

Aus dem Physiologischen Institut
Universität Würzburg
Lehrstuhl für Physiologie
Schwerpunkt Neurophysiologie
Vorstand: Professor Dr. med. Manfred Heckmann

Bildgebung Aktiver Zonen

**Lichtmikroskopische Methoden zur Darstellung präsynaptischer Aktiver
Zonen in lebendem und fixiertem Gewebe**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Martin Pauli
aus Waldbröl

Würzburg, 10.11.2012

Referent : Prof Dr. med. Manfred Heckmann

Korreferentin : Prof. Dr. med. Claudia Sommer

Dekan: Prof. Dr.med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 26. April 2013

Der Promovend ist Arzt.

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Einleitung	1
Lernen und Gedächtnis.....	1
Synaptische Plastizität	4
Von der Struktur zur Funktion	5
Hinter die Abbe'sche Grenze	8
Zielsetzung.....	12
Material und Methoden	13
Präparation	13
<i>Versuchstiere</i>	<i>13</i>
<i>Lösungen.....</i>	<i>13</i>
<i>Organotypische Schnittkultur</i>	<i>13</i>
<i>Rollertube Kulturen.....</i>	<i>16</i>
<i>Transkardiale Perfusion</i>	<i>16</i>
<i>Akutpräparate.....</i>	<i>17</i>
<i>Musculus levator auris.....</i>	<i>17</i>
Transfektion	18
<i>Plasmide.....</i>	<i>18</i>
<i>Elektroporation</i>	<i>18</i>
Immunfluoreszenz.....	22
<i>Kryotomie</i>	<i>22</i>
<i>Immunfluoreszenz-Färbung</i>	<i>22</i>
Bildgebung	23
Ergebnisse	28
Das notwendige Rüstzeug: Langzeitbeobachtung hippokampaler Neurone ..	28
Aktive Zonen in Bewegung?	31
Aus der Schnittkultur ins native Gewebe	40
Vorzüge der Symmetrie: Molekulare Architektur von Synapsen.....	43

Diskussion	50
Organotypische Schnittkulturen	50
Das CASTing Aktiver Zonen	53
Jenseits der Abbe'schen Grenze	55
Perspektive	57
Zusammenfassung.....	59
Referenzen	61
Danksagung	72
Lebenslauf	74

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Hippocampale Moosfasersynapsen	4
Abb. 2: Dynamik postsynaptischer Glutamatrezeptorfelder	6
Abb. 3: Ultrastruktur hippocampaler Moosfasersynapsen	7
Abb. 4: Neuromuskuläre Endplatte	9
Abb. 5: Hochauflösende Lichtmikroskopie	11
Abb. 6: Präparation des Mäusehippocampus am Modell.....	14
Abb. 7: Organotypische Schnittkultur und Elektroporation	19
Abb. 8: Plasmide.....	21
Abb. 9: Transfizierte Schnittkulturen	29
Abb. 10: Dynamik individueller Moosfaserboutons.....	30
Abb. 11: präsynaptische Verteilung von GFP-CAST	32
Abb. 12: Anreicherungsunterschiede zwischen Boutons eines Axons	33
Abb. 13: CAST-spezifische Agglomeration	34
Abb. 14: Plastizität des GFP-CAST-Signals	36
Abb. 15: Dynamik der GFP-CAST-Signale im Minutenbereich	37
Abb. 16: Doppelfärbung Aktiver Zonen.....	38
Abb. 17: Partielle Kolokalisation von GFP-CAST und anti-Bassoon.....	39
Abb. 18: Bassoon-Immunfluoreszenz im nativen Gewebe von Thy1- EGFPm-Mäusen	41
Abb. 19: Immundoppelfärbung mit anti-CAST und anti-Bassoon: Überschreiten der Abbe'schen Grenze... ..	42
Abb.20: ... und noch vier mal weiter: Vergleich von Piccolo und Bassoon mit einer lateralen Auflösung von 20 nm	44
Abb. 21: d STORM-Bildgebung postsynaptischer Falten.....	46
Abb. 22: Mit d Storm in die Schnittkultur	48
Abb. 23: Rollertube Kulturen.....	49

