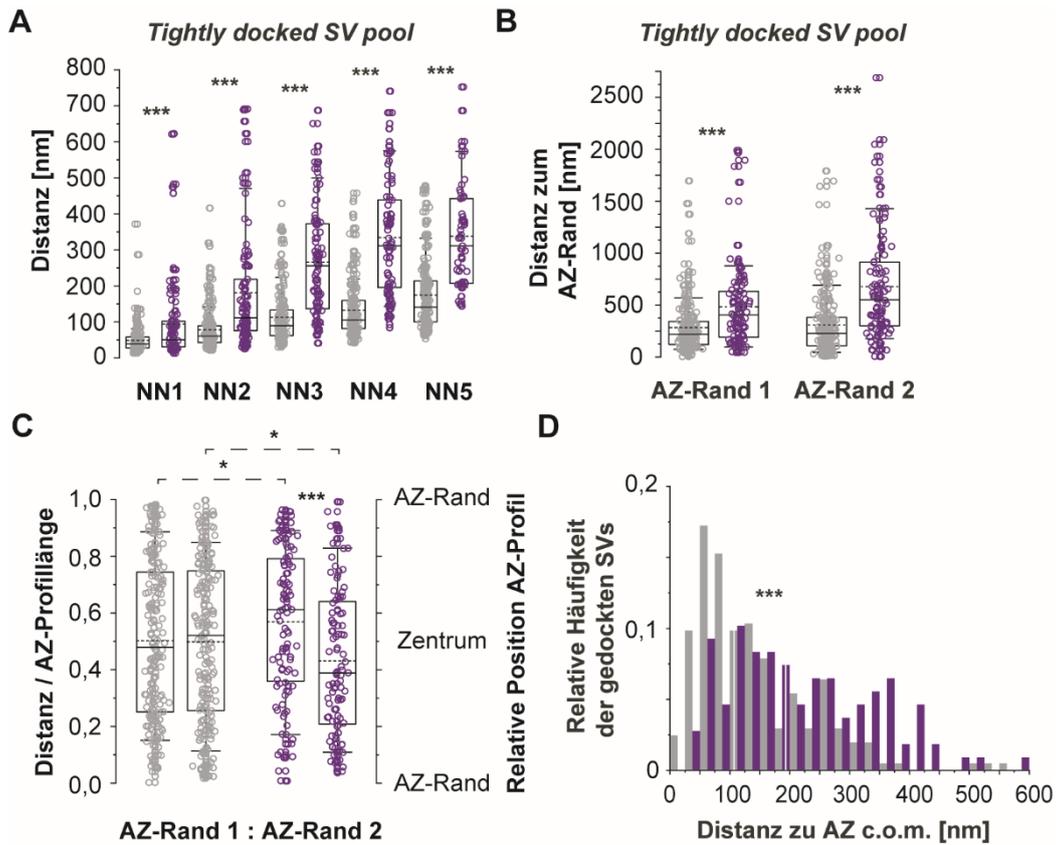


Abbildung 33. Delokalisation des eng gedockten SV-Pools in $RIM1\alpha^{-/-}$.

(A) Diagramm der *nearest neighbouring* (NN)-Distanzen von benachbarten eng gedockten SVs zu einem eng gedockten Index-SV in beiden Genotypen. (B) Diagramm der Distanz eines individuellen, auf einem 2D AZ-Profil gelegenen eng gedockten SVs zu beiden AZ-Rändern, dargestellt für beide Genotypen. (C) Diagramm der zur individuellen 2D AZ-Profillänge normalisierten Distanz eines eng gedockten SVs zu beiden AZ-Rändern. (D) Histogramm der relativen Häufigkeit der eng gedockten SVs in Relation zu ihrer Distanz zum Massenzentrum (*center of mass*, c.o.m.) der AZ. Die Abbildung entspricht einer modifizierten und übersetzten Version der Bildteile C-E, Abbildung 4, der Originalpublikation der Promovenden (Lichter et al. 2022).

Tabelle 4. Zusammenfassung der numerischen und statistischen Werte der NN-Distanzen des eng gedockten SV-Pools in beiden Genotypen.

N = Anzahl, NN = *nearest neighbouring*, SD = *standard deviation* (Standardabweichung), WMWT = Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.

Parameter	RIM1 α ^{-/-}	RIM1 α ^{+/+}	p-Wert	Test
	Median (25.-75. Perzentile)/ Mittelwert (SD)			
NN-Distanzen				
NN1 [nm]	50,57 (31,00-101,83) für N = 110 SVs	39,05 (28,12-57,88) für N = 225 SVs	< 0,001	WMWT
NN2 [nm]	111,32 (75,50-227,31) für N = 110 SVs	60,97 (42,90-89,15) für N = 225 SVs	< 0,001	WMWT
NN3 [nm]	255,59 (136,25-374,15) für N = 101 SVs	89,42 (62,32-134,23) für N = 216 SVs	< 0,001	WMWT
NN4 [nm]	310,94 (194,49-443,03) für N = 89 SVs	105,27 (81,53-159,60) für N = 203 SVs	< 0,001	WMWT
NN5 [nm]	310,94 (207,22-442,37) für N = 59 SVs	141,10 (99,92-215,09) für N = 188 SVs	< 0,001	WMWT

5.9 Die Organisation des SV-Pools (0-200 nm) in AZs des hippocampalen MFBs

5.9.1 Reduktion des SV-Pools in RIM1 α ^{-/-}

Geht eine veränderte Organisation des eng gedockten SV-Pools mit einer Reduktion des gesamten SV-Pools an RIM1 α -defizienten AZs des großen hippocampalen MFBs einher? Vorarbeiten an RIM1 α -defizienten, kryo-immobilisierten zerebro-kortikalen Synaptosomen weisen auf einen reduzierten SV-Pool hin (Fernandez-Busnadiego et al. 2013). In vorliegender Analyse war der SV-Pool an RIM1 α ^{-/-} AZs des großen hippocampalen MFBs, definiert als die Gesamtheit der SVs mit 0-200 nm euklidischer Distanz zur AZ-Membran pro 250 nm dickem Semidünnschnitt, mit im Mittel 12,14 (3,33) SVs pro 0,01 μm^2 AZ-Membranfläche im Vergleich zu 15,26 (4,24) SVs an RIM1 α ^{+/+} AZs reduziert ($p = 0,002$, Welch t-Test, Power = 0,86). Nimmt man einen durchschnittlichen SV-Durchmesser von 43-44 nm an und addiert eine Proteinbesatzzone auf der äußeren SV-Membran von ca. 5 nm, so erschien eine 2D-Aufteilung des SV-Pools in vier Distanzfraktionen sinnvoll (I: 0-50 nm, II: 51-100 nm, III: 101-150 nm, IV: 151-200 nm) (Kaeser and Regehr 2017). In allen Distanzfraktionen fand sich relativiert zur AZ-Membranfläche eine signifikant reduzierte SV-Anzahl in RIM1 α -defizienten AZs, wobei in beiden Genotypen die meisten SVs in der Distanzfraktion III quantifiziert wurden (**Tabelle 5**) (**Abbildung 34A, B**).

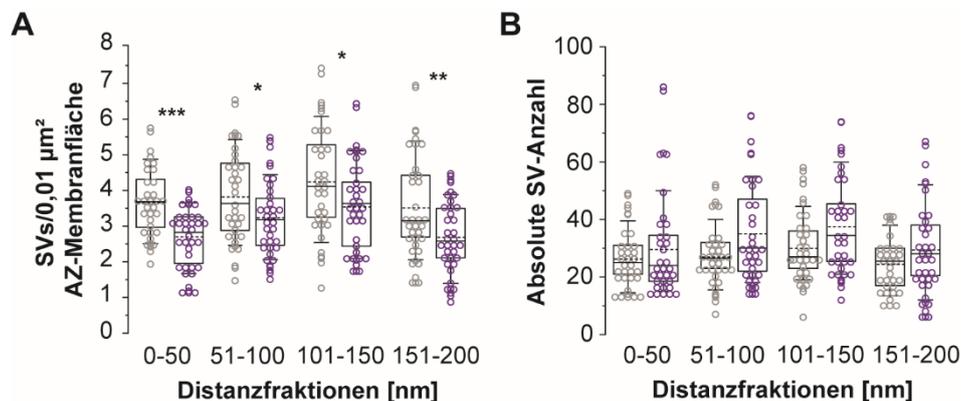


Abbildung 34. Reduktion des SV-Pools in RIM1 α ^{-/-}.

(A) Diagramm der zur AZ-Membranfläche normalisierten SV-Anzahl in vier Distanzfraktionen unter beiden Genotypen. (B) Absolute SV-Anzahl in vier Distanzfraktionen unter beiden Genotypen. Die Abbildung entspricht einer modifizierten und übersetzten Version der Bildteile G-H, Abbildung 4, der Originalpublikation der Promovendin (Lichter et al. 2022).

5.9.2 Direkte Korrelation der AZ-Membranfläche und der Größe des SV-Pools in beiden Genotypen

Sowohl in $RIM1\alpha^{-/-}$ AZs als auch in $RIM1\alpha^{+/+}$ AZs des großen hippocampalen MFBs korrelierten die AZ-Membranfläche und die Größe des SV-Pools direkt miteinander (für beide: $p < 0,001$, Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman) (**Abbildung 35A**). Diese Korrelation zeigte sich ebenso, wenn auch mit reduziertem Rangkorrelationskoeffizienten im $RIM1\alpha^{-/-}$ -Genotyp, für den membrannahen SV-Pools in 0-50 nm Distanz zur AZ-Membran in beiden Genotypen ($RIM1\alpha^{-/-}$: $r = 0,611$, $RIM1\alpha^{+/+}$: $r = 0,871$, für beide: $p < 0,001$; Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman). Die schwächere Korrelation im $RIM1\alpha^{-/-}$ -Genotyp zeigte sich in einem signifikanten Unterschied zwischen beiden Korrelationen ($p = 0,007$, $F = 5,49$, F-Test) (**Abbildung 35B**).

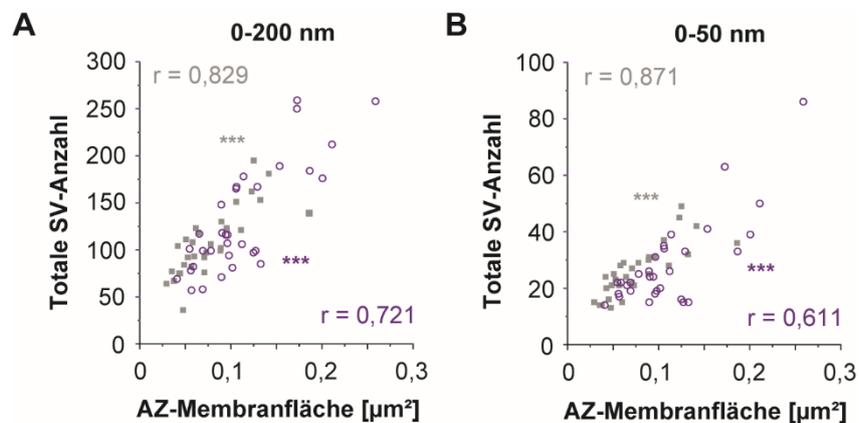


Abbildung 35. Positive Korrelation der AZ-Membranfläche und der Größe des SV-Pools in beiden Genotypen.

(A) Diagramm der Korrelation zwischen absoluter SV-Anzahl mit 0-200 nm Distanz und AZ-Membranfläche in beiden Genotypen. (B) Diagramm der Korrelation zwischen absoluter SV-Anzahl mit 0-50 nm Distanz und AZ-Membranfläche in beiden Genotypen. Bildteil A entspricht einer modifizierten und übersetzten Version des Bildteils F, Abbildung 4, der Originalpublikation der Promovendin (Lichter et al. 2022).

5.9.3 Veränderte 3D-Organisation des SV-Pools in $RIM1\alpha^{-/-}$

In Studien zu KO-Modellen der AZ-Proteine, im Speziellen auch $RIM1\alpha$ und dem großen MFB, überwiegt eine 2D-Beschreibung des SV-Pools auf Basis von Distanzfraktionen unterschiedlicher Größe (z.B. (Imig et al. 2014; Fernandez-Busnadiego et al. 2013; Rollenhagen and Lübke 2010) (**Abbildung 36A**). Äquivalent zu Berechnungen für den eng gedockten SV-Pool erfolgte für vorliegende Analysen auf Basis der 3D-Koordinaten der SV-Mittelpunkte und SV-Radien aus den 3D IMOD-Modellen die Implementation einer programmiergestützten Berechnung der nächsten SV-Nachbarn für den gesamten

SV-Pool (**Appendix**). Dies wurde mit der üblichen Analyse in Distanzfraktionen je 50 nm kombiniert (**Abbildung 36A**).

Während der reduzierte eng gedockte SV-Pool in RIM1 α ^{-/-} AZs des großen hippocampalen MFBs vergrößerte NN-Distanzen zeigte, d.h. eng gedockte SVs zueinander weit verteilt auf der AZ-Membran lagen, wies der SV-Pool in RIM1 α ^{-/-} AZs sowohl in unmittelbarer Nähe zur AZ-Membran (0-50 nm) als auch weiter distal (51-200 nm) signifikant geringere NN-Distanzen als der SV-Pool in RIM1 α ^{+/+} auf (**Tabelle 5**) (**Abbildung 36B-C**). Die NN-Distanzen reduzierten sich mit zunehmender Distanz zur AZ-Membran (**Tabelle 5**) (**Abbildung 36B-C**). Die NN-Distanzen der an der AZ-Membran lokalisierten Distanzfraktion I (0-50 nm) unterschieden sich in beiden Genotypen signifikant von den NN-Distanzen der übrigen Distanzfraktionen (51-200 nm) (für beide: p < 0,001, WMWT) (**Tabelle 5**) (**Abbildung 36D**).

Zusammenfassend ist somit von einer Reduktion des SV-Pools als auch einer differenten geometrischen Organisation in RIM1 α -defizienten AZs des großen hippocampalen MFBs auszugehen.

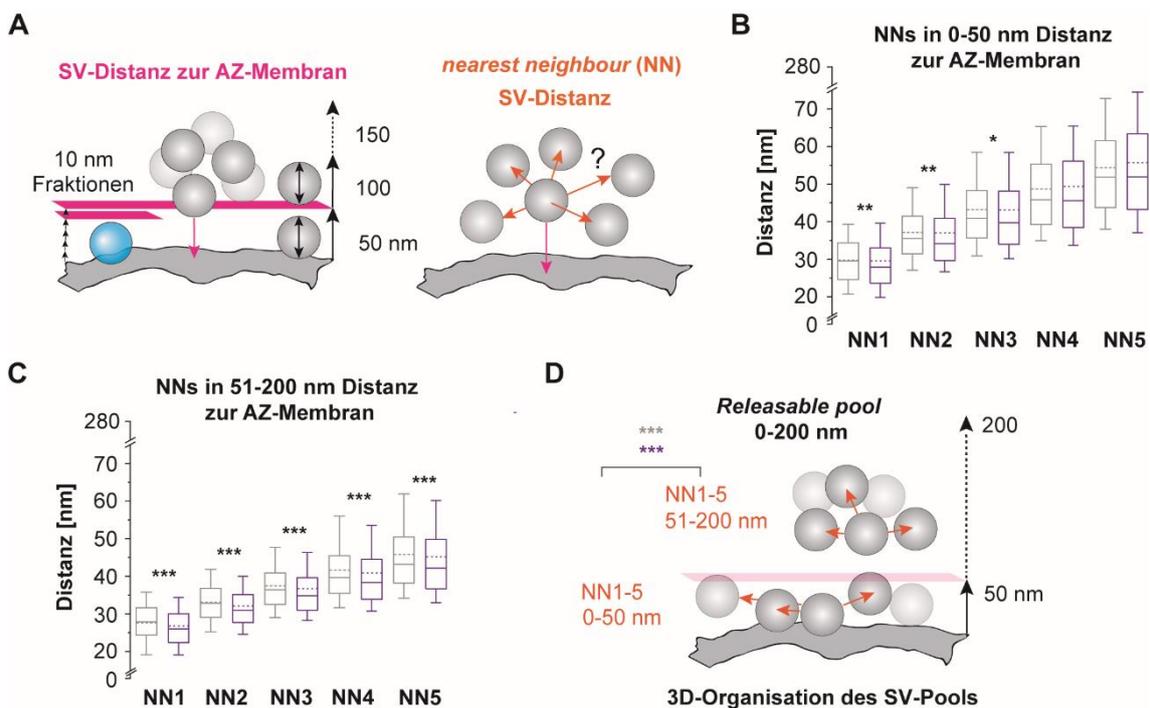


Abbildung 36. Veränderte 3D-Organisation des SV-Pools in RIM1 α ^{-/-}.

(A) Schemazeichnung zu möglichen 2D-/3D-Quantifizierungen in Distanzfraktionen (linksseitig) oder *nearest neighbouring* (NN)-Distanzen (rechtsseitig). (B) Diagramm der NN-Distanzen der SVs in 0-50 nm Distanz zur AZ-Membran in beiden Genotypen. (C) Diagramm der NN-Distanzen der SVs in 51-200 nm Distanz zur AZ-Membran in beiden Genotypen. (D) Schemazeichnung zu einem freisetzungsfähigen SV-Pool (releasable pool) in 0-200 nm Distanz zur SV-Membran. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den NN-Distanzen der SVs in 0-50 nm vs. 51-200 nm Distanz zur AZ-Membran in beiden Genotypen (p < 0,001). Die Abbildung entspricht einer modifizierten, übersetzten Version der Bildteile I-L, Abbildung 4, aus (Lichter et al. 2022).

Tabelle 5. Zusammenfassung der numerischen und statistischen Werte der SV-Pools (0-200 nm) in beiden Genotypen.

N = Anzahl, NN = *nearest neighbouring*, pw = Analysepower, SD = *standard deviation* (Standardabweichung), WMWT = Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, W t-test = t-Test nach Welch.

Parameter	RIM1 α ^{-/-}	RIM1 α ^{+/+}	p-Wert	Test
	Median (25.-75. Perzentile)/ Mittelwert (SD)			
SV-Anzahl [SVs/0,01 μm² AZ-Membranfläche]				
SV-Pool pro Tomogramm	12,14 (3,33)	15,26 (4,24)	0,002	W t-test, pw = 0,86
SV (0-50 nm)	2,70 (0,79)	3,66 (0,89)	< 0,001	W t-test, pw = 0,99
SV (51-100 nm)	3,23 (1,01)	3,82 (1,20)	0,043	W t-test, pw = 0,53
SV (101-150 nm)	3,54 (1,17)	4,24 (1,40)	0,037	W t-test, pw = 0,56
SV (151-200 nm)	2,69 (0,95)	3,51 (1,32)	0,007	W t-test, pw = 0,79
NN-Distanzen 0-50 nm [nm]				
RIM1 α ^{-/-} : N = 964 SVs, RIM1 α ^{+/+} : N = 741 SVs				
NN1 [nm]	27,90 (23,63-33,02)	29,52 (24,55-34,35)	0,004	WMWT
NN2 [nm]	34,15 (29,63-40,95)	35,50 (31,42-41,46)	0,003	WMWT
NN3 [nm]	39,69 (33,99-48,15)	40,86 (35,61-48,31)	0,038	WMWT
NN4 [nm]	45,62 (38,45-56,11)	45,80 (39,20-55,34)	0,82	WMWT
NN5 [nm]	51,89 (43,21-63,43)	51,86 (43,75-61,57)	0,729	WMWT
NN-Distanzen 51-200 nm [nm]				
RIM1 α ^{-/-} : N = 3256 SVs, RIM1 α ^{+/+} : N = 2443 SVs				
NN1 [nm]	26,00 (22,36-30,04)	27,88 (24,37-31,60)	< 0,001	WMWT
NN2 [nm]	30,95 (27,70-35,10)	32,77 (29,12-36,78)	< 0,001	WMWT
NN3 [nm]	34,83 (30,96-39,64)	36,42 (32,53-40,86)	< 0,001	WMWT
NN4 [nm]	38,39 (33,89-44,52)	39,65 (35,46-45,47)	< 0,001	WMWT
NN5 [nm]	42,16 (36,67-49,83)	43,18 (38,19-50,44)	< 0,001	WMWT
NN-Distanzen 0-50 nm vs. 51-200 nm [nm]				
NN1-NN5 [nm]	NN 0-50 nm vs. NN 51-200 nm	-	< 0,001	WMWT
NN1-NN5 [nm]	-	NN 0-50 nm vs. NN 51-200 nm	< 0,001	WMWT

6 Diskussion

Die vorliegende Dissertation widmet sich der Untersuchung des Einflusses einer Defizienz des zentralen AZ-Gerüstproteins RIM1 α auf die AZ-Ultrastruktur des großen hippocampalen MFBs im Präparat des hochdruckgefrorenen und gefriersubstituierten akuten Hippocampusschnitts der adulten Maus. Für die Arbeit wurde die HPF/FS-Technik für das elektrophysiologische Standardpräparat des akuten Hirnschnittes unter physiologischen Bedingungen etabliert. Die daraus gewonnene Probe wurde zur Generierung von 3D-Daten mittels Elektronentomographie und zur quantitativen Analyse der AZ-Ultrastruktur des hippocampalen MFBs in beiden Genotypen verwendet. Zur weiteren Automatisierung der Auswertung wurde die Analyse der im Programm IMOD erstellten AZ-Modelle durch Programmierskripte ergänzt. Diese ermöglichten eine quantitative Auswertung neuartiger geometrischer Parameter der AZ-Ultrastruktur und könnten für weitergehende Ultrastrukturanalysen der präsynaptischen Domäne genutzt werden.