Einleitung

Lernen und Gedächtnis

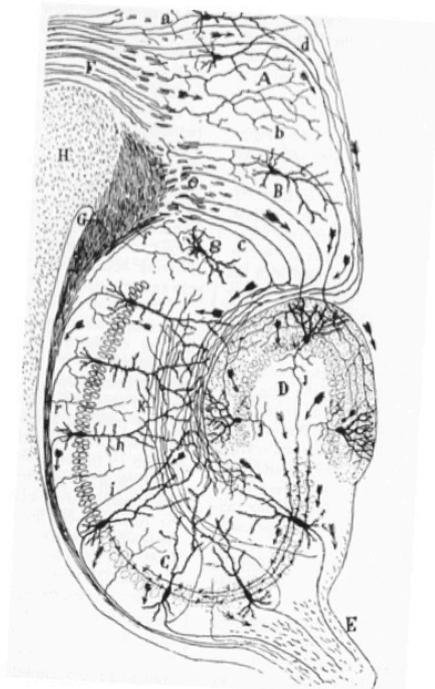
Das Gehirn ist die integrative Schaltzentrale aller Sinneseindrücke. In der Kombination und dem Vergleich verschiedener Sinnesmodalitäten erschafft das Gehirn ein inneres Abbild unserer Umwelt und vermittelt gleichsam die Orientierung und Bewegung in dieser Umwelt. Um diese Aufgaben leisten zu können, muss das Gehirn nicht nur in der Lage sein, Informationen akut aufzunehmen und zu verarbeiten, es muss darüber hinaus noch in der Lage sein, Informationen über bestimmte Zeiträume zu speichern, um im Vergleich neuer Informationen mit gespeicherten Informationen z.B. eine Einschätzung von Bewegungen im Raum zu bekommen. Kurz gesagt: die Fähigkeit zu lernen und Gedächtnis zu bilden ist eine grundlegende und notwendige Fähigkeit des Gehirns. Das Verständnis der physiologischen Grundlagen von Lernen und Gedächtnis ist daher seit jeher eine der zentralen Herausforderungen der Physiologie. Dabei interessieren die zugrundeliegenden elektrochemischen und molekularen Mechanismen ebenso, wie die beteiligten zellulären und molekularen Strukturen.

Zur Suche nach Hirnarealen, die zur Ausbildung von Gedächtnis notwendig sind, konnten Patientenstudien bedeutende Beiträge leisten. Eine der bekanntesten Fallstudien ist die Untersuchung des Patienten Henry Gustav Molaisen (H.M.). Nach partieller Resektion beider Temporallappen zur Sanierung eines epileptischen Fokus, bei der insbesondere auch große Teile der Hippokampi entfernt wurden, zeigte H.M. spezifische Gedächtnisausfälle: So erlangte H.M. in einer Zeichenübung mit vergleichbarer Übungsdauer eine ähnliche Geschicklichkeit wie gesunde Patienten, konnte sich bei den Wiederholungen jedoch jeweils nicht erinnern, diese Zeichenübung jemals durchgeführt zu haben (Milner et al., 1998). Die Studien zeigten nicht nur klar

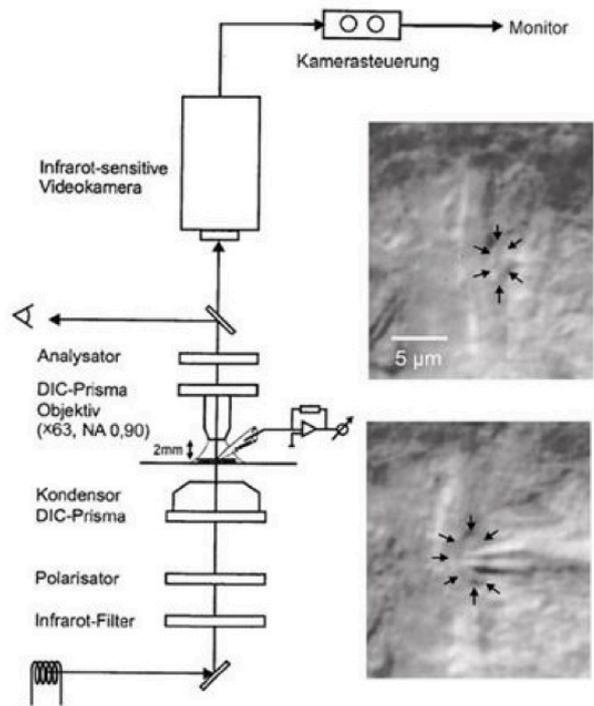
Unterschiede in der Konsolidierung von prozeduralen und deklarativen Gedächtnisinhalten auf, sie verdeutlichten auch die Bedeutung der Hippokampusformation für einige Lernaufgaben. Auch aus diesem Grund wurde der Hippokampus zu einem wichtigen Studienobjekt für Neurowissenschaftler. Die auffällige Histoarchitektur dieser archikortikalen Struktur wurde bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Ramon y Cajal (DeFelipe und Jones, 1988) beschrieben. In seinen Zeichnungen des Nagetierhippocampus (Abb. 1, A) kann man die Körnerzellen des Gyrus dentatus (DG) mit ihren langen Moosfaseraxonen von den Pyramidenzellen des Cornu ammonis (CA) unterscheiden. Aufgrund der Anordnung der Neurone schloss er schon damals auf die Richtung des Informationsflusses zwischen den Neuronen. Die von ihm postulierten Verbindungen konnten später elektrophysiologisch bestätigt werden (Andersen, Morris, Amral, Bliss und O'Keefe, 2007).