Der inhaltliche Kernbefund der vorliegenden Dissertation ist der Nachweis einer multidimensionalen Alteration der AZ-Architektur in einer komplexen Säugersynapse des zentralen Nervensystems bei RIM1 α -Defizienz. Dazu zählt eine Zunahme von AZ-Membranfläche und Volumen des synaptischen Spaltes, eine Reduktion, Delokalisation und Veränderung des strukturellen Apparates (eng) gedockter Vesikel (~ RRP) ebenso wie eine veränderte, heterogenere Organisation des gesamten SV-Pools an der AZ. Der methodische Fortschritt der vorliegenden Dissertation liegt in der Etablierung replizierbarer, zuverlässiger Gewebepräparationsschritte sowie elektronenmikroskopischer und programmunterstützter Detektions- und Analysemethoden, die eine notwendige Grundlage für die Beschreibung der vorliegenden, Nanometer genauen Befunde darstellten und diese ermöglichten. Insbesondere wurde mit Hilfe der HPF/FS-Technik eine Artefakt freie, detailreiche Visualisierung von AZ-Ultrastruktur in hippocampalen MFBs erzielt, die zum einen auch für weniger hochaufgelöste EM-Methoden, wie z.B. SBF- oder *focused ion beam* (FIB) *scanning* EM, und für Lichtmikroskopie geeignet wäre, und die, zum anderen, die direkte Korrelation der AZ-Ultrastruktur mit elektrophysiologischen Untersuchungen der synaptischen Aktivität ermöglicht. Im Folgenden werden die Dissertationsergebnisse im Kontext der wissenschaftlichen Literatur diskutiert und um mögliche Limitationen sowie einen Ausblick auf weiterführende Experimente ergänzt.

6.1 Multidimensionale Alteration der AZ-Ultrastruktur in RIM1 α ^{-/-}

6.1.1 Abhängigkeit der Ausdehnung und Größe der AZ-Membran von RIM1 α

In den Quantifizierungen zeigte sich sowohl eine hochsignifikante Vergrößerung der 3D-AZ-Membranfläche und ihrer Ausdehnung als auch eine Vergrößerung und erhöhte Variabilität der 2D AZ-Profillänge in RIM1 α ^{-/-} AZs des großen hippocampalen MFBs (vgl. **Abbildung 23** und **24**). Diese Flächendifferenz verblieb auch in den mathematischen Modellierungen, in denen angesichts der experimentellen Untersuchungszahl die Variabilität unter den Tieren eingeschlossen wurde, stabil. Der Befund ist in Hinblick auf die initiale Studie, die eine Relevanz von RIM1 α für die LTP an hippocampalen MFBs herausgearbeitet hatte (Castillo et al. 2002), überraschend. In dieser früheren Studie wurde in Aldehyd-fixierten MFBs keine Veränderung der synaptischen Ultrastruktur beschrieben, allerdings wurde dazu kein Bildmaterial publiziert. In der ersten kryo-elektronenmikroskopischen Studie an RIM1 α -defizienten kortikalen Synaptosomen war bei einem Anteil der Synapsen (vier von neun Synapsen) ein signifikanter Trend zur Flächenzunahme zu erkennen (Fernandez-Busnadiego et al. 2013).

Die vorliegenden Daten sind unter drei Gesichtspunkten zu diskutieren:

1. Die in den Tomogrammen quantifizierte AZ-Membranfläche spiegelt durch ihre Definition als ein der PSD/PSF gegenüberliegender präsynaptischer Membrananteil den gesamten Bereich der Neurotransmitterfreisetzung mit individuellen Freisetzungsstellen der AZ wider. Eine Aussage über die molekulare Komposition sowohl der AZ-Membran als auch ihrer Größenzunahme bei RIM1 α -Defizienz kann nicht getroffen werden. In Anbetracht der multiplen Domäneninteraktionen von RIM1 α (vgl. 3.4) kommen als ultrastrukturelles Korrelat umverteilte AZ-Komponenten, d.h. SVs, VGCCs sowie AZ-Proteine, in Frage. Neben der Verbindung der Zinkfingerdomäne zu den SVs und mehrerer Domänen zu VGCCs erscheint die Interaktion mit den Gerüstproteinen ELKS, RIM-BP und α -Liprin als AZ-Gerüstkomplex von Bedeutung (Emperador-Melero and Kaeser 2020). Eine kürzlich veröffentlichte Studie in doppelten ELKS/RIM-KO-Mäusen zeigte ein Auseinanderfallen (*disassembly*) der AZ-Struktur bei Defizienz der beiden Proteine (Tan et al. 2022). Es ist daher von einer hohen Bedeutung der Interaktion mit ELKS über die PDZ-Domäne für die strukturelle Integrität der AZ auszugehen (Held, Liu, and Kaeser 2016; Tan et al. 2022). Da eine RIM1 α -Defizienz nach bisherigen Befunden nicht zu einer Funktionseinschränkung der Basalaktivität und der STP in den AZs des großen hippocampalen MFBs führt (Castillo et al. 2002), stellt sich die Frage, welche Anordnung die AZ-Komponenten, inklusive der Anzahl ihrer Einzelmoleküle, in einer vergrößerten

Membranfläche für eine funktionelle Unversehrtheit einnehmen. Daran schließt sich ebenso die Frage an, wo sich weitere RIM1/2-Isoformen als mögliche Kompensatoren lokalisieren (Schoch et al. 2006). Aufgrund der technisch diffizilen 3D-Immunmarkierung von Epitopen in elektronentomographischen Präparaten, wäre diese Fragestellung in vorliegendem HPF/FS-Präparat mit hochauflösenden lichtmikroskopischen Mehrkanal-Aufnahmen in einer 3D-Technik der Einzelmoleküllokalisation, beispielsweise *en bloc* 3D dSTORM, ähnlich der Studie von Pauli et al. 2021 zu adressieren (Pauli et al. 2021).

2. Auf Basis bisheriger Untersuchungen von Größe und Form der AZ-Membranen in hippocampalen MFBs der Maus mit Volumen-EM-Techniken (Wilke et al. 2013) und der AZ-Größe mit Einzelmoleküllokalisation des AZ-Proteins Bassoon-Signalen in dSTORM-Untersuchungen (Pauli et al. 2021) war von einer hohen Variabilität und Komplexität der der AZ-Membran und ihrer Ausdehnung im Wildtyp auszugehen. Dies ließ sich auch bei hoher Standardisierung der Hemisphäre, hippocampalen Region und des Aufnahmeortes (AZ an dendritischen Ausstülpungen) in den vorliegenden Daten bestätigen (vgl. **Abbildungen 21-24**). Dennoch konnte in vorliegenden Analysen gezeigt werden, dass bei RIM1 α -Defizienz sowohl die Komplexität und Variabilität der AZ-Membranform und AZ-Membranfläche als auch die Variabilität der Größenverteilung in den 2D-AZ-Profillängen zunimmt. Dies kann ähnlich der reinen Zunahme der AZ-Membranfläche als ein Verlust von RIM1 α als struktureller Integrator der CAZ gedeutet werden. Eine genauere Funktion der AZ-Membranform in hippocampalen MFBs bleibt bisher allerdings ebenso wie deren (adaptive) Änderung während Basalaktivität und Plastizitätsmodi unbeantwortet.

3. Im Vergleich zu Vorstudien wurde eine hohe Anzahl an 2D-AZ-Profillängen untersucht (12750 AZ-Profile in RIM1 $\alpha^{-/-}$, 13991 AZ-Profile in RIM1 $\alpha^{+/+}$) (vgl. **Abbildung 24**). Darüber hinaus wurde die Größe der AZ-Membran durch unterschiedliche geometrische Parameter (Fläche, Länge einer einzelnen AZ-Profillänge, Länge der max. Membranausdehnung) erfasst, die in dieser Auflösung und Standardisierung für die AZs des hippocampalen MFB bisher nicht vorlagen. Diese geometrische Beschreibung erweitert die nanoskopische Vorstellung über AZ-Membranen im hippocampalen MFB um wichtige quantitative Maße, die unregelmäßige gebogene, komplexe Formen mit Ausläufern und Löchern nähergehend beschreiben als die Annahme einer standardisierten homogenen Form (vgl. (Südhof 2012)).

6.1.2 Abhängigkeit der Höhe und des Volumens des synaptischen Spaltes von RIM1 α

Eine Kernfunktion der AZ besteht in der Vermittlung transsynaptischer Organisationsprinzipien (vgl. 3.3). Eine vielbeachtete Studie (Tang et al. 2016) in hippocampalen Neuronenkulturen der Ratte stellte die Hypothese auf, dass Nanocluster von RIM-Molekülen mit postsynaptischen NMDA-Rezeptoren sog. geometrische Nanosäulen bilden, an denen bevorzugt SV-Exozytose stattfindet. Derartiges Organisationsprinzip würde den synaptischen Spalt als 3D-Volumen involvieren. Bisher existierten nur vereinzelte 2D-Maße des synaptischen Spaltes in AZs des hippocampalen MFBs der Maus (z.B. (Zhao et al. 2012; Borges-Merjane, Kim, and Jonas 2020)).

In vorliegender Untersuchung wurde erstmalig das 3D-Volumen des synaptischen Spaltes an AZs des großen hippocampalen MFBs als IMOD-Objekt quantifiziert (vgl. **Abbildung 25**). In RIM1 α ^{-/-}-AZs wiesen sowohl das Volumen als auch die zur AZ-Membranfläche normalisierte Höhe des synaptischen Spaltes eine signifikante Vergrößerung auf. Während das vergrößerte Volumen in Teilen auf die Zunahme der Membranfläche zurückzuführen ist, verbleibt die normalisierte Zunahme der Höhe bei RIM1 α -Defizienz der erste quantitative Nachweis eines Einflusses von RIM1 α auf den synaptischen Spalt in den betreffenden AZs. Die Höhen-/Volumenzunahme übersetzt sich bezogen auf die Abläufe der synaptischen Transmission in einen vergrößerten Diffusionsraum für Neurotransmittermoleküle und Ionen. Beides kann die synaptische Kinetik innerhalb eines ultrastrukturell derart komplexen Volumens (vgl. (Martinez-Sanchez et al. 2021)) beeinflussen. Bei einer Zunahme der Distanz zwischen AZ-Membran und postsynaptischer Membran in RIM1 α -defizienten AZs kann der Verlust von indirekter Interaktion zu synaptischen Adhäsionsmolekülen, z.B. Neurexin (Brockhaus et al. 2018), eine Rolle spielen, das über einen Kontakt mit $\alpha 2\delta$ -1-Untereinheiten in Ca_v2.1-Kanälen Calciuminflux reguliert.

Die Übersetzung des Konzeptes von synaptischen Nanosäulen an AZs des hippocampalen MFBs erscheint intellektuell reizvoll, ist jedoch aufgrund der spezifischen nanophysiologicalen Konfiguration der Synapse zu diskutieren. Eine kürzlich veröffentlichte Studie wies am Beispiel einer möglichen Modulation bzw. Induktion einer speziellen STP-Form, der posttetanischen Potenzierung (PTP), auf die Relevanz einer transsynaptischen Signalgebung an hippocampalen MFBs hin, am ehesten durch eine Beteiligung von metabotropen Glutamaterezeptoren (Vandael, Okamoto, and Jonas 2021). Nanophysiologicalen Eigenschaften wie die lose Kopplungsdistanz von SV und VGCC von ca. 75 nm (Vyleta and Jonas 2014) und präsynaptische Plastizitätsformen (Nicoll and Schmitz

2005) sprechen eher gegen ein strenges Alignment von RIM-Molekülen mit NMDA-Rezeptoren in Form von Säulen.

Eine weitere Spezifizierung des ultrastrukturellen Einflusses von RIM1 α auf den synaptischen Spalt, z.B. zu der Frage, ob eine Veränderung von Volumen und Höhe an ausgewählten Stellen – möglicherweise den Freisetzungstellen (*release sites*) – existiert, könnte durch eine koordinatenexakte Auswertung des 3D-IMOD-Objektes in beiden Genotypen gelingen. In dieser wäre es sinnvoll, die Quantifizierung von EDM innerhalb des synaptischen Spaltes mittels *subtomogram averaging* (Radhakrishnan et al. 2021), die Position der gedockten SVs als auch ein umfassendes 3D-Höhenprofil mit Hilfe von Programmierskripten zu kombinieren.

6.1.3 Abhängigkeit der Anzahl, Lokalisation und des EDMs eng gedockter SVs von RIM1 α

In den RIM1 α -defizienten AZs des großen hippocampalen MFBs zeigte sich eine drastische Reduktion des (eng) gedockten SV-Pools (vgl. **Abbildung 29**). Dieser Befund ist kongruent zu den Vorarbeiten an kryo-fixierten RIM1 α -defizienten kortikalen Synaptosomen (Fernandez-Busnadiego et al. 2013) ebenso wie Aldehyd-basierten bzw. HPF/FS-basierten 2D-Quantifizierungen von gedockten SVs in RIM1/2-defizienten hippocampalen Neuronenkulturen (Deng et al. 2011; Kaeser et al. 2011; Zarebidaki et al. 2020). Besondere Relevanz besitzt die Größe des eng gedockten SV-Pools (~ RRP) an AZs des hippocampalen MFBs auch aufgrund einer jüngst demonstrierten Struktur-Funktions-Beziehung zwischen der Anzahl der gedockten SVs und einer temporären Informationsspeicherung unter PTP (*vesicle pool engram*) (Vandael et al. 2020).

Die Interaktion der Zinkfingerdomäne RIMs mit der C₂A-Domäne von Munc13-1 wird als Vermittlung des engen SV-*Dockings* angenommen (Imig et al. 2014; Neher and Brose 2018) (vgl. 3.4); diese Interaktion scheint die AZ-Funktion zu definieren (Tan et al. 2022). Mechanistisch betrachtet könnte somit beim Fehlen von RIM1 α ein Verlust von den für das SV-*Priming* kompetenter Munc13-Moleküle für den *Docking*-Phänotyp verantwortlich sein (Camacho et al. 2017). Eine bis zu 60- bis 70-prozentige Reduktion der Munc13-1-Moleküle im Hirngewebe der RIM1 α -defizienten Mäusen spräche für dieses Erklärungsmodell (Schoch et al. 2002; Andrews-Zwilling et al. 2006). Auch der Verlust einer direkten Interaktion zwischen RIM und der AZ-Membran über seine C₂B-Domäne mit dem Membranlipid PIP₂ wäre eine mögliche Erklärung für das reduzierte SV-*Docking* (de Jong et al. 2018) (vgl. 3.4).

Vorliegende Daten lassen keine Aussage über eine Reduktion des SV-*Dockings* durch eine veränderte Dynamik zu, d.h. einer möglichen Reversibilität des *Docking*-Zustandes, der in einer kürzlich veröffentlichten Studie unter der Anwendung des *zap-and-freeze*-Verfahrens beschrieben wurde (Kusick et al. 2020; Kusick, Ogunmowo, and Watanabe 2022). Auch der Zustand einer kompletten Depletion aller gedockten SVs, der im Falle des Wildtyps einmal und in RIM1 α -defizienten AZs fünf- (eng gedockte SVs) bzw. sechsmalig (gedockte SVs) zu detektieren war, könnte einen Einfluss auf die Größe des RRP besitzen, kann aber anhand vorliegender Daten nicht nähergehend einbezogen werden. Neben einer Reduktion des eng gedockten SV-Pools ergaben standardisierte geometrische Berechnungen der Vesikelpositionen auf den AZ-Membranflächen eine periphere Delokalisation des eng gedockten SV-Pools in RIM1 α -defizienten AZs des großen hippocampalen Moosfaserboutons (vgl. **Abbildung 32, 33**). Anhand von Vorstudien ist eine

Beteiligung von RIM in der SV-Positionierung anzunehmen: In *C. elegans* lokalisierten bei Defizienz des RIM-Homologes *unc-10* gedockte SVs vermutlich durch den Verlust einer Interaktion mit *syd-2*, einem Homolog des AZ-Gerüstproteins α -Liprin, von der AZ entfernt (Stigloher et al. 2011). Auf mechanistischer Ebene ist auch über einen Verlust der Kopplung zwischen SVs mit VGCCs nachzudenken. So zeigte eine kürzlich veröffentlichte Studie am hippocampalen MFB in RIM-BP2-defizienten Tieren mittels *stimulated emission depletion* (STED)-Mikroskopie eine bis zu 35-prozentige Zunahme der Distanz zwischen Signalen der VGCCs und RIM-Molekülen (Brockmann et al. 2019).

Die Lokalisation des gedockten SVs ist für die Kinetik der Vesikelfreisetzung höchstwahrscheinlich von Relevanz. Sowohl Quantifikationen des SV-Dockings im *zap-and-freeze*-Verfahren (Kusick et al. 2020) als auch in der Fluoreszenzmikroskopie unter Anwendung eines optogenetischen Glutamatsensors (*glutamate sensitive fluorescent reporter*, GluSnFR) (Mendonca et al. 2022) weisen darauf hin, dass asynchrone SV-Freisetzung peripher verteilter auf der AZ-Membranfläche lokalisiert.

Erweitert man die Betrachtung des eng gedockten SV-Pools auf das individuelle EDM, welches SV und AZ-Membran miteinander verbindet, ergaben die standardisierten Messungen eine signifikante Reduktion des EDM an eng gedockten SVs von 19,4 nm auf 17,9 nm in RIM1 $\alpha^{-/-}$ -AZs (vgl. **Abbildung 31**). In beiden Genotypen unterschied sich das EDM in Abhängigkeit zur Distanz des (eng) gedockten SVs zur AZ-Membran (vgl. **Abbildung 31**). Zwischen eng (0-2 nm) und lose gedockten SVs (2,1-5 nm) zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion des EDMs auf 14 nm in beiden Genotypen (vgl. **Abbildung 31**).

Insbesondere kryo-elektronenmikroskopische Arbeiten von James Rothman et al. beschäftigen sich seit einigen Jahren mit der geometrischen Anordnung von Munc13-Molekülen und SNARE-Komplexen bei der SV-Exozytose (Rothman et al. 2017; Li et al. 2019; Radhakrishnan et al. 2021). Annahmen aus einer kürzlich veröffentlichte Studie kommen interessanterweise den vorliegenden Daten nahe (Grushin et al. 2022). In dem beschriebenen Model nehmen Munc13-1 Oligomere drei unterschiedliche Positionen ein. Von einer zunächst aufrechten hexagonalen Position unter den gedockten SVs mit ungeordneten SNARE-Komplexen in Stadium 1 gehen die Munc13-1-Moleküle in Stadium 2 in eine geschlossene hexagonale Anordnung über, wenn sich die gedockten SVs in einem Zustand der unmittelbaren Freisetzungsfähigkeit befinden (*pre-priming*). In einem dritten Stadium erweitert sich der Durchmesser des Hexagons unter den nun freisetzungsfähigen SVs mit sog. SNARE *pins* in einer durch Synaptotagmine bedingten, zur Hälfte vollständigen geometrischen Konfiguration (*zippering*, metaphorisch

Reißverschluss). Dies ist durch den Influx von Calciumionen und einer konsekutiven Bindung an C₂B-Domänen der Munc13-1-Moleküle bedingt. Die geometrische Konfiguration als geschlossenes Hexagon in Stadium 2 besäße im Vergleich zu Stadium 3 einen reduzierten Durchmesser ähnlich des EDMs in lose gedockten SVs. Eine Reduktion des EDMs an eng gedockten SVs des RIM1 α ^{-/-}-Genotyps ließe sich durch die bis zu 60- bzw. 70-prozentige Reduktion der Munc13-1-Moleküle erklären (Schoch et al. 2002). Für die dargelegte Hypothese, die sich aus der Interaktion des RIM/Munc13-Heterodimers ergeben würde, wäre nicht nur die Breite des EDMs, sondern ebenso die Distanz der SVs innerhalb der ersten 10 nm zur AZ-Membran von Interesse. In diesem Fall würde man annehmen, dass sich SVs bei einer Defizienz von RIM1 α von der Membran entfernen. Vorliegende Daten konnten dies mit einer nahezu verdoppelten Distanz der SVs im Abstand von 0-10 nm zur AZ-Membran bzw. ebenso zur perisynaptischen Plasmamembran in RIM1 α -defizienten AZs des großen hippocampalen MFBs bestätigen (vgl. **Abbildung 29, 30**). Schließlich könnte in beiden Fällen auch ein Verlust der Interaktion von RIM mit dem in der AZ-Membran befindlichen Phospholipid PIP₂ ein mögliches Erklärungsmodell darstellen (de Jong et al. 2018).

In diese Überlegungen ist aufgrund der biophysikalischen Kräfte zwischen der Vesikel- und Plasmamembran auch die Größe des SV-Durchmessers einzuschließen, der möglicherweise Einfluss auf die Anzahl und Konfiguration des RIM/Munc13-Heterodimers ebenso wie die hexagonale Anordnung der Munc13-Moleküle haben könnte. Die Befunde zum EDM erwiesen sich in zum individuellen SV-Durchmesser normalisierten Rechnungen als stabil (vgl. **Abbildung 31**). Im RIM1 α ^{-/-}-Genotyp zeigten SVs bis 60 nm Durchmesser eine leichte, dennoch hochsignifikante Zunahme des SV-Durchmessers (vgl. **Abbildung 31**), was sich mit elektronentomographischen Vorarbeiten in Munc13-1/2 defizienten organotypischen Schnittkulturen deckt (Imig et al. 2014). Für die AZs des hippocampalen MFBs ist eine Diversität der SV-Durchmesser bekannt (Rollenhagen et al. 2007) und ließ sich auch in der Studie zum *flash-and-freeze*-Verfahren in akuten Hippocampuschnitten der Maus reproduzieren (Borges-Merjane, Kim, and Jonas 2020). Welche Ursache und welchen Einfluss eine Zunahme des SV-Durchmessers explizit in RIM1 α ^{-/-} AZs des hippocampalen MFBs besitzen könnte, die sich zugleich auch in eine Volumenzunahme des SVs und somit möglicherweise in mehr darin enthaltene Glutamatmoleküle übersetzt, verbleibt bisher wie auch bei der Defizienz anderer AZ-Proteine, z.B. Munc13-1/2, unbekannt.

6.1.4 Abhängigkeit der SV-Pool-Organisation von RIM1 α

Auf Basis von Quantifikationen der SV-Anzahl und der NN-Distanzen im 3D-Raum wiesen RIM1 α ^{-/-} AZs des hippocampalen MFBs in vorliegenden Daten eine veränderte Organisation des SV-Pools bei insgesamt reduzierter SV-Anzahl auf (vgl. **Abbildung 34-36**). Ähnlich zu der kryo-elektronentomographischen Studie in RIM1 α defizienten kortikalen Synaptosomen (Fernandez-Busnadiego et al. 2013) war der proximale SV-Pool in unmittelbarer Nähe zur AZ-Membran in der ersten Distanzfraktion (vgl. 5.9.1, **Abbildung 34**) reduziert. In Kontrast zu betreffender Studie, die einen nicht signifikanten Pearson Korrelationskoeffizienten von $r = 0,07$ für die Korrelation zwischen der Größe des proximalen SV-Pools und der AZ-Fläche aufwies, d.h. eine Unabhängigkeit beider Parameter, bestand in Abwesenheit von RIM1 α weiterhin eine signifikant direkte Korrelation der SV-Subpopulation mit der AZ-Membranfläche (vgl. **Abbildung 35**). Diese unterschied sich zwar in Form einer geringeren Korrelation vom Wildtyp, weist jedoch darauf hin, dass bei Zunahme der AZ-Membranfläche auch in RIM1 α -defizienten AZs die Größe des proximalen SV-Pools zunimmt. In Hinblick auf die Studie von Fernandez-Busnadiego et al. (Fernandez-Busnadiego et al. 2013) ist anzunehmen, dass ein direkter Vergleich einer AZ-Membranfläche eines zerebro-kortikalen Synaptosoms mit einer Membranfläche der AZ des großen MFBs im hippocampalen Gewebeschnitt nicht ausreichend erfolgen kann.

Die Berechnungen der NN-Distanzen deuten in beiden Genotypen auf eine räumlich unterschiedliche Organisation eines proximalen loseren SV-Pools und distaler gelegenen engeren SV-Pools hin, die sich signifikant voneinander unterscheiden. Aufgrund der bekannten Verbindung von SVs mit elektronendichten Filamenten (*connectors*) (vgl. 3.3) liegt das Konzept eines SV-Netzes/Netzwerks nahe. In RIM1 α -defizienten AZs des großen hippocampalen MFBs waren die NN-Distanzen in beiden SV-Subpopulationen (0-50 nm, 51-200 nm) im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert (vgl. **Abbildung 36**). Transferiert man die Befunde in das Bild des SV-Netzes, würde dies für SV-Nester/-Cluster sprechen, die sich innerhalb der RIM1 α -defizienten AZs nahe von Freisetzungstellen lokalisieren.

Verschiedene Erklärungsmodelle, die auf RIM als Bestandteil eines AZ-Gerüstkomplexes mit RIM-BP und ELKS beruhen, kommen für die Befunde in Frage:

1. Eine Theorie der Phasenseparation legt die Organisation des SV-Pools in Lipidcluster nahe, die unterschiedliche synaptische Proteine enthalten und von denen insbesondere Synapsin für den gesamten SV-Pool von hoher Relevanz ist (Milovanovic and De Camilli 2017; Milovanovic et al. 2018). Eine auf dieser Theorie basierende Studie schlägt die

Organisation von RIM und RIM-BP in Form von Clustern vor, die zu einer Differenzierung des SV-Pools in funktionell unterschiedliche Populationen beiträgt (Wu et al. 2019) (vgl. 3.4). Dies würde sich zum einen mit Annahmen einer Aufteilung des SV-Pools in einen RRP und einen Reserve-Pool (Zhang and Augustine 2021) bzw. Recycling-Pool (Rollenhagen and Lübke 2010) decken, zum anderen bei veränderter Organisation von RIM-BP und Synapsin (Owe et al. 2009) ein mögliches Erklärungsmodell für eine heterogenere Organisation des SV-Pools in RIM1 α defizienten AZs des großen hippocampalen MFBs darstellen. 2. Ebenso scheint die Interaktion von RIM und ELKS einen Einfluss auf die Größe des SV-Pools inklusive des RRP zu besitzen (vgl. 3.4) ((Held, Liu, and Kaeser 2016; Wang et al. 2016), deren Verlust eine räumliche Umorganisation des SV-Pools nach sich ziehen würde.

Es verbleibt die Frage unbeantwortet, welche funktionelle Konsequenz eine veränderte Organisation des SV-Netzes an AZs des hippocampalen MFBs besitzt, zumal der SV-Pool insgesamt vergleichsweise groß gegenüber übrigen zentralen Synapsen ist (*maxi-pool*, (Hallermann et al. 2003). Verkleinerte NN-Distanzen zwischen den Vesikeln könnten eine räumlich nähere Verfügbarkeit des SV-Nachschubs innerhalb des SV-Pools bedeuten, wobei dazu Annahmen zur SV-Beweglichkeit und zur Membraninteraktion zwischen den SV-Membranen im Allgemeinen zu bedenken wären. Naheliegend ist die Untersuchung der Frage einer individuellen 3D-Organisation des SV-Pools in Relation zu den Freisetzungstellen innerhalb der AZ bzw. der Position der gedockten SVs.

6.1.5 Abhängigkeit der Lokalisation von Mitochondrien an AZs von RIM1 α

Die 2D-stereologischen Quantifikationen der Flächen von mitochondrialen Profilen ergaben eine Zunahme in RIM1 α defizienten AZs des großen hippocampalen MFBs (vgl. **Abbildung 14, 26, 27**). Die signifikante Veränderung in der Organisation des SV-Pools und eine derartige Expansion der AZ-Membranfläche im RIM1 α -Genotyp könnte einen erhöhten Bedarf von Energie bzw. explizit ATP-Molekülen nach sich ziehen (Pulido and Ryan 2021; Devine and Kittler 2018). Bei möglicherweise veränderter Topografie der VGCCs und daraus resultierender Veränderung der lokalen Calciumkonzentration wären Mitochondrien als intrazelluläre Calciumspeicher von möglicher Relevanz. Um weiterführend zu prüfen, wie Mitochondrien an den AZs des großen hippocampalen MFBs räumlich organisiert sind, z.B. in Form einzelner Organellen oder eines zusammenhängenden mitochondrialen Netzwerkes, erscheint eine fluoreszenzmikroskopische Volumentechnik, z.B. *lattice light-sheet microscopy*, in Kombination mit Techniken der Expansionsmikroskopie denkbar (Gambarotto et al. 2019). In dieser könnten Mitochondrien

beispielsweise durch konventionelle Fluoreszenzfarbstoffe wie *MitoTracker*TM markiert werden.

6.1.6 Funktionelle Implikationen

Elektrophysiologische Messungen mittels Ableitungen von Feldpotenzialen an RIM1 α -defizienten Synapsen des hippocampalen MFBs ergaben, dass Basalaktivität und STP von der Defizienz des Proteins unbeeinträchtigt bleiben, PKA-abhängige LTP hingegen beeinflusst wird (vgl. 3.4) (Castillo et al. 2002). Vorliegende Daten wurden ohne ein Induktionsprotokoll von kontrollierter Aktivität (chemisch, optogenetisch, elektrisch) durchgeführt, sodass eine Korrelation zwischen ultrastrukturellen Befunden und LTP bzw. definierten Aktivitätsmustern spekulativ verbleibt. Die signifikante Alteration der AZ-Ultrastruktur in RIM1 α defizienten AZs wirft die Frage auf, welcher Anteil der Veränderungen eine direkte oder indirekte Folge des Proteinverlustes und welcher Anteil der Veränderungen im Sinne einer Kompensation notwendig für die Aufrechterhaltung der synaptischen Aktivität ist.

Bei der Defizienz von RIM1 α wäre bedingt durch die Reduktion und Delokalisation der eng gedockten SVs (~ RRP) eine Untersuchung zur Kopplungsdistanz zwischen SV und VGCC in Relation zu STP und/oder die Lokalisation und Anzahl von VGCCs und übrigen RIM-Isoformen von Interesse. Experimentell ließe sich die Kopplungsdistanz an AZs des hippocampalen MFBs in RIM1 α -defizienten Tieren durch den anspruchsvollen Einsatz der exogenen Calciumchelatoren BAPTA (schnell) und EGTA (langsam) in vorliegender Präparationstechnik des akuten Hirnschnittes untersuchen (Vyleta and Jonas 2014). Die Anzahl und Lokalisation von VGCs korrespondierend zu bspw. RIM-Isoformen könnte man mit Hilfe von Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie und/oder *freeze-fracture*-Technik adressieren (Hagiwara et al. 2005; Siddig et al. 2020). Dabei ist einschränkend zu erwähnen, dass die Antikörper basierte Lokalisation von VGCCs anspruchsvoll ist und zur Korrelation der geometrischen Parameter der Einsatz von hochdruckgefrorenem und gefriersubstituierten Gewebe anstatt Aldehyd-basierte Fixationen vorteilhaft wäre, bisher jedoch nicht hinreichend etabliert ist.

Eine Zunahme der Kopplungsdistanz an hippocampalen MFBs könnte in einer (noch) niedrigeren Freisetzungswahrscheinlichkeit der SVs resultieren (Eggermann et al. 2011). Zu spekulieren wäre, ob eine derartige Zunahme der Kopplungsdistanz für die cAMP-PKA abhängige LTP limitierend ist. Untersuchungen mittels *total internal reflection fluorescence* (TIRF)-Mikroskopie an Synapsen des hippocampalen MFBs legen nahe, dass cAMP als Substrat der cAMP-PKA-abhängigen LTP die Freisetzungswahrscheinlichkeit der SVs durch Veränderung der Kopplungsdistanz erhöht (Midorikawa and

Sakaba 2017). Dabei ist einschränkend zu erwähnen, dass die Feldableitungen möglicherweise eine zu geringe Auflösung besitzen, um explizite Veränderungen der Basalaktivität oder der STP bei Defizienz von RIM1 α zu detektieren (Castillo et al. 2002). Trotz des Nachweises, dass RIM1 α kein direktes PKA-Substrat ist (Kaesler, Kwon, Blundell, et al. 2008), wäre zur Korrelation der nanoskopischen 3D AZ-Ultrastruktur und LTP in RIM1 α -defizienten AZ des hippocampalen MFBs ein Protokoll zur chemisch induzierten LTP durch PKA-Aktivatoren wie Forskolin in Kombination mit der HPF/FS-Technik und Elektronentomographie denkbar. In der initialen Studie von Castillo et al. 2002 wurde zwar bei der Induktion der chemischen LTP durch Forskolin kein Unterschied in der Potenzierung zwischen Wildtyp- und RIM1 α -*Knock-Out*-Maus gefunden (Castillo et al. 2002), erneut gemessen über Feldpotentiale, allerdings ist eine chemische Induktion einer invasiven Induktion durch ein *patch-clamp*-Experiment in Hinblick auf die Erhaltung der AZ-Ultrastruktur vorzuziehen. Die chemische Induktion von LTP an Synapsen des hippocampalen MFBs wurde sowohl in lichtmikroskopischen Studien (STED-Mikroskopie (Fukaya et al. 2021), *d*STORM (Pauli et al. 2021)) als auch in Studien unter Einsatz der HPF/FS-Technik (Orlando et al. 2021; Maus et al. 2020) durchgeführt. Letztere ergaben in unterschiedlichen Präparaten (organotypische Schnittkultur, akuter Hirnschnitt) nach chemischer Induktion der LTP gegenteilige Ergebnisse zur Größe des RRP.

6.2 *Nearer-to-native?* – AZ-Ultrastruktur und HPF/FS-Techniken

Der Einsatz einer Fixation von Gewebe dient zum Erhalt und zur Stabilisierung (sub-)zellulärer Strukturen für eine dem nativen Zustand möglichst nahen Betrachtung im Mikroskop, um im Optimalfall zu einer wissenschaftlichen Erkenntnis über die biologische Struktur von Interesse zu gelangen. Annahmen über die Funktionsweise von AZs, die über elektrophysiologische Ableitungen, funktionelle Mikroskopie sowie molekularbiologische und computergestützte Verfahren erforscht werden, sind von Visualisierungen der AZ-Ultrastruktur wesentlich beeinflusst. Im Optimalfall liegen Quantifikationen der AZ-Geometrie aus einem möglichst nativen Gewebezustand vor, sodass die Analyse einer durch chemische Einflüsse veränderten AZ-Ultrastruktur vermieden wird. Klassische EM-Fixationen, die auf einem verhältnismäßig hohen Gehalt von Aldehyden basieren (vgl. **Appendix**), erfüllten das Prinzip der Strukturhaltung von Synapsen bis zur Weiterentwicklung der milderen Gewebefixation durch die HPF/FS-Technik. Für die Erhaltung der Ultrastruktur in synaptischem Gewebe stellten diese klassischen Fixationsprotokolle replizierbare, zuverlässige und über Jahrzehnte getestete methodische Verfahren dar. Die daraus gewonnene visuelle Vorstellung und Nomenklatur von Synapsen basiert bis heute auf der Erkenntnis, die aus Elektronenmikrographien klassisch fixierter synaptischer Komplexe entstanden ist (vgl. 3.2).

Mit der vorliegenden Etablierung der HPF/FS-Technik für akute Gewebeschnitte des adulten Mausgehirns und ihrer vielfachen Replikation im Rahmen der Dissertationsarbeit konnte ein zuverlässiges Protokoll für eine nativere Erhaltung der AZ-Ultrastruktur entwickelt werden (vgl. 4-5). Durch die hohe Qualität der zu analysierenden Proben erfüllt das Protokoll die notwendige Grundlage (vgl. **Abbildung 20**), um eine möglichst präzise Quantifikation der AZ-Ultrastruktur zu ermöglichen. Dabei einschränkend zu erwähnen ist, dass die Durchführung der HPF/FS-Technik an einem anspruchsvollen, fragilen Präparat wie dem akuten Hirnschnitt mitunter aufgrund von einem mehrtägigen Gefriersubstitutionsprotokoll und Auftreten von möglichen Gefrierschäden zeitintensiv sein kann. Zudem ist der Einsatz von chemischen Substanzen zwar auf ein Minimum reduziert, z.B. 0,5% GA im Gefriersubstitutionsprotokoll oder 15% PVP als Gefrierschutz, von dem kein Einfluss auf die synaptische Funktion berichtet wird (Borges-Merjane, Kim, and Jonas 2020), jedoch ist eine mögliche (minimale) Alteration der AZ-Ultrastruktur nicht vollständig ausgeschlossen.

Die Entwicklung der stetig höheren optischen Auflösung biologischer Prozesse, wie sie an der Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie in nano- bis mesoskopischer Auflösung zu exemplifizieren ist (vgl. 3.1, 3.6), diversifiziert auch den erfordernten Detailreichtum in der

Visualisierung von AZ-Ultrastruktur (Goodsell, Olson, and Forli 2020). Die vorliegenden Daten konnten einen hohen bzw. vergleichsweise höheren Detailreichtum der 3D AZ-Ultrastruktur am hippocampalen MFB demonstrieren (vgl. (Rollenhagen et al. 2007; Zhao et al. 2012; Wilke et al. 2013), der in den Dimensionen sowohl die Feinheit einer AZ-Membranform als auch die Feinheit eines mit EDM konfigurierten eng gedockten SVs einschließt. Dies konnte bisher mit ausschließlich Aldehyd-basierten Fixationstechniken nicht erreicht werden. Dabei kann das verwendete HPF/FS-Präparat des akuten Hirnschnittes als direktes Referenzelement zu funktionellen elektrophysiologischen Messungen fungieren. Dies eröffnet die Möglichkeit zu einer direkten Korrelation von synaptischer Aktivität (*patch-clamp*, *flash-and-freeze* (Borges-Merjane, Kim, and Jonas 2020), chemische Induktion (Maus et al. 2020)) oder der Übertragung von Modellierungen nanophysilogischer Eigenschaften, bspw. der losen Kopplungsdistanz (Vyleta and Jonas 2014), auf 3D-Koordinatenkartierungen einer nativeren AZ-Ultrastruktur.

Abschließend ist zu erwähnen, dass die Erhaltung einer nativeren AZ-Ultrastruktur auch eine (notwendige) Grundlage für eine Quantifikationen von zunächst nicht bekannten Alterationen der AZ-Architektur in 3D darstellen kann, die – wie bei RIM1 α -Defizienz auf deskriptiv-optischer 2D-Ebene – keinen drastischen morphologischen Phänotyp, z.B. eine auseinandergefallene AZ oder eine vollständige Depletion des gedockten SV-Pools, aufweisen.

6.3 Ausblick

Der Input von ca. 50 Körnerzellen trifft auf eine einzelne CA3-Pyramidalzelle (Amaral, Ishizuka, and Claiborne 1990). Das niederfrequente Aktivitätsmuster der Körnerzellen ist dabei in der Lage, PTP als spezielle STP-Form in einer singulären Synapse des MFBs zu induzieren und somit die synaptische Aktivität einer nachgeschalteten CA3-Pyramidalzelle zu modulieren (Vandael et al. 2020). Wie kann ein derartiger Umsatz von synaptischer Stärke an einer singulären AZ bzw. mit einer singulären AZ-Ultrastruktur gelingen (Atwood and Karunanithi 2002; Nicoll and Schmitz 2005)? Um diese Vorgänge auf nanoskopisch bis mesoskopischer Ebene in ihrer Struktur-Funktions-Beziehung zu verstehen, erscheint es notwendig, die Dimension der Aktivität (4D) in die Untersuchung der kleinsten funktionellen Elemente der AZ, die der einzelnen Freisetzungstellen (*release sites*), einzubeziehen. Bisher verbleibt die Frage unbeantwortet, wie sich ihre Anzahl, geometrische Organisation und zeitliche Synchronisation zueinander bei basaler Aktivität und bei Amplifikation synaptischer Stärke auf nanoskopischer Ebene verhalten. Vorliegende elektronentomographischen Daten sprechen dafür, dass RIM1 α für dieses Zusammenspiel tragend sein könnte.

Für derartige Untersuchungen wäre es wünschenswert, wenn sich zeitlich und örtlich hochaufgelöste Techniken, z.B. funktionelle *scanning transmission electron microscopy* (STEM)-Tomographie (*flash-and-freeze*, *zap-and-freeze*), die eine Bildgebung dickerer Gewebeschnitte und somit vollständiger AZs des MFBs zulassen würde, mit nanoskopischer Lokalisationsmikroskopie im gleichen Präparat korrelieren ließen (*correlative light electron microscopy*, CLEM). Auch die Kombination funktioneller Elektronentomographie mit subzellulären *patch-clamp*-Aufzeichnungen simultaner prä- und postsynaptischer Aktivität (Vandael et al. 2021) erscheint möglich. Um eine großflächige Quantifizierung von AZ-Aktivität auch über den einzelnen akuten Hirnschnitt hinaus zu erreichen, bieten sich als Ergänzung zu Analysen der Struktur-Funktionsbeziehung hochaufgelöste *in vivo* Experimente mit beispielsweise modernsten Glutamat- oder Spannungssensoren (*voltage indicators*) an AZs des großen hippocampalen MFBs an (z.B. (Jensen et al. 2019; Rama, Jensen, and Rusakov 2019)).