Die Bedeutung des Hippokampus als Präparat für die Neurophysiologie gründet aber auch auf anatomischen und funktionellen Besonderheiten. Die großen en-passant Varikositäten der hippokampalen Körnerzellen ermöglichen die direkte elektrophysiologische Untersuchung mit dem patch-clamp Verfahren (Geiger und Jonas, 2000). Die Anwendung dieser Technik an Moosfaserboutons ermöglichte es, Veränderungen der Übertragungseigenschaften auf dem Niveau einzelner Synapsen zu identifizieren, und erlaubte es, anhand von Kapazitätsmessungen Exo- und Endozytose synaptischer Vesikel zu analysieren (Abb. 1; Hallermann et al., 2003).

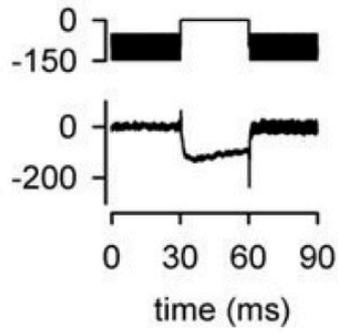
A



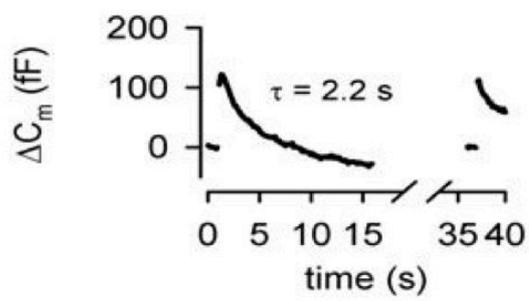
B



C



D



E

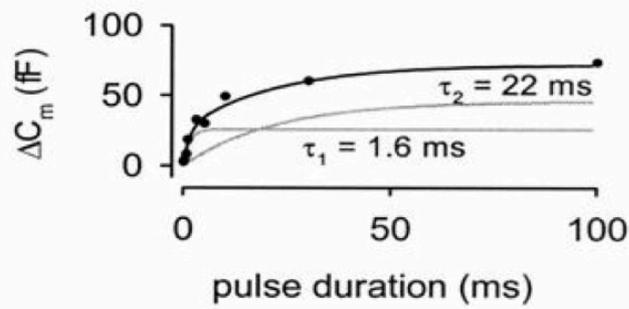


Abb. 1: Hippocampale Moosfasersynapsen

(A) Zeichnung einer Golgi-Färbung des Nagetierhippocampus von Ramon y Cajal 1911; die Pfeile geben die von Cajal erwartete und später in elektrophysiologischen Messungen weitgehend bestätigte Richtung des Informationsflusses an. (B) Schematische Darstellung der Optik für elektrophysiologische Ableitungen; Unter infraroter Beleuchtung wurden die Moosfaserboutons mittels DIC-Kontrastverstärkung bei 4-facher Nachvergrößerung mit einem Wasserimmersionsobjektiv mit 63-facher Vergrößerung über eine Kamera dargestellt (Abb. modifiziert nach Stuart et al., 1993). Exemplarisch wird ein Moosfaserbouton vor (oberes Bild) und nach Annähern einer Patch-clamp Pipette gezeigt (Abb. modifiziert nach Geiger und Jonas, 2000). (C) Spannungsklemme und pharmakologisch isolierter Calciumstrom während präsynaptischer Kapazitätsmessungen. Vor und nach dem Stimulus wird die Kapazität über ein sinusförmiges Spannungsklemmenkommando bestimmt (5kHz, $\Delta V = 50$ mV). (D) Kapazitätsänderungen bei 30 ms Pulsen; die Membrankapazität geht auf den Ausgangswert zurück mit einer Zeitkonstante von 2,2 s. (E) Abhängigkeit der Kapazitätsänderung von der Pulsdauer; die Kapazitätsänderung erreicht bei Pulslängen ab 30 ms einen oberen Grenzwert. Die durchgehende Linie zeigt den Verlauf einer biexponentiellen Funktion, die auf die Meßwerte angepasst wurde. Alle Datenpunkte entsprechen Einzelmessungen bis auf die Daten bei 1 ms (5 Messungen) (C-E: modifiziert nach Hallermann et al., 2003).

Synaptische Plastizität

Veränderungen synaptischer Übertragungseigenschaften werden als synaptische Plastizität bezeichnet und gelten als funktionelle Bausteine von Lernen und Gedächtnis. In „The organization of behaviour“ schrieb Donald Hebb (Hebb, 1949):

“When an axon of cell A is near enough to excite cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is increased.”