Vorliegende Analysen der AZ-Ultrastruktur an hippocampalen MFBs der Maus zeigen eine bisher unbekanntere nativere, präsynaptische 3D-Architektur im Wildtyp und bei RIM1 α -Defizienz. Die beschriebene multidimensionale Alteration der Ultrastruktur in RIM1 α ^{-/-} AZs des großen hippocampalen MFBs erfordert eine tiefgehende korrelative Analyse mit synaptischer Basalaktivität und Plastizitätsmodi bei RIM1 α -Defizienz in hippocampalen MFB-Synapsen. Die weitere Erforschung dieser hochkomplexen Synapse

und die Entschlüsselung ihrer Struktur-Funktions-Beziehung an den AZs auf nanoskopischer Ebene kann auch in Zukunft notwendige Erkenntnisse für ein molekulares Verständnis von Lernen und Gedächtnis im Hippocampus liefern.

7 Referenzen

- Abraham, W. C., O. D. Jones, and D. L. Glanzman. 2019. 'Is plasticity of synapses the mechanism of long-term memory storage?', *NPJ Sci Learn*, 4: 9.
- Ackermann, F., C. L. Waites, and C. C. Garner. 2015. 'Presynaptic active zones in invertebrates and vertebrates', *EMBO Rep*, 16: 923-38.
- Acsády, L., A. Kamondi, A. Sík, T. Freund, and G. Buzsáki. 1998. 'GABAergic Cells Are the Major Postsynaptic Targets of Mossy Fibers in the Rat Hippocampus', *The Journal of Neuroscience*, 18: 3386-403.
- Acuna, C., X. Liu, and T. C. Südhof. 2016. 'How to Make an Active Zone: Unexpected Universal Functional Redundancy between RIMs and RIM-BPs', *Neuron*, 91: 792-807.
- Alvarez-Baron, E., K. Michel, T. Mittelstaedt, T. Opitz, F. Schmitz, H. Beck, D. Dietrich, A. J. Becker, and S. Schoch. 2013. 'RIM3gamma and RIM4gamma are key regulators of neuronal arborization', *J Neurosci*, 33: 824-39.
- Amaral, D. G., and J. A. Dent. 1981. 'Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions', *J Comp Neurol*, 195: 51-86.
- Amaral, D. G., N. Ishizuka, and B. J. Claiborne. 1990. 'Chapter 1 Chapter Neurons, numbers and the hippocampal network.' in J. Storm-Mathisen, J. Zimmer and O. P. Ottersen (eds.), *Progress in Brain Research* (Elsevier).
- Andersen, P. 2007. *The hippocampus book* (Oxford University Press: Oxford; New York).
- Andrews-Zwilling, Y. S., H. Kawabe, K. Reim, F. Varoqueaux, and N. Brose. 2006. 'Binding to Rab3A-interacting molecule RIM regulates the presynaptic recruitment of Munc13-1 and ubMunc13-2', *J Biol Chem*, 281: 19720-31.
- Asan, L., G. M. Balk, N. Bieber, S. Hatzenbühler, C. Heuer, J. Hillebrandt, U. Lewin, K. Lichter, F. C. Oertel, A. Petkidis, K. Reichel, M. M. Weber, V. Wicht, T. Pangrsic, and C. Vogl. 2016. 'Shedding light on gene therapy as a future treatment for sensory disorders – from gene replacement to optogenetics', *Audiological Acoustics*, 55 94-104.
- Atwood, H. L., and S. Karunanithi. 2002. 'Diversification of synaptic strength: presynaptic elements', *Nat Rev Neurosci*, 3: 497-516.
- Betz, A., P. Thakur, H. J. Junge, U. Ashery, J.-S. Rhee, V. Scheuss, C. Rosenmund, J. Rettig, and N. Brose. 2001. 'Functional Interaction of the Active Zone Proteins Munc13-1 and RIM1 in Synaptic Vesicle Priming', *Neuron*, 30: 183-96.
- Biederer, T., P. S. Kaeser, and T. A. Blanpied. 2017. 'Transcellular Nanoalignment of Synaptic Function', *Neuron*, 96: 680-96.
- Bischofberger, J., D. Engel, L. Li, J. R. Geiger, and P. Jonas. 2006. 'Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices', *Nat Protoc*, 1: 2075-81.
- Blackstad, T. W., and A. Kjaerheim. 1961. 'Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers', *J Comp Neurol*, 117: 133-59.
- Bliss, T. V., and A. R. Gardner-Medwin. 1973. 'Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path', *J Physiol*, 232: 357-74.
- Bliss, T. V., and T. Lomo. 1970. 'Plasticity in a monosynaptic cortical pathway', *J Physiol*, 207: 61p.
- Bliss, T. V., and T. Lomo. 1973. 'Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path', *J Physiol*, 232: 331-56.

- Bonnycastle, K., E. C. Davenport, and M. A. Cousin. 2021. 'Presynaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders: Insights from the synaptic vesicle life cycle', *J Neurochem*, 157: 179-207.
- Borges-Merjane, C., O. Kim, and P. Jonas. 2020. 'Functional Electron Microscopy, "Flash and Freeze," of Identified Cortical Synapses in Acute Brain Slices', *Neuron*, 105: 992-1006 e6.
- Brockhaus, J., M. Schreitmuller, D. Repetto, O. Klatt, C. Reissner, K. Elmslie, M. Heine, and M. Missler. 2018. 'alpha-Neurexins Together with alpha2delta-1 Auxiliary Subunits Regulate Ca(2+) Influx through Cav2.1 Channels', *J Neurosci*, 38: 8277-94.
- Brockmann, M. M., M. Maglione, C. G. Willmes, A. Stumpf, B. A. Bouazza, L. M. Velasquez, M. K. Grauel, P. Beed, M. Lehmann, N. Gimber, J. Schmoranzer, S. J. Sigrist, C. Rosenmund, and D. Schmitz. 2019. 'RIM-BP2 primes synaptic vesicles via recruitment of Munc13-1 at hippocampal mossy fiber synapses', *Elife*, 8.
- Brockmann, M. M., F. Zarebidaki, M. Camacho, M. K. Grauel, T. Trimbuch, T. C. Sudhof, and C. Rosenmund. 2020. 'A Trio of Active Zone Proteins Comprised of RIM-BPs, RIMs, and Munc13s Governs Neurotransmitter Release', *Cell Rep*, 32: 107960.
- Bruckner, J. J., H. Zhan, S. J. Gratz, M. Rao, F. Ukken, G. Zilberg, and K. M. O'Connor-Giles. 2017. 'Fife organizes synaptic vesicles and calcium channels for high-probability neurotransmitter release', *J Cell Biol*, 216: 231-46.
- Butola, T., T. Alvanos, A. Hintze, P. Koppensteiner, D. Kleindienst, R. Shigemoto, C. Wichmann, and T. Moser. 2021. 'RIM-Binding Protein 2 Organizes Ca(2+) Channel Topography and Regulates Release Probability and Vesicle Replenishment at a Fast Central Synapse', *J Neurosci*, 41: 7742-67.
- Buzsaki, G., and D. Tingley. 2018. 'Space and Time: The Hippocampus as a Sequence Generator', *Trends Cogn Sci*, 22: 853-69.
- Cajal, S. R. Y. 1888. 'Sobre las fibras nerviosas de la capa molecular del cerebelo', *Rev. Trim. Histol. Norm. Patol.*, 1: 65-78.
- Cajal, S. R. Y. 1894. 'The Croonian Lecture: La Fine Structure des Centres Nerveux', *Proceedings of the Royal Society of London Series I*, 55: 444-68.
- Cajal, S. R. Y. 1909. *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés 1* (Maloine: Paris).
- Cajal, S. R. Y. 1911. *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés 2* (Maloine: Paris).
- Calakos, N., S. Schoch, T. C. Sudhof, and R. C. Malenka. 2004. 'Multiple roles for the active zone protein RIM1alpha in late stages of neurotransmitter release', *Neuron*, 42: 889-96.
- Camacho, M., J. Basu, T. Trimbuch, S. Chang, C. Pulido-Lozano, S. S. Chang, I. Duluvova, M. Abo-Rady, J. Rizo, and C. Rosenmund. 2017. 'Heterodimerization of Munc13 C2A domain with RIM regulates synaptic vesicle docking and priming', *Nat Commun*, 8: 15293.
- Castillo, P. E. 2012. 'Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4: a005728.
- Castillo, P. E., R. Janz, T. C. Sudhof, T. Tzounopoulos, R. C. Malenka, and R. A. Nicoll. 1997. 'Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus', *Nature*, 388: 590-3.
- Castillo, P. E., S. Schoch, F. Schmitz, T. C. Sudhof, and R. C. Malenka. 2002. 'RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation', *Nature*, 415: 327-30.

- Chanaday, N. L., M. A. Cousin, I. Milosevic, S. Watanabe, and J. R. Morgan. 2019. 'The Synaptic Vesicle Cycle Revisited: New Insights into the Modes and Mechanisms', *J Neurosci*, 39: 8209-16.
- Chen, C., and P. Jonas. 2017. 'Synaptotagmins: That's Why So Many', *Neuron*, 94: 694-96.
- Chevaleyre, V., B. D. Heifets, P. S. Kaeser, T. C. Sudhof, and P. E. Castillo. 2007. 'Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha', *Neuron*, 54: 801-12.
- Claiborne, B. J., D. G. Amaral, and W. M. Cowan. 1986. 'A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus', *J Comp Neurol*, 246: 435-58.
- Cole, A. A., X. Chen, and T. S. Reese. 2016. 'A Network of Three Types of Filaments Organizes Synaptic Vesicles for Storage, Mobilization, and Docking', *J Neurosci*, 36: 3222-30.
- Connors, B. W., and M. A. Long. 2004. 'Electrical synapses in the mammalian brain', *Annu Rev Neurosci*, 27: 393-418.
- Coppola, T., S. Magnin-Luthi, V. Perret-Menoud, S. Gattesco, G. Schiavo, and R. Regazzi. 2001. 'Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca²⁺ channels, SNAP-25, and synaptotagmin', *J Biol Chem*, 276: 32756-62.
- Couteaux, R. 1944. 'Nouvelles observations sur la structure de la plaque motrice et interprétation des rapports myo-neuraux', *CR Soc Biol*, 138: 976-79.
- Couteaux, R. 1946. 'Sur les gouttieres synaptiques du muscle strie', *COMPTE RENDUS DES SEANCES DE LA SOCIETE DE BIOLOGIE ET DE SES FILIALES*, 140: 270-71.
- Couteaux, R., and M. Pecot-Dechavassine. 1970. 'L'Ouverture des vesicules synaptiques au niveau des 'zones actives.'', *Septieme Congres International de Microscopie Electronique (Grenoble, France)*: 709-10.
- Dai, H., D. R. Tomchick, J. Garcia, T. C. Sudhof, M. Machius, and J. Rizo. 2005. 'Crystal structure of the RIM2 C2A-domain at 1.4 Å resolution', *Biochemistry*, 44: 13533-42.
- De Camilli, P., and R. Jahn. 1990. 'Pathways to regulated exocytosis in neurons', *Annu Rev Physiol*, 52: 625-45.
- De Carlos, J. A., and Z. Molnar. 2020. 'Cajal's Interactions with Sherrington and the Croonian Lecture', *Anat Rec (Hoboken)*, 303: 1181-88.
- de Jong, A. P. H., C. M. Roggero, M. R. Ho, M. Y. Wong, C. A. Brautigam, J. Rizo, and P. S. Kaeser. 2018. 'RIM C2B Domains Target Presynaptic Active Zone Functions to PIP2-Containing Membranes', *Neuron*, 98: 335-49 e7.
- Del Castillo, J., and B. Katz. 1954. 'Quantal components of the end-plate potential', *J Physiol*, 124: 560-73.
- Dembla, E., M. Dembla, S. Maxeiner, and F. Schmitz. 2020. 'Synaptic ribbons foster active zone stability and illumination-dependent active zone enrichment of RIM2 and Cav1.4 in photoreceptor synapses', *Sci Rep*, 10: 5957.
- Deng, L., P. S. Kaeser, W. Xu, and T. C. Sudhof. 2011. 'RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13', *Neuron*, 69: 317-31.
- Devine, M. J., and J. T. Kittler. 2018. 'Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease', *Nat Rev Neurosci*, 19: 63-80.
- Ding, S. L., and G. W. Van Hoesen. 2015. 'Organization and Detailed Parcellation of Human Hippocampal Head and Body Regions Based on a Combined Analysis of Cyto- and Chemoarchitecture', *J Comp Neurol*, 523: 2233-53.
- Dobrunz, L. E., and C. F. Stevens. 1999. 'Response of Hippocampal Synapses to Natural Stimulation Patterns', *Neuron*, 22: 157-66.

- Dolphin, A. C., and A. Lee. 2020. 'Presynaptic calcium channels: specialized control of synaptic neurotransmitter release', *Nat Rev Neurosci*, 21: 213-29.
- Dong, W., T. Radulovic, R. O. Goral, C. Thomas, M. Suarez Montesinos, D. Guerrero-Given, A. Hagiwara, T. Putzke, Y. Hida, M. Abe, K. Sakimura, N. Kamasawa, T. Ohtsuka, and S. M. Young, Jr. 2018. 'CAST/ELKS Proteins Control Voltage-Gated Ca(2+) Channel Density and Synaptic Release Probability at a Mammalian Central Synapse', *Cell Rep*, 24: 284-93 e6.
- Dringenberg, H. C. 2020. 'The history of long-term potentiation as a memory mechanism: Controversies, confirmation, and some lessons to remember', *Hippocampus*, 30: 987-1012.
- Dulubova, I., X. Lou, J. Lu, I. Huryeva, A. Alam, R. Schneggenburger, T. C. Sudhof, and J. Rizo. 2005. 'A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity?', *EMBO J*, 24: 2839-50.
- Eccles, J. C. 1964. *The Physiology of Synapses* (Springer Berlin Heidelberg).
- Eccles, J. C., and W. C. Gibson. 1979. *Sherrington*.
- Eggermann, E., I. Bucurenciu, S. P. Goswami, and P. Jonas. 2011. 'Nanodomain coupling between Ca(2+)(+) channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses', *Nat Rev Neurosci*, 13: 7-21.
- Ehmann, N., D. Oswald, and R. J. Kittel. 2018. 'Drosophila active zones: From molecules to behaviour', *Neurosci Res*, 127: 14-24.
- Ehmann, N., S. van de Linde, A. Alon, D. Ljaschenko, X. Z. Keung, T. Holm, A. Rings, A. DiAntonio, S. Hallermann, U. Ashery, M. Heckmann, M. Sauer, and R. J. Kittel. 2014. 'Quantitative super-resolution imaging of Bruchpilot distinguishes active zone states', *Nat Commun*, 5: 4650.
- El-Gaby, M., O. A. Shipton, and O. Paulsen. 2015. 'Synaptic Plasticity and Memory: New Insights from Hippocampal Left-Right Asymmetries', *Neuroscientist*, 21: 490-502.
- Emperador-Melero, J., and P. S. Kaeser. 2020. 'Assembly of the presynaptic active zone', *Curr Opin Neurobiol*, 63: 95-103.
- Fatt, P., and B. Katz. 1951. 'An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode', *J Physiol*, 115: 320-70.
- Fatt, P., and B. Katz. 1952. 'Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings', *J Physiol*, 117: 109-28.
- Fernandez-Busnadiego, R., S. Asano, A. M. Oprisoreanu, E. Sakata, M. Doengi, Z. Kochovski, M. Zurner, V. Stein, S. Schoch, W. Baumeister, and V. Lucic. 2013. 'Cryo-electron tomography reveals a critical role of RIM1alpha in synaptic vesicle tethering', *J Cell Biol*, 201: 725-40.
- Fernandez-Busnadiego, R., B. Zuber, U. E. Maurer, M. Cyrklaff, W. Baumeister, and V. Lucic. 2010. 'Quantitative analysis of the native presynaptic cytomatrix by cryoelectron tomography', *J Cell Biol*, 188: 145-56.
- Foster, M., and C. S. Sherrington. 1897. 'A textbook of physiology. With C.S. Sherrington. Part 3. The central nervous system'.
- Fourcaudot, E., F. Gambino, Y. Humeau, G. Casassus, H. Shaban, B. Poulain, and A. Luthi. 2008. 'cAMP/PKA signaling and RIM1alpha mediate presynaptic LTP in the lateral amygdala', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 15130-5.
- Frotscher, M., E. Soriano, and U. Misgeld. 1994. 'Divergence of hippocampal mossy fibers', *Synapse*, 16: 148-60.
- Fujimoto, K., T. Shibasaki, N. Yokoi, Y. Kashima, M. Matsumoto, T. Sasaki, N. Tajima, T. Iwanaga, and S. Seino. 2002. 'Piccolo, a Ca2+ sensor in pancreatic beta-cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2. Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis', *J Biol Chem*, 277: 50497-502.
- Fukaya, R., M. Maglione, S. J. Sigrist, and T. Sakaba. 2021. 'Rapid Ca(2+) channel accumulation contributes to cAMP-mediated increase in transmission at hippocampal mossy fiber synapses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118.

- Fukuda, M. 2003. 'Distinct Rab binding specificity of Rim1, Rim2, rabphilin, and Noc2. Identification of a critical determinant of Rab3A/Rab27A recognition by Rim2', *J Biol Chem*, 278: 15373-80.
- Fyhn, M., T. Hafting, A. Treves, M. B. Moser, and E. I. Moser. 2007. 'Hippocampal remapping and grid realignment in entorhinal cortex', *Nature*, 446: 190-94.
- Fyhn, M., S. Molden, M. P. Witter, E. I. Moser, and M. B. Moser. 2004. 'Spatial representation in the entorhinal cortex', *Science*, 305: 1258-64.
- Galimberti, I., E. Bednarek, F. Donato, and P. Caroni. 2010. 'EphA4 Signaling in Juveniles Establishes Topographic Specificity of Structural Plasticity in the Hippocampus', *Neuron*, 65: 627-42.
- Galimberti, I., N. Gogolla, S. Alberi, A. F. Santos, D. Muller, and P. Caroni. 2006. 'Long-term rearrangements of hippocampal mossy fiber terminal connectivity in the adult regulated by experience', *Neuron*, 50: 749-63.
- Gambarotto, D., F. U. Zwettler, M. Le Guennec, M. Schmidt-Cernohorska, D. Fortun, S. Borgers, J. Heine, J. G. Schloetel, M. Reuss, M. Unser, E. S. Boyden, M. Sauer, V. Hamel, and P. Guichard. 2019. 'Imaging cellular ultrastructures using expansion microscopy (U-ExM)', *Nat Methods*, 16: 71-74.
- Geiger, J. R. P., and P. Jonas. 2000. 'Dynamic Control of Presynaptic Ca²⁺ Inflow by Fast-Inactivating K⁺ Channels in Hippocampal Mossy Fiber Boutons', *Neuron*, 28: 927-39.
- Geppert, M., Y. Goda, C. F. Stevens, and T. C. Sudhof. 1997. 'The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion', *Nature*, 387: 810-4.
- Gillies, S., A. Bierbaum, K. Lautaportti, and O. Tonnhofer. 2007. "Shapely: Manipulation and Analysis of Geometric Objects." Available online at: <https://github.com/Toblerity/Shapely>.
- Golgi, C. 1873. 'Sulla sostanza grigia del cervello', *Gazzetta Medica Italiana*, 33: 244-46.
- Goodsell, D. S., A. J. Olson, and S. Forli. 2020. 'Art and Science of the Cellular Mesoscale', *Trends Biochem Sci*, 45: 472-83.
- Gracheva, E. O., G. Hadwiger, M. L. Nonet, and J. E. Richmond. 2008. 'Direct interactions between *C. elegans* RAB-3 and Rim provide a mechanism to target vesicles to the presynaptic density', *Neurosci Lett*, 444: 137-42.
- Graf, E. R., V. Valakh, C. M. Wright, C. Wu, Z. Liu, Y. Q. Zhang, and A. DiAntonio. 2012. 'RIM promotes calcium channel accumulation at active zones of the *Drosophila* neuromuscular junction', *J Neurosci*, 32: 16586-96.
- Gray, E. G. 1959a. 'Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study', *Journal of anatomy*, 93: 420-33.
- Gray, E. G. 1959b. 'Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex', *Nature*, 183: 1592-3.
- Griffiths, G. 1993. 'Fixation for Fine Structure Preservation and Immunocytochemistry.' in Gareth Griffiths (ed.), *Fine Structure Immunocytochemistry* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Grushin, K., R. V. Kalyana Sundaram, C. V. Sindelar, and J. E. Rothman. 2022. 'Munc13 structural transitions and oligomers that may choreograph successive stages in vesicle priming for neurotransmitter release', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119.
- Guan, R., H. Dai, D. R. Tomchick, I. Dulubova, M. Machius, T. C. Sudhof, and J. Rizo. 2007. 'Crystal structure of the RIM1alpha C2B domain at 1.7 Å resolution', *Biochemistry*, 46: 8988-98.
- Gundelfinger, E. D., C. Reissner, and C. C. Garner. 2015. 'Role of Bassoon and Piccolo in Assembly and Molecular Organization of the Active Zone', *Front Synaptic Neurosci*, 7: 19.
- Hacker, C., and J. M. Lucocq. 2014. 'Analysis of specificity in immunoelectron microscopy', *Methods Mol Biol*, 1117: 315-23.

- Hafting, T., M. Fyhn, S. Molden, M. B. Moser, and E. I. Moser. 2005. 'Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex', *Nature*, 436: 801-06.
- Hagiwara, A., Y. Fukazawa, M. Deguchi-Tawarada, T. Ohtsuka, and R. Shigemoto. 2005. 'Differential distribution of release-related proteins in the hippocampal CA3 area as revealed by freeze-fracture replica labeling', *J Comp Neurol*, 489: 195-216.
- Hainmueller, T., and M. Bartos. 2020. 'Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories', *Nat Rev Neurosci*, 21: 153-68.
- Hallermann, S., C. Pawlu, P. Jonas, and M. Heckmann. 2003. 'A large pool of releasable vesicles in a cortical glutamatergic synapse', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 8975-80.
- Hallermann, S., and R. A. Silver. 2013. 'Sustaining rapid vesicular release at active zones: potential roles for vesicle tethering', *Trends Neurosci*, 36: 185-94.
- Han, Y., P. S. Kaeser, T. C. Südhof, and R. Schneggenburger. 2011. 'RIM determines Ca(2)+ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone', *Neuron*, 69: 304-16.
- Harlow, M. L., D. Ress, A. Stoschek, R. M. Marshall, and U. J. McMahan. 2001. 'The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction', *Nature*, 409: 479-84.
- Harris, C. R., K. J. Millman, S. J. van der Walt, R. Gommers, P. Virtanen, D. Cournapeau, E. Wieser, J. Taylor, S. Berg, N. J. Smith, R. Kern, M. Picus, S. Hoyer, M. H. van Kerkwijk, M. Brett, A. Haldane, J. F. del Rio, M. Wiebe, P. Peterson, P. Gerard-Marchant, K. Sheppard, T. Reddy, W. Weckesser, H. Abbasi, C. Gohlke, and T. E. Oliphant. 2020. 'Array programming with NumPy', *Nature*, 585: 357-62.
- Held, R. G., C. Liu, and P. S. Kaeser. 2016. 'ELKS controls the pool of readily releasable vesicles at excitatory synapses through its N-terminal coiled-coil domains', *Elife*, 5.
- Henze, D. A., D. B. McMahon, K. M. Harris, and G. Barrionuevo. 2002. 'Giant miniature EPSCs at the hippocampal mossy fiber to CA3 pyramidal cell synapse are monoquantal', *J Neurophysiol*, 87: 15-29.
- Henze, D. A., L. Wittner, and G. Buzsaki. 2002. 'Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo', *Nat Neurosci*, 5: 790-5.
- Heuser, J. E., and T. S. Reese. 1973. 'Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction', *J Cell Biol*, 57: 315-44.
- Heuser, J. E., and T. S. Reese. 1981. 'Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction', *J Cell Biol*, 88: 564-80.
- Heuser, J. E., T. S. Reese, M. J. Dennis, Y. Jan, L. Jan, and L. Evans. 1979. 'Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release', *J Cell Biol*, 81: 275-300.
- Hibino, H., R. Pironkova, O. Onwumere, M. Vologodskaja, A. J. Hudspeth, and F. Lesage. 2002. 'RIM Binding Proteins (RBPs) Couple Rab3-Interacting Molecules (RIMs) to Voltage-Gated Ca2+ Channels', *Neuron*, 34: 411-23.
- Hirano, M., Y. Takada, C. F. Wong, K. Yamaguchi, H. Kotani, T. Kurokawa, M. X. Mori, T. P. Snutch, M. Ronjat, M. De Waard, and Y. Mori. 2017. 'C-terminal splice variants of P/Q-type Ca(2+) channel CaV2.1 alpha1 subunits are differentially regulated by Rab3-interacting molecule proteins', *J Biol Chem*, 292: 9365-81.
- Hirokawa, N., K. Sobue, K. Kanda, A. Harada, and H. Yorifuji. 1989. 'The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin 1', *J Cell Biol*, 108: 111-26.
- Ho, J., T. Tumkaya, S. Aryal, H. Choi, and A. Claridge-Chang. 2019. 'Moving beyond P values: data analysis with estimation graphics', *Nat Methods*, 16: 565-66.

- Hodgkin, A. L. 1937a. 'Evidence for electrical transmission in nerve: Part I', *J Physiol*, 90: 183-210.
- Hodgkin, A. L. 1937b. 'Evidence for electrical transmission in nerve: Part II', *J Physiol*, 90: 211-32.
- Hodgkin, A. L., A. F. Huxley, and B. Katz. 1949. 'Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid', *Arch. Sci. Physiol.*, 3: 129-50.
- Hodgkin, A. L., A. F. Huxley, and B. Katz. 1952. 'Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*', *J Physiol*, 116: 424-48.
- Hodgkin, A. L., and B. Katz. 1949. 'The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid', *J Physiol*, 108: 37-77.
- Huang, T. T., R. Smith, K. Bacos, D. Y. Song, R. M. Faull, H. J. Waldvogel, and J. Y. Li. 2020. 'No symphony without bassoon and piccolo: changes in synaptic active zone proteins in Huntington's disease', *Acta Neuropathol Commun*, 8: 77.
- Huang, Y. Y., S. S. Zakharenko, S. Schoch, P. S. Kaeser, R. Janz, T. C. Sudhof, S. A. Siegelbaum, and E. R. Kandel. 2005. 'Genetic evidence for a protein-kinase-A-mediated presynaptic component in NMDA-receptor-dependent forms of long-term synaptic potentiation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 9365-70.
- Hunter, J. D. 2007. 'Matplotlib: A 2D Graphics Environment', *Computing in Science & Engineering*, 9: 90-95.
- Imig, C., and B. H. Cooper. 2017. '3D Analysis of Synaptic Ultrastructure in Organotypic Hippocampal Slice Culture by High-Pressure Freezing and Electron Tomography', *Methods Mol Biol*, 1538: 215-31.
- Imig, C., F. J. Lopez-Murcia, L. Maus, I. H. Garcia-Plaza, L. S. Mortensen, M. Schwark, V. Schwarze, J. Angibaud, U. V. Nagerl, H. Taschenberger, N. Brose, and B. H. Cooper. 2020. 'Ultrastructural Imaging of Activity-Dependent Synaptic Membrane-Trafficking Events in Cultured Brain Slices', *Neuron*, 108: 843-60 e8.
- Imig, C., S. W. Min, S. Krinner, M. Arancillo, C. Rosenmund, T. C. Sudhof, J. Rhee, N. Brose, and B. H. Cooper. 2014. 'The morphological and molecular nature of synaptic vesicle priming at presynaptic active zones', *Neuron*, 84: 416-31.
- Jackman, S. L., and W. G. Regehr. 2017. 'The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation', *Neuron*, 94: 447-64.
- Jensen, T. P., K. Zheng, N. Cole, J. S. Marvin, L. L. Looger, and D. A. Rusakov. 2019. 'Multiplex imaging relates quantal glutamate release to presynaptic Ca(2+) homeostasis at multiple synapses in situ', *Nat Commun*, 10: 1414.
- Johnson, S., S. Halford, A. G. Morris, R. J. Patel, S. E. Wilkie, A. J. Hardcastle, A. T. Moore, K. Zhang, and D. M. Hunt. 2003. 'Genomic organisation and alternative splicing of human RIM1, a gene implicated in autosomal dominant cone-rod dystrophy (CORD7)☆', *Genomics*, 81: 304-14.
- Jonas, P., G. Major, and B. Sakmann. 1993. 'Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus', *J Physiol*, 472: 615-63.
- Jordan, J. T. 2020. 'The rodent hippocampus as a bilateral structure: A review of hemispheric lateralization', *Hippocampus*, 30: 278-92.
- Jung, M. W., and B. L. McNaughton. 1993. 'Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer', *Hippocampus*, 3: 165-82.
- Jung, S., T. Oshima-Takago, R. Chakrabarti, A. B. Wong, Z. Jing, G. Yamanbaeva, M. M. Picher, S. M. Wojcik, F. Gottfert, F. Predoehl, K. Michel, S. W. Hell, S. Schoch, N. Strenzke, C. Wichmann, and T. Moser. 2015. 'Rab3-interacting molecules 2alpha and 2beta promote the abundance of voltage-gated CaV1.3 Ca2+ channels at hair cell active zones', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: E3141-9.

- Kaeser, P. S., L. Deng, A. E. Chavez, X. Liu, P. E. Castillo, and T. C. Sudhof. 2009. 'ELKS2alpha/CAST deletion selectively increases neurotransmitter release at inhibitory synapses', *Neuron*, 64: 227-39.
- Kaeser, P. S., L. Deng, M. Fan, and T. C. Sudhof. 2012. 'RIM genes differentially contribute to organizing presynaptic release sites', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 11830-5.
- Kaeser, P. S., L. Deng, Y. Wang, I. Dulubova, X. Liu, J. Rizo, and T. C. Sudhof. 2011. 'RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction', *Cell*, 144: 282-95.
- Kaeser, P. S., H. B. Kwon, J. Blundell, V. Chevaleyre, W. Morishita, R. C. Malenka, C. M. Powell, P. E. Castillo, and T. C. Sudhof. 2008. 'RIM1alpha phosphorylation at serine-413 by protein kinase A is not required for presynaptic long-term plasticity or learning', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 14680-5.
- Kaeser, P. S., H. B. Kwon, C. Q. Chiu, L. Deng, P. E. Castillo, and T. C. Sudhof. 2008. 'RIM1alpha and RIM1beta are synthesized from distinct promoters of the RIM1 gene to mediate differential but overlapping synaptic functions', *J Neurosci*, 28: 13435-47.
- Kaeser, P. S., and W. G. Regehr. 2017. 'The readily releasable pool of synaptic vesicles', *Curr Opin Neurobiol*, 43: 63-70.
- Kandel, E. R. 2009. 'The biology of memory: a forty-year perspective', *J Neurosci*, 29: 12748-56.
- Kandel, E. R., J. H. Schwartz, T. M. Jessell, S. A. Siegelbaum, and A. J. Hudspeth. 2012. *Principles of Neural Science, Fifth Edition* (McGraw-Hill Education).
- Kanno, H., R. J. Speedy, and C. A. Angell. 1975. 'Supercooling of Water to -92{degrees}C Under Pressure', *Science*, 189: 880-1.
- Karnovsky, M. J. 1965. 'A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy', *Journal of Cell Biology*, 27: 137.
- Katz, B. 1969. *The release of neural transmitter substances* (Thomas: Springfield, Ill.).
- Katz, B., and R. Miledi. 1965a. 'The Effect of Calcium on Acetylcholine Release from Motor Nerve Terminals', *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 161: 496-503.
- Katz, B., and R. Miledi. 1965b. 'The Measurement of Synaptic Delay, and the Time Course of Acetylcholine Release at the Neuromuscular Junction', *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 161: 483-95.
- Kawabe, H., M. Mitkovski, P. S. Kaeser, J. Hirrlinger, F. Opazo, D. Nestvogel, S. Kalla, A. Fejtova, S. E. Verrier, S. R. Bungers, B. H. Cooper, F. Varoqueaux, Y. Wang, R. B. Nehring, E. D. Gundelfinger, C. Rosenmund, S. O. Rizzoli, T. C. Sudhof, J. S. Rhee, and N. Brose. 2017. 'ELKS1 localizes the synaptic vesicle priming protein bMunc13-2 to a specific subset of active zones', *J Cell Biol*, 216: 1143-61.
- Kheirbek, M. A., L. J. Drew, N. S. Burghardt, D. O. Costantini, L. Tannenholz, S. E. Ahmari, H. Zeng, A. A. Fenton, and R. Hen. 2013. 'Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus', *Neuron*, 77: 955-68.
- Kilmer, W. L., and T. McLardy. 1970. 'A model of hippocampal CA3 circuitry', *Int J Neurosci*, 1: 107-12.
- Kim, S., S. J. Guzman, H. Hu, and P. Jonas. 2012. 'Active dendrites support efficient initiation of dendritic spikes in hippocampal CA3 pyramidal neurons', *Nat Neurosci*, 15: 600-6.
- Kintscher, M., C. Wozny, F. W. Jochenning, D. Schmitz, and J. Breustedt. 2013. 'Role of RIM1alpha in short- and long-term synaptic plasticity at cerebellar parallel fibres', *Nat Commun*, 4: 2392.
- Kittel, R. J., and M. Heckmann. 2016. 'Synaptic Vesicle Proteins and Active Zone Plasticity', *Front Synaptic Neurosci*, 8: 8.

- Kittel, R. J., C. Wichmann, T. M. Rasse, W. Fouquet, M. Schmidt, A. Schmid, D. A. Wagh, C. Pawlu, R. R. Kellner, K. I. Willig, S. W. Hell, E. Buchner, M. Heckmann, and S. J. Sigrist. 2006. 'Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release', *Science*, 312: 1051-4.
- Kiyonaka, S., M. Wakamori, T. Miki, Y. Uriu, M. Nonaka, H. Bito, A. M. Beedle, E. Mori, Y. Hara, M. De Waard, M. Kanagawa, M. Itakura, M. Takahashi, K. P. Campbell, and Y. Mori. 2007. 'RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels', *Nat Neurosci*, 10: 691-701.
- Klemann, C. J., and E. W. Roubos. 2011. 'The gray area between synapse structure and function-Gray's synapse types I and II revisited', *Synapse*, 65: 1222-30.
- Kluyver, T., B. Ragan-Kelley, F. Pérez, B. E. Granger, M. Bussonnier, J. Frederic, K. Kelley, J. B. Hamrick, J. Grout, S. Corlay, P. Ivanov, D. Avila, S. Abdalla, C. Willing, and Jupyter Development Team. 2016. "Jupyter Notebooks - a publishing format for reproducible computational workflows." In *ELPUB*.
- Kolotuev, I., D. J. Bumbarger, M. Labouesse, and Y. Schwab. 2012. 'Targeted ultramicrotomy: a valuable tool for correlated light and electron microscopy of small model organisms', *Methods Cell Biol*, 111: 203-22.
- Korogod, N., C. C. Petersen, and G. W. Knott. 2015. 'Ultrastructural analysis of adult mouse neocortex comparing aldehyde perfusion with cryo fixation', *Elife*, 4.
- Koushika, S. P., J. E. Richmond, G. Hadwiger, R. M. Weimer, E. M. Jorgensen, and M. L. Nonet. 2001. 'A post-docking role for active zone protein Rim', *Nat Neurosci*, 4: 997-1005.
- Kremer, J. R., D. N. Mastronarde, and J. R. McIntosh. 1996. 'Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD', *J Struct Biol*, 116: 71-6.
- Kushibiki, Y., T. Suzuki, Y. Jin, and H. Taru. 2019. 'RIMB-1/RIM-Binding Protein and UNC-10/RIM Redundantly Regulate Presynaptic Localization of the Voltage-Gated Calcium Channel in *Caenorhabditis elegans*', *J Neurosci*, 39: 8617-31.
- Kusick, G. F., M. Chin, S. Raychaudhuri, K. Lippmann, K. P. Adula, E. J. Hujber, T. Vu, M. W. Davis, E. M. Jorgensen, and S. Watanabe. 2020. 'Synaptic vesicles transiently dock to refill release sites', *Nat Neurosci*, 23: 1329-38.
- Kusick, G. F., T. H. Ogunmowo, and S. Watanabe. 2022. 'Transient docking of synaptic vesicles: Implications and mechanisms', *Curr Opin Neurobiol*, 74: 102535.
- Laatsch, R. H., and W. M. Cowan. 1966. 'Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat. I. Normal structure with special reference to synaptic organization', *J Comp Neurol*, 128: 359-95.
- Lachamp, P. M., Y. Liu, and S. J. Liu. 2009. 'Glutamatergic modulation of cerebellar interneuron activity is mediated by an enhancement of GABA release and requires protein kinase A/RIM1alpha signaling', *J Neurosci*, 29: 381-92.
- Landis, D. M. D., A. K. Hall, L. A. Weinstein, and T. S. Reese. 1988. 'The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse', *Neuron*, 1: 201-09.
- Lawrence, J. J., Z. M. Grinspan, and C. J. McBain. 2004. 'Quantal transmission at mossy fibre targets in the CA3 region of the rat hippocampus', *J Physiol*, 554: 175-93.
- Lee, H., C. Wang, S. S. Deshmukh, and J. J. Knierim. 2015. 'Neural Population Evidence of Functional Heterogeneity along the CA3 Transverse Axis: Pattern Completion versus Pattern Separation', *Neuron*, 87: 1093-105.
- Leutgeb, J. K., S. Leutgeb, M. B. Moser, and E. I. Moser. 2007. 'Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus', *Science*, 315: 961-6.
- Li, X., A. Radhakrishnan, K. Grushin, R. Kasula, A. Chaudhuri, S. Gomathinayagam, S. S. Krishnakumar, J. Liu, and J. E. Rothman. 2019. 'Symmetrical organization of proteins under docked synaptic vesicles', *FEBS Lett*, 593: 144-53.
- Lichter, K., and P. Kollmannsberger. 2022. "SynapticVes-Py." In.: GitHub DOI: 10.5281/zenodo.6952807.

- Lichter, K., M. M. Paul, M. Pauli, S. Schoch, P. Kollmannsberger, C. Stigloher, M. Heckmann, and A. L. Siren. 2022. 'Ultrastructural analysis of wildtype and RIM1 α knock-out active zones in a large cortical synapse', *Cell Rep*. Manuscript accepted in principle (Status: 22/08/22)
- Liddell, H.G., H.S. Jones, and R. Scott. 1996. *Greek-English Lexicon: with a Revised Supplement* (Clarendon Press).
- Lim, C., E. J. Mufson, J. H. Kordower, H. W. Blume, J. R. Madsen, and C. B. Saper. 1997. 'Connections of the hippocampal formation in humans: II. The endfolial fiber pathway', *J Comp Neurol*, 385: 352-71.
- Lisman, J., G. Buzsáki, H. Eichenbaum, L. Nadel, C. Ranganath, and A. D. Redish. 2017. 'Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition', *Nature neuroscience*, 20: 1434-47.
- Lisman, J. E. 1999. 'Relating Hippocampal Circuitry to Function', *Neuron*, 22: 233-42.
- Liu, H., L. Li, D. Nedelcu, Q. Hall, L. Zhou, W. Wang, Y. Yu, J. M. Kaplan, and Z. Hu. 2019. 'Heterodimerization of UNC-13/RIM regulates synaptic vesicle release probability but not priming in *C. elegans*', *Elife*, 8.
- Lohner, M., N. Babai, T. Muller, K. Gierke, J. Atorf, A. Joachimsthaler, A. Peukert, H. Martens, A. Feigenspan, J. Kremers, S. Schoch, J. H. Brandstatter, and H. Regus-Leidig. 2017. 'Analysis of RIM Expression and Function at Mouse Photoreceptor Ribbon Synapses', *J Neurosci*, 37: 7848-63.
- Lomo, T. 2018. 'Discovering long-term potentiation (LTP) - recollections and reflections on what came after', *Acta Physiol (Oxf)*, 222.
- Lonart, G., S. Schoch, P. S. Kaeser, C. J. Larkin, T. C. Südhof, and D. J. Linden. 2003. 'Phosphorylation of RIM1 α by PKA Triggers Presynaptic Long-Term Potentiation at Cerebellar Parallel Fiber Synapses', *Cell*, 115: 49-60.
- Lorente De Nó, R. 1934. 'Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system', *Journal für Psychologie und Neurologie*, 46: 113-77.
- Lu, J., H. Li, Y. Wang, T. C. Südhof, and J. Rizo. 2005. 'Solution structure of the RIM1 α PDZ domain in complex with an ELKS1b C-terminal peptide', *J Mol Biol*, 352: 455-66.
- Lu, J., M. Machiusi, I. Dulubova, H. Dai, T. C. Südhof, D. R. Tomchick, and J. Rizo. 2006. 'Structural basis for a Munc13-1 homodimer to Munc13-1/RIM heterodimer switch', *PLoS Biol*, 4: e192.
- Lu, L., K. M. Igarashi, M. P. Witter, E. I. Moser, and M. B. Moser. 2015. 'Topography of Place Maps along the CA3-to-CA2 Axis of the Hippocampus', *Neuron*, 87: 1078-92.
- Magee, J. C. , and C. Grienberger. 2020. 'Synaptic Plasticity Forms and Functions', *Annual Review of Neuroscience*, 43: 95-117.
- Markert, S. M., M. Skoruppa, B. Yu, B. Mulcahy, M. Zhen, S. Gao, M. Sendtner, and C. Stigloher. 2020. 'Overexpression of an ALS-associated FUS mutation in *C. elegans* disrupts NMJ morphology and leads to defective neuromuscular transmission', *Biol Open*, 9.
- Martinez-Sanchez, A., U. Laugks, Z. Kochovski, C. Papantoniou, L. Zinzula, W. Baumeister, and V. Lucic. 2021. 'Trans-synaptic assemblies link synaptic vesicles and neuroreceptors', *Sci Adv*, 7.
- Mastrorade, D. N. 2005. 'Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements', *J Struct Biol*, 152: 36-51.
- Maus, L., C. Lee, B. Altas, S. M. Sertel, K. Weyand, S. O. Rizzoli, J. Rhee, N. Brose, C. Imig, and B. H. Cooper. 2020. 'Ultrastructural Correlates of Presynaptic Functional Heterogeneity in Hippocampal Synapses', *Cell Rep*, 30: 3632-43 e8.
- McIntosh, R., D. Nicastro, and D. Mastrorade. 2005. 'New views of cells in 3D: an introduction to electron tomography', *Trends Cell Biol*, 15: 43-51.

- Mendonca, P. R. F., E. Tagliatti, H. Langley, D. Kotzadimitriou, C. G. Zamora-Chimal, Y. Timofeeva, and K. E. Volynski. 2022. 'Asynchronous glutamate release is enhanced in low release efficacy synapses and dispersed across the active zone', *Nat Commun*, 13: 3497.
- Michaelides, M., G. E. Holder, D. M. Hunt, F. W. Fitzke, A. C. Bird, and A. T. Moore. 2005. 'A detailed study of the phenotype of an autosomal dominant cone-rod dystrophy (CORD7) associated with mutation in the gene for RIM1', *Br J Ophthalmol*, 89: 198-206.
- Midorikawa, M., and T. Sakaba. 2017. 'Kinetics of Releasable Synaptic Vesicles and Their Plastic Changes at Hippocampal Mossy Fiber Synapses', *Neuron*, 96: 1033-40 e3.
- Miki, T., W. A. Kaufmann, G. Malagon, L. Gomez, K. Tabuchi, M. Watanabe, R. Shigemoto, and A. Marty. 2017. 'Numbers of presynaptic Ca(2+) channel clusters match those of functionally defined vesicular docking sites in single central synapses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: E5246-E55.
- Miki, T., S. Kiyonaka, Y. Uriu, M. De Waard, M. Wakamori, A. M. Beedle, K. P. Campbell, and Y. Mori. 2007. 'Mutation associated with an autosomal dominant cone-rod dystrophy CORD7 modifies RIM1-mediated modulation of voltage-dependent Ca2+ channels', *Channels (Austin)*, 1: 144-7.
- Milovanovic, D., and P. De Camilli. 2017. 'Synaptic Vesicle Clusters at Synapses: A Distinct Liquid Phase?', *Neuron*, 93: 995-1002.
- Milovanovic, D., Y. Wu, X. Bian, and P. De Camilli. 2018. 'A liquid phase of synapsin and lipid vesicles', *Science*, 361: 604-07.
- Mittelstaedt, T., E. Alvarez-Baron, and S. Schoch. 2010. 'RIM proteins and their role in synapse function', *Biol Chem*, 391: 599-606.
- Monday, H. R., T. J. Younts, and P. E. Castillo. 2018. 'Long-Term Plasticity of Neurotransmitter Release: Emerging Mechanisms and Contributions to Brain Function and Disease', *Annu Rev Neurosci*, 41: 299-322.
- Moor, H. 1987. 'Theory and Practice of High Pressure Freezing.' in Rudolf Alexander Steinbrecht and Karl Zierold (eds.), *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Moor, H., and U. Riehle. 1968. "Snap freezing under high pressure: a new fixation technique for freeze-etching." In *Proceedings of the 4th European Regional Conference on Electron Microscopy, Rome, 1968*, 445-46.
- Mrestani, A., M. Pauli, P. Kollmannsberger, F. Repp, R. J. Kittel, J. Eilers, S. Doose, M. Sauer, A. L. Siren, M. Heckmann, and M. M. Paul. 2021. 'Active zone compaction correlates with presynaptic homeostatic potentiation', *Cell Rep*, 37: 109770.
- Neher, E. 2015. 'Merits and Limitations of Vesicle Pool Models in View of Heterogeneous Populations of Synaptic Vesicles', *Neuron*, 87: 1131-42.
- Neher, E., and N. Brose. 2018. 'Dynamically primed synaptic vesicle states: key to understand synaptic short-term plasticity', *Neuron*, 100: 1283-91.
- Nicoll, R. A. 2017. 'A Brief History of Long-Term Potentiation', *Neuron*, 93: 281-90.
- Nicoll, R. A., and D. Schmitz. 2005. 'Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses', *Nat Rev Neurosci*, 6: 863-76.
- O'Keefe, J., and J. Dostrovsky. 1971. 'The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat', *Brain Research*, 34: 171-75.
- O'Keefe, J., and L. Nadel. 1978. *The hippocampus as a cognitive map* (Oxford University Press).
- Ohtsuka, T., E. Takao-Rikitsu, E. Inoue, M. Inoue, M. Takeuchi, K. Matsubara, M. Deguchi-Tawarada, K. Satoh, K. Morimoto, H. Nakanishi, and Y. Takai. 2002. 'Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1', *J Cell Biol*, 158: 577-90.

- Orlando, M., A. Dvorzhak, F. Bruentgens, M. Maglione, B. R. Rost, S. J. Sigrist, J. Breustedt, and D. Schmitz. 2021. 'Recruitment of release sites underlies chemical presynaptic potentiation at hippocampal mossy fiber boutons', *PLoS Biol*, 19: e3001149.
- Ortner, N. J., A. Pinggera, N. T. Hofer, A. Siller, N. Brandt, A. Raffener, K. Vilusic, I. Lang, K. Blum, G. J. Obermair, E. Stefan, J. Engel, and J. Striessnig. 2020. 'RBP2 stabilizes slow Cav1.3 Ca(2+) channel inactivation properties of cochlear inner hair cells', *Pflugers Arch*, 472: 3-25.
- Owe, S. G., V. Jensen, E. Evergren, A. Ruiz, O. Shupliakov, D. M. Kullmann, J. Storm-Mathisen, S. I. Walaas, O. Hvalby, and L. H. Bergersen. 2009. 'Synapsin- and actin-dependent frequency enhancement in mouse hippocampal mossy fiber synapses', *Cereb Cortex*, 19: 511-23.
- Palade, G. E., and S. L. Palay. 1954. 'Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses', *Anat Rec*, 118: 335-36.
- Palay, S. L. 1956. 'Synapses in the central nervous system', *J Biophys Biochem Cytol*, 2: 193-202.
- Palay, S. L. 1958. 'The morphology of synapses in the central nervous system', *Exp Cell Res (Suppl)*, 5: 275-93.
- Palay, S. L., and V. Chan-Palay. 1974. *Cerebellar cortex; cytology and organization* (Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York).
- Palay, S. L., and G. E. Palade. 1955. 'The fine structure of neurons', *J Biophys Biochem Cytol*, 1: 69-88.
- Paul, M. M., S. Dannhauser, L. Morris, A. Mrestani, M. Hubsch, J. Gehring, G. N. Hatzopoulos, M. Pauli, G. M. Auger, G. Bornschein, N. Scholz, D. Ljaschenko, M. Muller, M. Sauer, H. Schmidt, R. J. Kittel, A. DiAntonio, I. Vakonakis, M. Heckmann, and T. Langenhan. 2022. 'The human cognition-enhancing CORD7 mutation increases active zone number and synaptic release', *Brain*.
- Pauli, M., M. M. Paul, S. Proppert, A. Mrestani, M. Sharifi, F. Repp, L. Kurzinger, P. Kollmannsberger, M. Sauer, M. Heckmann, and A. L. Siren. 2021. 'Targeted volumetric single-molecule localization microscopy of defined presynaptic structures in brain sections', *Commun Biol*, 4: 407.
- Pedregosa, F., G. Varoquaux, A. Gramfort, V. Michel, B. Thirion, O. Grisel, M. Blondel, P. Prettenhofer, R. Weiss, V. Dubourg, J. Vanderplas, A. Passos, D. Cournapeau, M. Brucher, M. Perrot, and E. Duchesnay. 2011. 'Scikit-learn: Machine Learning in Python', *Journal of Machine Learning Research*, 12: 2825-30.
- Pelkey, K. A., L. Topolnik, X. Q. Yuan, J. C. Lacaille, and C. J. McBain. 2008. 'State-dependent cAMP sensitivity of presynaptic function underlies metaplasticity in a hippocampal feedforward inhibitory circuit', *Neuron*, 60: 980-7.
- Pereda, A. E. 2014. 'Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses', *Nat Rev Neurosci*, 15: 250-63.
- Perin, M. S., P. A. Johnston, T. Ozcelik, R. Jahn, U. Francke, and T. C. Südhof. 1991. 'Structural and functional conservation of synaptotagmin (p65) in Drosophila and humans', *J Biol Chem*, 266: 615-22.
- Peters, A., S. L. Palay, and H. F. Webster. 1991. *The Fine Structure of the Nervous System: Neurons and Their Supporting Cells* (Oxford University Press).
- Phillips, G. R., J. K. Huang, Y. Wang, H. Tanaka, L. Shapiro, W. Zhang, W.-S. Shan, K. Arndt, M. Frank, R. E. Gordon, M. A. Gawinowicz, Y. Zhao, and D. R. Colman. 2001. 'The Presynaptic Particle Web', *Neuron*, 32: 63-77.
- Picher, M. M., A. M. Oprisoreanu, S. Jung, K. Michel, S. Schoch, and T. Moser. 2017. 'Rab Interacting Molecules 2 and 3 Directly Interact with the Pore-Forming CaV1.3 Ca(2+) Channel Subunit and Promote Its Membrane Expression', *Front Cell Neurosci*, 11: 160.

- Powell, C. M., S. Schoch, L. Monteggia, M. Barrot, M. F. Matos, N. Feldmann, T. C. Südhof, and E. J. Nestler. 2004. 'The Presynaptic Active Zone Protein RIM1 α Is Critical for Normal Learning and Memory', *Neuron*, 42: 143-53.
- Pulido, C., and A. Marty. 2017. 'Quantal Fluctuations in Central Mammalian Synapses: Functional Role of Vesicular Docking Sites', *Physiol Rev*, 97: 1403-30.
- Pulido, C., and T. A. Ryan. 2021. 'Synaptic vesicle pools are a major hidden resting metabolic burden of nerve terminals', *Sci Adv*, 7: eabi9027.
- Radhakrishnan, A., X. Li, K. Grushin, S. S. Krishnakumar, J. Liu, and J. E. Rothman. 2021. 'Symmetrical arrangement of proteins under release-ready vesicles in presynaptic terminals', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118.
- Rama, S., T. P. Jensen, and D. A. Rusakov. 2019. 'Glutamate Imaging Reveals Multiple Sites of Stochastic Release in the CA3 Giant Mossy Fiber Boutons', *Front Cell Neurosci*, 13: 243.
- Ramesh, N., M. J. F. Escher, M. M. Mampell, M. A. Böhme, T. W. B. Götz, P. Goel, T. Matkovic, A. G. Petzoldt, D. Dickman, and S. J. Sigrist. 2021. 'Antagonistic interactions between two Neuroligins coordinate pre- and postsynaptic assembly', *Current Biology*, 31: 1711-25.e5.
- Rebola, N., M. Carta, and C. Mülle. 2017. 'Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: implications for memory encoding', *Nat Rev Neurosci*, 18: 208-20.
- Rebola, N., M. Reva, T. Kirizs, M. Szoboszlay, A. Lorincz, G. Moneron, Z. Nusser, and D. A. DiGregorio. 2019. 'Distinct Nanoscale Calcium Channel and Synaptic Vesicle Topographies Contribute to the Diversity of Synaptic Function', *Neuron*, 104: 693-710 e9.
- Regehr, W. G. 2012. 'Short-term presynaptic plasticity', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4: a005702.
- Reshetniak, S., J. E. Ussling, E. Perego, B. Rammner, T. Schikorski, E. F. Fornasiero, S. Truckenbrodt, S. Koster, and S. O. Rizzoli. 2020. 'A comparative analysis of the mobility of 45 proteins in the synaptic bouton', *EMBO J*, 39: e104596.
- Reynolds, E. S. 1963. 'The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy', *J Cell Biol*, 17: 208-12.
- Rizzoli, S. O., and W. J. Betz. 2004. 'The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles', *Science*, 303: 2037-9.
- Rollenhagen, A., and J. H. Lübke. 2010. 'The mossy fiber bouton: the "common" or the "unique" synapse?', *Front Synaptic Neurosci*, 2: 2.
- Rollenhagen, A., K. Satzler, E. P. Rodriguez, P. Jonas, M. Frotscher, and J. H. Lübke. 2007. 'Structural determinants of transmission at large hippocampal mossy fiber synapses', *J Neurosci*, 27: 10434-44.
- Rostaing, P., E. Real, L. Siksou, J. P. Lechaire, T. Boudier, T. M. Boeckers, F. Gertler, E. D. Gundelfinger, A. Triller, and S. Marty. 2006. 'Analysis of synaptic ultrastructure without fixative using high-pressure freezing and tomography', *Eur J Neurosci*, 24: 3463-74.
- Rothman, J. E., S. S. Krishnakumar, K. Grushin, and F. Pincet. 2017. 'Hypothesis - buttressed rings assemble, clamp, and release SNAREpins for synaptic transmission', *FEBS Lett*, 591: 3459-80.
- Ruska, E. 1987. 'The Development of the Electron Microscope and of Electron Microscopy(Nobel Lecture)', *Angewandte Chemie International Edition in English*, 26: 595-605.
- Salin, P. A., M. Scanziani, R. C. Malenka, and R. A. Nicoll. 1996. 'Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 13304-9.
- Salio, C., L. Lossi, F. Ferrini, and A. Merighi. 2006. 'Neuropeptides as synaptic transmitters', *Cell Tissue Res*, 326: 583-98.

- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona. 2012. 'Fiji: an open-source platform for biological-image analysis', *Nat Methods*, 9: 676-82.
- Schoch, S., P. E. Castillo, T. Jo, K. Mukherjee, M. Geppert, Y. Wang, F. Schmitz, R. C. Malenka, and T. C. Sudhof. 2002. 'RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone', *Nature*, 415: 321-6.
- Schoch, S., T. Mittelstaedt, P. S. Kaeser, D. Padgett, N. Feldmann, V. Chevaleyre, P. E. Castillo, R. E. Hammer, W. Han, F. Schmitz, W. Lin, and T. C. Sudhof. 2006. 'Redundant functions of RIM1alpha and RIM2alpha in Ca(2+)-triggered neurotransmitter release', *EMBO J*, 25: 5852-63.
- Scoville, W. B., and B. Milner. 1957. 'Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions', *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 20: 11.
- Seabold, S. , and J. Perktold. 2010. "statsmodels: Econometric and statistical modeling with python." In.
- Siddig, S., S. Aufmkolk, S. Doose, M. L. Jobin, C. Werner, M. Sauer, and D. Calebiro. 2020. 'Super-resolution imaging reveals the nanoscale organization of metabotropic glutamate receptors at presynaptic active zones', *Sci Adv*, 6: eaay7193.
- Siksou, L., P. Rostaing, J. P. Lechaire, T. Boudier, T. Ohtsuka, A. Fejtova, H. T. Kao, P. Greengard, E. D. Gundelfinger, A. Triller, and S. Marty. 2007. 'Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix', *J Neurosci*, 27: 6868-77.
- Siksou, L., F. Varoqueaux, O. Pascual, A. Triller, N. Brose, and S. Marty. 2009. 'A common molecular basis for membrane docking and functional priming of synaptic vesicles', *Eur J Neurosci*, 30: 49-56.
- Simsek-Duran, F., D. J. Linden, and G. Lonart. 2004. 'Adapter protein 14-3-3 is required for a presynaptic form of LTP in the cerebellum', *Nat Neurosci*, 7: 1296-8.
- Snyder, J. S. 2019. 'Recalibrating the Relevance of Adult Neurogenesis', *Trends Neurosci*, 42: 164-78.
- Stigloher, C., H. Zhan, M. Zhen, J. Richmond, and J. L. Bessereau. 2011. 'The presynaptic dense projection of the *Caenorhabditis elegans* cholinergic neuromuscular junction localizes synaptic vesicles at the active zone through SYD-2/liprin and UNC-10/RIM-dependent interactions', *J Neurosci*, 31: 4388-96.
- Südhof, T. C. 2012. 'The presynaptic active zone', *Neuron*, 75: 11-25.
- Südhof, T. C. 2013. 'Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle', *Neuron*, 80: 675-90.
- Swanson, L. W., J. M. Wyss, and W. M. Cowan. 1978. 'An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat', *J Comp Neurol*, 181: 681-715.
- Szabadics, J., and I. Soltesz. 2009. 'Functional specificity of mossy fiber innervation of GABAergic cells in the hippocampus', *J Neurosci*, 29: 4239-51.
- Takamori, S., M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brugger, P. Ringler, S. A. Muller, B. Rammner, F. Gräter, J. S. Hub, B. L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmüller, J. Heuser, F. Wieland, and R. Jahn. 2006. 'Molecular anatomy of a trafficking organelle', *Cell*, 127: 831-46.
- Tan, C., S. S. H. Wang, G. de Nola, and P. S. Kaeser. 2022. 'Rebuilding essential active zone functions within a synapse', *Neuron*, 110: 1498-515 e8.
- Tanaka, K. A., K. G. Suzuki, Y. M. Shirai, S. T. Shibutani, M. S. Miyahara, H. Tsuboi, M. Yahara, A. Yoshimura, S. Mayor, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi. 2010. 'Membrane molecules mobile even after chemical fixation', *Nat Methods*, 7: 865-6.

- Tang, A. H., H. Chen, T. P. Li, S. R. Metzbower, H. D. MacGillavry, and T. A. Blanpied. 2016. 'A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors', *Nature*, 536: 210-4.
- Tansey, E. M. 2022. 'The synapse: people, words and connections', *Neuronal Signal*, 6: NS20220017.
- Toda, T., S. L. Parylak, S. B. Linker, and F. H. Gage. 2019. 'The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease', *Mol Psychiatry*, 24: 67-87.
- Trotter, J. H., J. Hao, S. Maxeiner, T. Tsetsenis, Z. Liu, X. Zhuang, and T. C. Sudhof. 2019. 'Synaptic neurexin-1 assembles into dynamically regulated active zone nanoclusters', *J Cell Biol*, 218: 2677-98.
- Tsetsenis, T., T. J. Younts, C. Q. Chiu, P. S. Kaeser, P. E. Castillo, and T. C. Sudhof. 2011. 'Rab3B protein is required for long-term depression of hippocampal inhibitory synapses and for normal reversal learning', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 14300-5.
- Tsuji, S. 2006. 'Rene Couteaux (1909-1999) and the morphological identification of synapses', *Biol Cell*, 98: 503-9.
- Uriu, Y., S. Kiyonaka, T. Miki, M. Yagi, S. Akiyama, E. Mori, A. Nakao, A. M. Beedle, K. P. Campbell, M. Wakamori, and Y. Mori. 2010. 'Rab3-interacting molecule gamma isoforms lacking the Rab3-binding domain induce long lasting currents but block neurotransmitter vesicle anchoring in voltage-dependent P/Q-type Ca²⁺ channels', *J Biol Chem*, 285: 21750-67.
- Vandael, D., C. Borges-Merjane, X. Zhang, and P. Jonas. 2020. 'Short-Term Plasticity at Hippocampal Mossy Fiber Synapses Is Induced by Natural Activity Patterns and Associated with Vesicle Pool Engram Formation', *Neuron*, 107: 509-21 e7.
- Vandael, D., Y. Okamoto, C. Borges-Merjane, V. Vargas-Barroso, B. A. Suter, and P. Jonas. 2021. 'Subcellular patch-clamp techniques for single-bouton stimulation and simultaneous pre- and postsynaptic recording at cortical synapses', *Nat Protoc*, 16: 2947-67.
- Vandael, D., Y. Okamoto, and P. Jonas. 2021. 'Transsynaptic modulation of presynaptic short-term plasticity in hippocampal mossy fiber synapses', *Nat Commun*, 12: 2912.
- Vyleta, N. P., and P. Jonas. 2014. 'Loose coupling between Ca²⁺ channels and release sensors at a plastic hippocampal synapse', *Science*, 343: 665-70.
- Wagh, D. A., T. M. Rasse, E. Asan, A. Hofbauer, I. Schwenkert, H. Durrbeck, S. Buchner, M. C. Dabauvalle, M. Schmidt, G. Qin, C. Wichmann, R. Kittel, S. J. Sigrist, and E. Buchner. 2006. 'Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*', *Neuron*, 49: 833-44.
- Waites, C. L., and C. C. Garner. 2011. 'Presynaptic function in health and disease', *Trends Neurosci*, 34: 326-37.
- Wang, S. S. H., R. G. Held, M. Y. Wong, C. Liu, A. Karakhanyan, and P. S. Kaeser. 2016. 'Fusion Competent Synaptic Vesicles Persist upon Active Zone Disruption and Loss of Vesicle Docking', *Neuron*, 91: 777-91.
- Wang, Y., X. Liu, T. Biederer, and T. C. Sudhof. 2002. 'A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: Implications for the genesis of synaptic active zones', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 14464-9.
- Wang, Y., M. Okamoto, F. Schmitz, K. Hofmann, and T. C. Sudhof. 1997. 'Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion', *Nature*, 388: 593-8.
- Wang, Y., and T. C. Südhof. 2003. 'Genomic definition of RIM proteins: evolutionary amplification of a family of synaptic regulatory proteins☆☆Sequence data from this article have been deposited with the GenBank Data Library under Accession Nos. AF548738 and AF548739', *Genomics*, 81: 126-37.

- Wang, Y., S. Sugita, and T. C. Südhof. 2000. 'The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins', *J Biol Chem*, 275: 20033-44.
- Watanabe, S., Q. Liu, M. W. Davis, G. Hollopeter, N. Thomas, N. B. Jorgensen, and E. M. Jorgensen. 2013. 'Ultrafast endocytosis at Caenorhabditis elegans neuromuscular junctions', *Elife*, 2: e00723.
- Watanabe, S., B. R. Rost, M. Camacho-Perez, M. W. Davis, B. Sohl-Kielczynski, C. Rosenmund, and E. M. Jorgensen. 2013. 'Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses', *Nature*, 504: 242-47.
- Weimer, R. M. 2006. 'Preservation of C. elegans tissue via high-pressure freezing and freeze-substitution for ultrastructural analysis and immunocytochemistry', *Methods Mol Biol*, 351: 203-21.
- Weimer, R. M., E. O. Gracheva, O. Meyrignac, K. G. Miller, J. E. Richmond, and J. L. Bessereau. 2006. 'UNC-13 and UNC-10/rim localize synaptic vesicles to specific membrane domains', *J Neurosci*, 26: 8040-7.
- Werner, C., M. Sauer, and C. Geis. 2021. 'Super-resolving Microscopy in Neuroscience', *Chem Rev*, 121: 11971-2015.
- Wichmann, C., and T. Kuner. 2022. 'Heterogeneity of glutamatergic synapses: cellular mechanisms and network consequences', *Physiol Rev*, 102: 269-318.
- Wilke, S. A., J. K. Antonios, E. A. Bushong, A. Badkoobehi, E. Malek, M. Hwang, M. Terada, M. H. Ellisman, and A. Ghosh. 2013. 'Deconstructing complexity: serial block-face electron microscopic analysis of the hippocampal mossy fiber synapse', *J Neurosci*, 33: 507-22.
- Witter, M. P. 2007. 'The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus', *Prog Brain Res*, 163: 43-61.
- Wong, M. Y., C. Liu, S. S. H. Wang, A. C. F. Roquas, S. C. Fowler, and P. S. Kaeser. 2018. 'Liprin-alpha3 controls vesicle docking and exocytosis at the active zone of hippocampal synapses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: 2234-39.
- Wu, X., Q. Cai, Z. Shen, X. Chen, M. Zeng, S. Du, and M. Zhang. 2019. 'RIM and RIM-BP Form Presynaptic Active-Zone-like Condensates via Phase Separation', *Mol Cell*, 73: 971-84 e5.
- Xuan, Z., L. Manning, J. Nelson, J. E. Richmond, D. A. Colon-Ramos, K. Shen, and P. T. Kurshan. 2017. 'Clarinet (CLA-1), a novel active zone protein required for synaptic vesicle clustering and release', *Elife*, 6.
- Zarebidaki, F., M. Camacho, M. M. Brockmann, T. Trimbuch, M. A. Herman, and C. Rosenmund. 2020. 'Disentangling the Roles of RIM and Munc13 in Synaptic Vesicle Localization and Neurotransmission', *J Neurosci*, 40: 9372-85.
- Zhai, R. G., and H. J. Bellen. 2004. 'The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal', *Physiology (Bethesda)*, 19: 262-70.
- Zhang, M., and G. J. Augustine. 2021. 'Synapsins and the Synaptic Vesicle Reserve Pool: Floats or Anchors?', *Cells*, 10.
- Zhao, C., W. Deng, and F. H. Gage. 2008. 'Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis', *Cell*, 132: 645-60.
- Zhao, S., D. Studer, X. Chai, W. Graber, N. Brose, S. Nestel, C. Young, E. P. Rodriguez, K. Saetzler, and M. Frotscher. 2012. 'Structural plasticity of hippocampal mossy fiber synapses as revealed by high-pressure freezing', *J Comp Neurol*, 520: 2340-51.
- Zieger, H. L., and D. Choquet. 2021. 'Nanoscale synapse organization and dysfunction in neurodevelopmental disorders', *Neurobiol Dis*, 158: 105453.
- Zuber, B., and V. Lucic. 2022. 'Neurons as a model system for cryo-electron tomography', *J Struct Biol X*, 6: 100067.

8 Appendix

8.1 Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
4k	Bildaufflösung von 4000 Pixeln
ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Aktive Zone
BStr	<i>Bootstrapping</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CA3h	hilärer Anteil der CA3-Region
cam	Kamera
CAZ	Cytomatrix der Aktiven Zone
Ca ²⁺	Calciumion
c.o.m.	<i>center of mass</i>
d	Distanz
DCV	<i>dense-core vesicle</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DDSA	Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid
DMP-30	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol
dSTORM	<i>direct stochastic optical reconstruction microscopy</i>
DG	<i>Gyrus dentatus</i>
EDM	elektronendichtes Material
ELKS	<i>protein rich in the amino acids E, L, K and S</i>
EM	Elektronenmikroskopie
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
ET	Elektronentomographie
FF	<i>frequency facilitation</i>
FIB-SEM	<i>focused ion beam scanning electron microscopy</i>
FS	<i>freeze substitution</i>
HPF	<i>high-pressure freezing</i>

GA	Glutaraldehyd
GC	<i>granule cell</i>
h	<i>hour</i> (Stunde)
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
K	Kelvin
KCl	Kaliumchlorid
KO	<i>knock-out</i>
KW	Kruskal-Wallis
LCV	<i>large-clear vesicle</i>
LMM	<i>linear-mixed modeling</i>
LN ₂	<i>liquid nitrogen</i>
LTP	<i>long-term plasticity</i>
M	Mitochondrium, Molar
max.	maximal
MF	Moosfasern
MFB	Moosfaserbouton
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	minimal
mito.	mitochondrial
MNA	Methylnadinsäureanhydrid
mM	Milimolar
Munc13	<i>mammalian homolog of C. elegans uncoordinated gene 13</i>
N, n	<i>number of</i> (Anzahl)
N/A	<i>not applicable</i> (nicht zutreffend)
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMJ	<i>neuromuscular junction</i> (Neuromuskuläre Endplatte)
NN	<i>nearest neighbour</i> (nächste Nachbarn)
NT	Neurotransmitter
OsO ₄	Osmiumtetroxid
p	<i>probability value</i> (Wahrscheinlichkeitswert)

PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PM	Plasmamembran
post	postsynaptisch
PPF	<i>paired-pulse facilitation</i>
P _r	<i>release probability</i> (Freisetzungswahrscheinlichkeit)
prä	präsynaptisch
PSD	postsynaptische Dichte
PSF	postsynaptische Filamente
PT	Probenträger
PVP	Polyvinylpyrrolidon
px	Pixel
PxxP	<i>proline enriched region</i>
Rel.	relativ
RIM	<i>Rab3 interacting molecule</i>
RIM-BP	<i>Rab3 interacting molecule binding protein</i>
RRP	<i>readily releasable pool</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SBF-SEM	<i>serial block-face scanning electron microscopy</i>
SCV	<i>small-clear vesicle</i>
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SH	<i>src homology</i>
SM-like	<i>Sec1/Munc18-like</i>
SNARE	<i>soluble NSF attachment receptor</i>
STED	<i>stimulated emission depletion</i>
STEM	<i>scanning transmission electron microscopy</i>
STP	<i>short-term plasticity</i>
SV	synaptischer Vesikel
syn.	synaptisch
S413	Serin413
T	Temperatur
TA	<i>tannic acid</i> (Tanninsäure)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop

TIRF	<i>total internal reflection fluorescence</i>
UA	Uranylacetat
UCF	<i>unbiased counting frame</i>
VGCC	<i>voltage gated calcium channel</i>
WT	Wildtyp
W t-Test	t-Test nach Welch
Zn-F	Zinkfingerdomäne
µm	Mikrometer
Ø	Durchmesser

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Die Ultrastruktur einer chemischen Synapse im zentralen Nervensystem der Maus.....	7
Abbildung 2. Ablauf der synaptischen Transmission an einer synaptischen Terminalen.	9
Abbildung 3. Präsynaptische Aktive Zonen.	11
Abbildung 4. RIM-Isoformen des Säugers.....	15
Abbildung 5. Der trisynaptische Schaltkreis des Hippocampus.	20
Abbildung 6. Synaptische Terminalen des hippocampalen Moosfasertraktes.	22
Abbildung 7. Experimentelle Abläufe zur Untersuchung der Aktiven Zonen des großen MFBs in RIM1 $\alpha^{-/-}$ und RIM1 $\alpha^{+/+}$	35
Abbildung 8. Präparation der Probenträger für die Hochdruckgefrierung.	37
Abbildung 9. Probenvorbereitung für die Gefriersubstitutionsmaschine.	39
Abbildung 10. Flacheinbettung der Hippocampusproben.	41
Abbildung 11. Gezielte Ultramikrotomie einer Hippocampusprobe.....	42
Abbildung 12. Gefrierschäden bei hippocampalen HPF/FS-Proben.	45
Abbildung 13. Der synaptische Spalt als 3D-IMOD-Objekt.....	49
Abbildung 14. 2D-Stereologie zur Quantifizierung der mitochondrialen Fläche.	50
Abbildung 15. Strukturhaltung von hippocampalen Moosfaserboutons in Aldehydbasierten Fixationen.....	53
Abbildung 16. Ultrastrukturelle Organisation des SV-Pools in Aldehyd-fixierten hippocampalen MFBs.	54
Abbildung 17. Ultrastruktur der AZ in Aldehyd-fixierten hippocampalen MFBs.	55
Abbildung 18. Elektronentomographie der AZ in Aldehyd-fixierten hippocampalen MFBs.	56
Abbildung 19. Strukturhaltung von hippocampalen Moosfaserboutons in HPF/FS-behandelten akuten Hirnschnitten.	57
Abbildung 20. Hochwertige Qualität der AZ-Ultrastruktur in hippocampalen MFBs von RIM1 $\alpha^{+/+}$ und RIM1 $\alpha^{-/-}$	59
Abbildung 21. RIM1 $\alpha^{+/+}$ -Modelle der AZ-Membran in hippocampalen MFBs.	61
Abbildung 22. RIM1 $\alpha^{-/-}$ -Modelle der AZ-Membran in hippocampalen MFBs.	62
Abbildung 23. Zunahme der AZ-Membranfläche in RIM1 $\alpha^{-/-}$	63
Abbildung 24. Zunahme der 2D AZ-Profillänge und max. Ausdehnung der AZ-Membran in RIM1 $\alpha^{-/-}$	64
Abbildung 25. Höhen- und Volumenzunahme des synaptischen Spaltes in RIM1 $\alpha^{-/-}$...	66
Abbildung 26. Akkumulation von Mitochondrien an RIM1 $\alpha^{-/-}$ AZs.....	67
Abbildung 27. Quantifizierung der mitochondrialen 2D-Flächen in beiden Genotypen.	68
Abbildung 28. Hochaufgelöste 3D-Visualisierung von synaptischen Vesikeln in AZs des hippocampalen MFBs.	70
Abbildung 29. Reduziertes SV- <i>Docking</i> in RIM1 $\alpha^{-/-}$	71
Abbildung 30. Distanzzunahme der perisynaptischen SVs in 0-10 nm Distanz zur Plasmamembran in RIM1 $\alpha^{-/-}$	72
Abbildung 31. Reduziertes elektronendichtes Material an eng gedockten SVs in RIM1 $\alpha^{-/-}$	74
Abbildung 32. Die Geometrie des eng gedockten SV-Pools in AZs des hippocampalen MFBs.	75
Abbildung 33. Delokalisation des eng gedockten SV-Pools in RIM1 $\alpha^{-/-}$	77
Abbildung 34. Reduktion des SV-Pools in RIM1 $\alpha^{-/-}$	79
Abbildung 35. Positive Korrelation der AZ-Membranfläche und der Größe des SV-Pools in beiden Genotypen.....	80
Abbildung 36. Veränderte 3D-Organisation des SV-Pools in RIM1 $\alpha^{-/-}$	81

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Experimentelle Schritte zur Gefriersubstitution in der AFS-Maschine.	40
Tabelle 2. Zusammenfassung der numerischen und statistischen Werte zu AZ-Membranflächen in beiden Genotypen	65
Tabelle 3. Zusammenfassung der numerischen und statistischen Werte der 2D-Flächen von Mitochondrien in beiden Genotypen.	69
Tabelle 4. Zusammenfassung der numerischen und statistischen Werte der NN-Distanzen des eng gedockten SV-Pools in beiden Genotypen.....	78
Tabelle 5. Zusammenfassung der numerischen und statistischen Werte der SV-Pools (0-200 nm) in beiden Genotypen.	82

8.4 Appendix

8.4.1 Programmierskripte

Lizenz

This code is intended to analyze coordinates of presynaptic active zones extracted from IMOD models (for information on how to install and use the code see README).

Copyright (C) 2022 Katharina Lichter, Philip Kollmannsberger

This program is free software: you can redistribute it and/or modify it under the terms of the GNU General Public License as published by the Free Software Foundation, either version 3 of the License, or (at your option) any later version.

This program is distributed in the hope that it will be useful, but WITHOUT ANY WARRANTY; without even the implied warranty of MERCHANTABILITY or FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. See the GNU General Public License for more details.

You should have received a copy of the GNU General Public License along with this program. If not, see <<https://www.gnu.org/licenses/>>.

README

This code is intended to support 3D coordinate analysis for IMOD model output of pre-synaptic active zones in giant hippocampal mossy fiber boutons. IMOD models are based on electron tomograms which were reconstructed using the IMOD software. For further details including how to create IMOD model output please visit <https://bio3d.colorado.edu/imod/>.

To use the code please follow the instructions in this file and the selected notebook.

- 1. download Anaconda (<https://www.anaconda.com/distribution/#download-section>).*
- 2. open Anaconda prompt and create new environment.*

```
conda create --name lichtert_tomo-active-zones
```

activate new environment.

```
conda activate lichtert_tomo-active-zones
```

install some dependencies.

```
conda install jupyter scikit-learn sklearn numpy scipy shapely statsmodels
```

start jupyter notebook from Anaconda prompt. navigate to and select one of the four notebooks. follow the instructions in the notebook to analyze the exemplary text files (az-test_area/sv-pool/docked-sv-pool).

Python Codebook – LMM und Bootstrapping

Inter-animal variability of giant MFB AZ area measurements - Linear Mixed Model with Bootstrapping

code authors: katharina lichter, philip kollmannsberger, university and university hospital of wuerzburg, 2022.

this code is used in the manuscript "Ultrastructural analysis of wildtype and RIM1 α knock-out active zones in a large cortical synapse" by k lichter, mm paul, m pauli, s schoch, p kollmannsberger, c stigloher, m heckmann, a-l sirén, 2022.

Import all relevant packages and disable warnings:

```
import numpy as np
import pandas as pd
import seaborn as sns
import os
import matplotlib.pyplot as plt
import statsmodels.api as sm
import dabest
import multiprocessing as mp
import random

import warnings
warnings.simplefilter('ignore')
```

Define a function to load data from Excel file:

```
def load_dataset(directory):
    curr_path = os.getcwd();
    os.chdir(directory);

    alldata = pd.read_excel('lichter-et-al_az-area_animal-variability.xlsx', header=0, usecols='B:G')

    ko1 = pd.DataFrame.from_dict({'animal': 'KO_1', 'grp': 1, 'area': alldata['RIM1a-KO_1']})
    ko2 = pd.DataFrame.from_dict({'animal': 'KO_2', 'grp': 1, 'area': alldata['RIM1a-KO_2']})
    ko3 = pd.DataFrame.from_dict({'animal': 'KO_3', 'grp': 1, 'area': alldata['RIM1a-KO_3']})

    wt1 = pd.DataFrame.from_dict({'animal': 'WT_1', 'grp': 0, 'area': alldata['RIM1a-WT_1']})
    wt2 = pd.DataFrame.from_dict({'animal': 'WT_2', 'grp': 0, 'area': alldata['RIM1a-WT_2']})
    wt3 = pd.DataFrame.from_dict({'animal': 'WT_3', 'grp': 0, 'area': alldata['RIM1a-WT_3']})

    ko = ko1.append(ko2.append(ko3))
    wt = wt1.append(wt2.append(wt3))

    data = ko.append(wt).dropna()

    # change index to line numbers
    data.reset_index(inplace=True)

    os.chdir(curr_path);

    return data
```

Load dataset:

```
df = load_dataset('.')
df
```

	index	animal	grp	area
0	0	KO_1	1	0.094337
1	1	KO_1	1	0.101795
2	2	KO_1	1	0.211067
3	3	KO_1	1	0.097947
4	4	KO_1	1	0.056090
...
57	5	WT_3	0	0.045195
58	6	WT_3	0	0.041756
59	7	WT_3	0	0.061615
60	8	WT_3	0	0.070826
61	9	WT_3	0	0.105931

62 rows \times 4 columns

2) Estimation statistics for $n = \text{animal}$

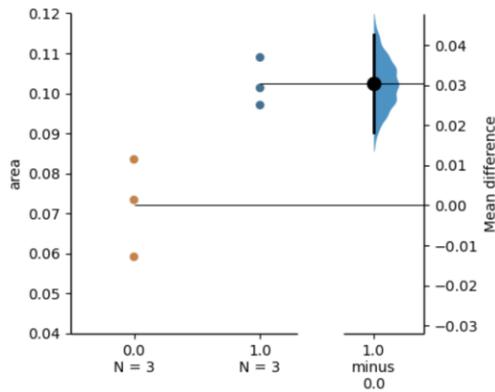
Consider animal as n and perform estimation statistics on the medians of the animals. This approach is underpowered and likely underestimates the effect, because pooling the results of individual animals before applying statistical tests discards much of the information in the data. In addition, the different animals contain different numbers of AZs, and pooling their means or medians might not lead to reliable statistical estimates.

```

data = df.groupby("animal").median();
data = data.astype({'grp': 'string'})

dabest_area = dabest.load(data=data, x="grp", y="area", idx=("0.0", "1.0"))
dabest_area.mean_diff.plot(swarm_ylim=(0.04, 0.12));

```



3) Linear Mixed Model

In the second step, we fit a linear mixed model to the data, treating deficiency of RIM1a (RIM1a-KO) as fixed effect and the differences between animals as random effect. This approach both corrects for inter-animal variability and avoids the problem of pooling by using all data points for fitting.

First, select which parameter to fit:

```
param = "area"
```

Fit a linear mixed model to the full dataset and show the summary:

```

# variance component formula: animal variability as random effect
vcf = []
vcf = {"animal": "0+C(animal)"}
oo = np.ones(df.shape[0])

model = []
model = sm.MixedLM.from_formula(f"{param} ~ grp", vc_formula=vcf, groups=oo, re_formula="1", data=df).fit()
model.summary()

```

Model:	MixedLM	Dependent Variable:	area
No. Observations:	62	Method:	REML
No. Groups:	1	Scale:	0.0020
Min. group size:	62	Log-Likelihood:	97.4289
Max. group size:	62	Converged:	Yes
Mean group size:	62.0		

	Coef.	Std.Err.	z	P> z	[0.025	0.975]
Intercept	0.077	0.046	1.684	0.092	-0.013	0.167
grp	0.036	0.011	3.127	0.002	0.013	0.058
Group Var	0.002	1387074.411				
animal Var	0.000					

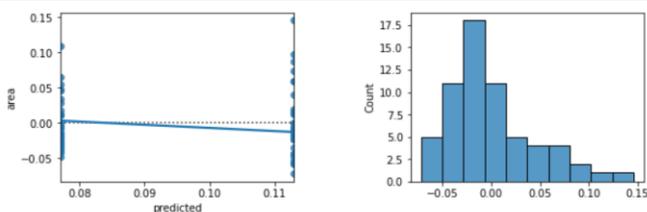
Look at the residuals:

```

res = pd.DataFrame()
res["predicted"] = model.fittedvalues
res[param] = df[param]

f, ax = plt.subplots(nrows=1, ncols=2, figsize=(10, 3), gridspec_kw={'wspace': 0.5});
sns.residplot(x = "predicted", y = param, data = res, lowess=True, ax=ax.flat[0]);
sns.histplot(model.resid.values, ax=ax.flat[1]);

```



4) Bootstrapping

To determine confidence intervals of the model coefficients, use bootstrapping of resampled data (10000 repetitions), and derive p values from the confidence intervals of the estimate.

First, define a function to perform k=100 bootstraps:

```
def get_bootstrap(f=f"{param}~grp", g="animal", df=df, k=100):
    r = np.zeros(k)
    np.random.seed()
    vcf = []
    vcf = {"animal": "0+animal"}
    oo = np.ones(df.shape[0])
    for i in range(k):
        model = []
        s = df.groupby(g).sample(frac=1,replace=True);
        s.reset_index(inplace=True);
        model = sm.MixedLM.from_formula(f, groups=oo, vc_formula=vcf, re_formula="1", data=s).fit()
        r[i] = model.params.grp
    return r
```

Run 100 processes with 100 bootstraps each using all available cores:

```
samp = []
pool = mp.Pool(mp.cpu_count())

future_res = [pool.apply_async(get_bootstrap) for i in range(100)]

res = [f.get() for f in future_res]
pool.close()

samp = np.array(res).flatten()
```

Show the results:

```
est = np.mean(samp)
l = np.percentile(samp, 2.5)
u = np.percentile(samp, 97.5)
SE = (u-l)/(2*1.96)
z = np.sign(est)*est/SE
p = np.exp(-0.717*z-0.416*z*z)
print(f'Results for {param}:\n');
print('LMM: {0:.3f}\n\nBootstrap: {1:.3f}\n(0.025) {2:.3f}\n(0.975) {3:.3f}\nnp = {4:.3f}'.format(model.params[1],est,l,u,p))
```

Results for area:

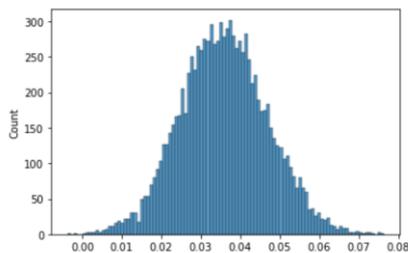
LMM: 0.036

Bootstrap: 0.036
(0.025) 0.015
(0.975) 0.058

p = 0.001

```
sns.histplot(samp, bins=100)
```

<AxesSubplot:ylabel='Count'>



5) Random swapping of labels

Assess the validity of the bootstrapping results by randomly swapping group labels between animals: define a new bootstrap function on the randomized labels. Random swapping is performed every 100 bootstraps; the resulting overall coefficient should be close to zero.

```
def get_swap_bootstrap(f=f"{param}~rgrp", g="animal", df=df, k=100):
    r = np.zeros(k)
    np.random.seed()
    vcf = []
    vcf = {"animal": "0+animal"}
    oo = np.ones(df.shape[0])

    # get random permutation of Labels
    a = df.groupby("animal").grp.max().values
    np.random.shuffle(a)

    # assign random Labels to new column "rgrp":
    for i, key in enumerate(df["animal"].unique()):
        df.loc[df["animal"].str.contains(key), 'rgrp'] = a[i]

    for i in range(k):
        model = []
        s = df.groupby(g).sample(frac=1, replace=True);
        s.reset_index(inplace=True);
        model = sm.MixedLM.from_formula(f, groups=oo, vc_formula=vcf, re_formula="1", data=s).fit()
        r[i] = model.params.rgrp
    return r
```

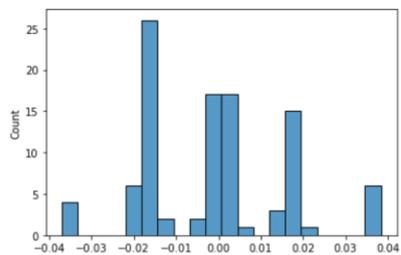
Run 100 processes with 100 bootstraps each using all available cores:

```
rand_samp = []
pool = mp.Pool(mp.cpu_count())
future_res = [pool.apply_async(get_swap_bootstrap) for i in range(100)]
res = [f.get() for f in future_res]
pool.close()
rand_samp = np.array(res).mean(axis=1)
```

Plot histogram of means of all randomized coefficients:

```
rand_samp = np.array(res).mean(axis=1)
sns.histplot(rand_samp, bins=20)
np.mean(rand_samp)
```

-1.3487729084093827e-03



Python Codebook – Analyse der geometrischen Position eng gedockter SVs

```
## code authors: katharina Lichter, philip kollmannsberger, university and university hospital of wuerzburg, 2022.

## this code is used in the manuscript "Ultrastructural analysis of wildtype and RIM1a knock-out active zones in a large cortical synapse"
## by k Lichter, mm paul, m pauli, s schoch, p kollmannsberger, c stigloher, m heckmann, a-l sirén, 2022.

## notebook for calculation of synaptic vesicle (SV) distances to the active zone (AZ) center of mass (com) and AZ edges.

# please import relevant python packages via anaconda navigator or anaconda prompt.

import numpy as np
import math as math
import scipy as sp
from scipy.spatial import distance
from shapely.geometry import LineString, MultiPoint, Point
from shapely.ops import transform, split

#####

## please import active zone information which is extracted from individual IMOD models (https://bio3d.colorado.edu/imod/).
## please note that coordinate data are provided in text files. in case of SV data, the SV radius represents a separate column.

# step 1: Load the coordinates.
pts = np.loadtxt(fname = 'az-test_docked-sv-pool.txt', usecols = [1,2,3,4,5,6,7]);
linepts = np.loadtxt(fname = 'az-test_area.txt', usecols = [1,2,3,4,5,6]);

# step 2: add the pixel size of the tomogram. this information can be found in your original tilt series.
px_factor = 0.287

## step 3: distance calculations to AZ com and AZ edge(s).
# calculation of mean coordinate for x, y and z.
AZ_com_x = np.mean(linepts[:,3])
AZ_com_y = np.mean(linepts[:,4])
AZ_com_z = np.mean(linepts[:,5])

# definition of AZ com as 3D point.
AZ_com = Point(AZ_com_x, AZ_com_y, AZ_com_z);

# loop for distance calculation.
for z in np.unique(pts[:,5]):

    z_value = np.array(z)
    linepts_z = linepts[linepts[:,5]==z,:];

    if linepts_z.shape[0]>0:

        line = LineString(linepts_z[:,3:5])
        pts_z = pts[pts[:,5]==z,:];
        vesicle = MultiPoint(pts_z[:,3:5])

# projection of 3D vesicle centers onto the AZ membrane.

    for p in list(vesicle):

        proj_p = Point(line.interpolate(line.project(p)))
        print(proj_p)
        np_proj_p = np.array(proj_p)
        proj_p_3D = transform(lambda x, y: (x, y, z_value), proj_p)

        np_line_coords = np.array(line.coords)
        np_line_coords_y = np_line_coords[:,1]

# integration of projected 3D vesicle centers into the AZ line profile.

        index_in_line = (min(range(len(np_line_coords_y)), key=lambda i: abs(np_line_coords_y[i]-np_proj_p[1])))
        np_new_line = np.insert(np_line_coords, index_in_line, np_proj_p, axis=0)
        new_line = LineString(np_new_line)
        print(new_line)

## distance calculation of projected 3D vesicle centers alongside the individual AZ membrane profile to both AZ edges (2D).
point_to_edge = split(new_line, proj_p)
line_split_1 = point_to_edge[0]
line_split_2 = point_to_edge[1]

# calculation of absolute distances.
az_edge_1 = (line_split_1.length) * px_factor
print(az_edge_1)
az_edge_2 = (line_split_2.length) * px_factor
print(az_edge_2)

# calculation of relative distances (normalized to individual AZ profile length).
az_edge_factor_1 = line_split_1.length / new_line.length
print(az_edge_factor_1)
az_edge_factor_2 = line_split_2.length / new_line.length
print(az_edge_factor_2)

# 3D distance of projected 3D vesicle centers to the AZ com.
distance_com = (math.sqrt((proj_p_3D.x - AZ_com.x)**2 + (proj_p_3D.y - AZ_com.y)**2 + (proj_p_3D.z - AZ_com.z)**2)) * px_factor
print(distance_com)
```

Python Codebook – Euklidische Distanz des SVs zur AZ-Membran

```
## code authors: katharina lichter, philip kollmannsberger, university and university hospital of wuerzburg, 2022.

## this code is used in the manuscript "Ultrastructural analysis of wildtype and RIM1a knock-out active zones in a large cortical synapse"
## by k lichter, mm paul, m pauli, s schoch, p kollmannsberger, c stigloher, m heckmann, a-l strén, 2022.

## notebook for calculation of euclidean synaptic vesicle (SV) distances to the active zone (AZ) membrane.

# please import relevant python packages via anaconda navigator or anaconda prompt.

import numpy as np
import scipy as sp
import shapely.geometry as geom
from scipy.spatial import distance

#####

## please import active zone (AZ) information which is extracted from individual IMOD models (https://bio3d.colorado.edu/imod/).
## please note that coordinate data are provided in text files. in case of SV data, the SV radius represents a separate column.

# step 1: Load the coordinates.
np.set_printoptions(threshold=np.inf);
linepts = np.loadtxt(fname = 'az-test_area.txt', usecols = [1,2,3,4,5,6]);
pts = np.loadtxt(fname = 'az-test_sv-pool.txt', usecols = [1,2,3,4,5,6,7]);

# step 2: add the pixel size of the tomogram. this information can be found in your original tilt series.
px_factor = 0.287

## step 3: calculation of euclidean distances of the outer SV membrane to the presynaptic AZ membrane.
# definition of calculation loop.
for z in np.unique(pts[:,5]):
    z_value = np.array(z)
    linepts_z = linepts[linepts[:,5]==z,:];

# definition of individual 3D SV centers and of corresponding presynaptic AZ membrane.
if linepts_z.shape[0]>0:
    line = geom.LineString(linepts_z[:,3:5])
    pts_z = pts[pts[:,5]==z,:]
    vesicle = geom.MultiPoint(pts_z[:,3:5])
    for p in list(vesicle):
        r = pts_z[:,6]
# euclidean calculation for more than one 3D vesicle center with the same z coordinate.
if r.shape[0]>1:
    D1 = (line.distance(p) * px_factor) - r
    SVdistance = np.append(z_value, D1)
    print(SVdistance, file = open("az-test_sv-pool_dist_1.txt", "a"))
# euclidean calculation for 3D vesicle centers with unique z coordinate.
else:
    D2 = (line.distance(p) * px_factor) - r
    SVdistance = np.append(z_value, D2)
    print(SVdistance, file = open("az-test_sv-pool_dist_2.txt", "a"))
```

Python Codebook – Distanzanalyse der *nearest neighboring* (NN)-SVs in 3D

```
## code authors: katharina Lichter, philip kollmannsberger, university and university hospital of wuerzburg, 2022.

## this code is used in "Ultrastructural analysis of wildtype and RIM1a knock-out active zones in a large cortical synapse"
## by k Lichter, mm paul, m pauli, s schoch, p kollmannsberger, c stigloher, m heckmann, a-l sirén

## notebook for calculation of nearest neighbour (NN) distances in the synaptic vesicle (SV) pool

# please import relevant python packages via anaconda navigator or anaconda prompt.
import numpy as np
import math as math
import scipy as sp
from shapely.geometry import LineString, MultiPoint, Point
from scipy.spatial import distance
from sklearn import neighbors
from sklearn.neighbors import NearestNeighbors

#####

## please import active zone (AZ) information which is extracted from individual IMOD models (https://bio3d.colorado.edu/imod/).
## please note that coordinate data are provided in text files. in case of SV data, the SV radius represents a separate column.

# step 1: Load the coordinates.

pts = np.loadtxt(fname = 'az-test_sv-pool.txt', usecols = [1,2,3,4,5,6,7]);
linepts = np.loadtxt(fname = 'az-test_area.txt', usecols = [1,2,3,4,5,6]);

# step 2: add the pixel size of the tomogram. this information can be found in your original tilt series.
px_factor = 0.287

## step 3: calculation of NN euclidean distances within the SV pool.
## calculation of euclidean distances from each SV to all other SVs

r = np.array(pts[:,6])
repetitions = r.size
```

```
rarray = np.reshape(r, (repetitions, 1))

rmatrix1 = np.tile(rarray, repetitions)
rmatrix2 = np.tile(r,(repetitions, 1))

scale = np.tile(np.array(px_factor), (repetitions, repetitions))

vesicle = MultiPoint(pts[:,3:6]);

D = distance.squareform(distance.pdist(vesicle));

rmatrix = np.add(rmatrix1, rmatrix2)
nearest = np.multiply(np.subtract(D, rmatrix), scale)

# individual distance matrices for each SV
dnearest = np.where(nearest<0, 0, nearest);
(dnearest)

# calculation of the 5 nearest neighbouring SVs (index, absolute distance)
nn = NearestNeighbors(n_neighbors=6, metric='precomputed')
nn.fit(dnearest)

distances, indexes = nn.kneighbors(dnearest)

np.set_printoptions(threshold=np.inf)

knearest = nn.kneighbors(dnearest)

with open("az-test_kn5_index.txt", 'w') as f:
    print(knearest, file=f)

print('')

with open("az-test_kn5_dist.txt", 'w') as f:
    print(distances, file=f)
```

8.4.2 Fixationsprotokolle

Klassische Aldehyd-basierte Fixation für TEM I

Kurzversion

Karnovsky-Fixans:

0,15 M Cacodylatpuffer (CaP) (pH 6,9), 2,5% Glutaraldehyd (GA), 2% Paraformaldehyd (PFA) + 2 mM CaCl₂

Vorspüllösung:

0,9% NaCl in ddH₂O + 0,66 ml/100 ml

Vorgehen:

1. Perfusion der Mäuse in tiefer Anästhesie, Dekapitation und Postfixation in Karnovsky-Fixans über Nacht bei 4°C (durchgeführt von M. Pauli und A.-L. Sirén)
2. Präparation des Gehirns und Überführung in 0,15 M CaP (pH 6,9) und 2 mM CaCl₂
3. Herstellung der 100 µm dicken Vibratomschnitte (horizontal) in 0,15 M CaP (pH 6,9) und 2 mM CaCl₂
4. Weiterführend siehe Tabelle:

Experiment	Lösung	Temperatur	Dauer
Waschvorgang	0,15 M CaP (pH 6,9)	4°C	3 x 10 min
Inkubation	1% OsO ₄ in 0,1 M CaP (pH 6,9)	RT	1 h
Waschvorgang	0,1 M CaP (pH 6,9)	RT	10 min
Waschvorgang	ddH ₂ O	RT	2 x 10 min
Inkubation	ddH ₂ O	4°C	über Nacht
Inkubation	30%, 50%, 70% Ethanol	4°C	je 15 min
	2% UA in 70% Ethanol	RT	1 h
	70%, 80%, 90%, 96%, 2 x 100% Ethanol	RT	je 15 min
	Propylenoxid (PO)	RT	2 x 30 min
	Verhältnis Epon zu PO 1:1	RT	über Nacht
	Epon	RT	2 x 2 h
Flacheinbettung der Probe			
Polymerisation	Epon	60°C	48 h

Klassische Aldehyd-basierte Fixation für TEM II - nach Sanford Louis Palay und Victoria Chan-Palay (*Cerebellar Cortex*, 1974, S. 326-28)

Kurzversion

Fixans:

1% PFA, 1% GA, in 0,12 M Phosphatpuffer und 0,02 mM CaCl₂

Vorspüllösung:

0,9% NaCl in ddH₂O + 0,66 ml/100 ml

Weitere Ansätze:

0,4 M Standard-Phosphatpuffer, Spüllösung (*rinse solution*) (0,12 M Phosphatpuffer, 0,02 mM CaCl₂, 8% Dextrose, *double-strength buffer* (siehe Originalpublikation), 2% OsO₄ in 0,12 M Phosphatpuffer + 7 % Dextrose

Vorgehen:

1. Perfusion der Mäuse in tiefer Anästhesie, Dekapitation und Postfixation in Fixans über Nacht bei 4°C (durchgeführt von M. Pauli und A.-L. Sirén)
2. Präparation des Gehirns und Überführung in Spüllösung
3. Herstellung der 300 µm dicken Vibratomschnitte (horizontal) in der Spüllösung
4. Weiterführende Schritte sind der folgenden Auflistung zu entnehmen:

Protokollschritt	Lösung	Temperatur	Dauer
Inkubation	2% OsO ₄ in 0,12 M Phosphatpuffer + 7 % Dextrose	RT	2 h
Waschvorgang	0,1 M Natriumacetat	4°C	2 x 2 min
Inkubation	0,5% UA in ddH ₂ O	4°C	0,5 h
Waschvorgang	0,1 M Natriumacetat	4°C	2 x 2 min
Inkubation	50%, 70%, 80%, 95%, 2 x 100% Methanol	4°C	je 15 min
	PO	4°C	2 x 15 min
	Verhältnis Epon zu PO 1:1	RT	3 h
	Verhältnis Epon zu PO 1:1	RT	über Nacht
	Epon	RT	6 h
Flacheinbettung der Probe			
Polymerisation	Epon	37°C	über Nacht
	Epon	45°C	8 h
	Epon	60°C	48 h

8.5 Danksagung

Mein besonderer und sehr herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Anna-Leena Sirén, MD PhD, für unsere jahrelange freundschaftliche Zusammenarbeit. Gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. med. Manfred Heckmann hat sie in mir meine Neugierde und Denkart für die Neurowissenschaften und im Speziellen Synapsen erweckt. Ich danke beiden aufrichtig für die exzellente Betreuung des vorliegenden Projektes, für ihre Ausbildung zur Wissenschaftlerin und für die vielseitigen Einblicke in neurowissenschaftliche Forschung. Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christian Stigloher für seine hervorragende Betreuung in der Mikroskopie-Einheit und bei vorliegender Arbeit, ebenso für seine prägende wissenschaftliche Ausbildung. Ich danke Frau Prof. Dr. med. Esther Asan für ihre Förderung meiner Person schon früh im Medizinstudium, ihre Supervision in der Elektronenmikroskopie sowie für unseren inspirierenden Gedankenaustausch in den letzten Jahren. Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Philip Kollmannsberger für seine motivierende, wertvolle Betreuung bei den Programmierungen. Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Markus Sauer für seine Unterstützung im GSLS-Komitee, die ermöglichte Mitarbeit in dem von ihm geführten Transregio-Forschungsverbund sowie seine nachhaltige Inspiration für nanoskopische Blickwinkel auf diese Welt.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. med. Martin Pauli für seine Unterstützung bei der Etablierung der HPF/FS-Technik für akute Hirnschnitte. Ich danke Frau Dr. med. Mila Paul für ihre Unterstützung bei der Publikation der Dissertationsergebnisse. Beiden sei aufrichtig für unsere kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit in allen Jahren gedankt. Ich danke herzlich den technischen Assistentinnen Frau Daniela Bunsen, Frau Claudia Gehrig-Höhn und Frau Brigitte Trost für ihre Unterstützung im Rahmen der Probenpräparation. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Georg Krohne danke ich für seine Tipps und Tricks am Transmissionselektronenmikroskop. Ich bedanke mich bei dem elektronenmikroskopischen Labor des Anatomischen Institutes der Universität Würzburg, insbesondere Frau Karin Reinfurt-Gehm, für ihre Expertise und Bereitstellung der klassisch fixierten Hippocampuspräparate. Allen Kolleginnen und Kollegen der Labore sei herzlich für die freundschaftliche Atmosphäre in allen Jahren gedankt, im Besonderen Achmed, Nika, Sebastian und Sebastian.

Im Rahmen der Kurse der *European Molecular Biology Organization* (EMBO) konnte ich Prof. Dr. Gareth Griffiths, PhD, Oslo, Herrn Dr. Yannick Schwab, PhD, Heidelberg, und sein Team, im Besonderen Nicole, Paolo und Pedro, sowie Dr. rer. nat. Heinz Schwarz, Tübingen, kennenlernen. Allen bin ich für ihren fachlichen Austausch zu Elektronenmikroskopie sehr dankbar. Für unseren Austausch zu hippocampalen MFBs und Forschung danke ich ebenso Herrn Prof. Dr. med. Peter Jonas, Dr. Carolina Borges-Merjane, PhD, und Herrn Prof. Dr. med. Michael Frotscher (1947-2017), dessen ultrastrukturelle Arbeiten am MFB stets ein Vorbild waren.

Ich danke meinen Klinikdirektoren Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Deckert und Frau Prof. Dr. med. Sarah Kittel-Schneider für ihre außergewöhnliche Unterstützung und unermüdlige Motivation im Rahmen der Fertigstellung dieser Dissertation.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern Frau Petra Braun-Lichter und Herrn Johannes Lichter, meiner Schwester Stephanie, meinen Großeltern sowie allen meinen Freunden und WG-MitbewohnerInnen meiner Studienzeit aufrichtig bedanken. Ihre Neugierde und Fragen waren stets Inspiration und Ansporn zugleich. Die gesamte Dissertation ist meiner Großmutter Frau Anni Braun und meinen verstorbenen Großeltern Herrn Wilfried Braun, Frau Anna Lichter und Herrn Valentin Lichter gewidmet.

8.7 Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled **Die Ultrastruktur von Aktiven Zonen in hippocampalen Moosfaserboutons** is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, 23.08.22

Signature

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation **Die Ultrastruktur von Aktiven Zonen in hippocampalen Moosfaserboutons** eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 23.08.22

Unterschrift