Dieses auch als Hebb'sche Lernregel bekannte Zitat ist heute die am meisten verbreitete Hypothese für die Beschreibung der Grundlagen von Lernen und Gedächtnis. Die funktionelle Beschreibung plastischer Phänomene an Synapsen ist bisher häufig elektrophysiologischen Experimenten vorbehalten. Dabei lassen sich die Änderungen der synaptischen Übertragung entsprechend ihrer Dauerhaftigkeit in Kurzzeit- und Langzeitplastizität einteilen. Als Beispiel für Kurzzeitplastizität kann u.a. die Änderung der postsynaptischen Stromamplituden in Pulspaarexperimenten genannt werden. Kurz- und Langzeitplastizität unterscheiden sich jedoch nicht nur in der Dauer des Effekts auf die synaptische Übertragung, vielmehr differieren auch die zugrundeliegenden Mechanismen. Spielen bei Kurzzeitplastizität temporäre Änderungen wie die synaptische Akkumulation von Kalzium oder die Inaktivierungskinetiken von Kalium-Kanälen eine wichtige Rolle, sind die Vorgänge zur Ausbildung von Langzeitplastizität vielschichtiger. Kurzzeitplastizität wird vorwiegend präsynaptisch ausgelöst, bei Langzeitplastizität sind je nach Synapse postsynaptische und präsynaptische Prozesse eng verzahnt (Bliss und Collingridge, 1993). Anhand der zeitlichen Abfolge unterschiedlicher Prozesse lässt sich Langzeitplastizität in eine frühe Induktionsphase und eine späte Konsolidierungsphase unterteilen. Durch Blockade der Proteinbiosynthese konnte gezeigt werden, dass insbesondere die späte Phase abhängig von Transkription und Translation synaptischer Proteine ist (Davis und Squire, 1984; Alberini, 2008). Hier bestätigt sich Hebb's Theorie, dass funktionelle Veränderungen mit strukturellen Anpassungen einhergehen.

Von der Struktur zur Funktion

Eine wichtige Fragestellung bei der Untersuchung plastischer Phänomene ist die Verknüpfung struktureller Veränderungen mit funktionellen, meist elektrophysiologischen Plastizitätsmessungen. Mit der Entdeckung des Grün-Fluoreszierenden-Proteins (Shimomura et al. 1962) und dessen

Weiterentwicklung (Heim und Tsien, 1996; Shaner et al., 2004) bot sich die Möglichkeit, Proteine gezielt zu markieren und deren Dynamik mit Fluoreszenzmikroskopie in Zeitserien zu beobachten. Damit konnten Umbauvorgänge synaptischer Substrukturen wie z.B. postsynaptischer Rezeptorfelder visualisiert werden. Veränderungen von Rezeptoren beeinflussen die postsynaptische Reaktion auf die Transmitterfreisetzung an präsynaptischen Aktiven Zonen. Mit Hilfe von *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie konnte an neuromuskulären Synapsen von *Drosophila*-Larven die Mobilität und spezifische Regulation der Zusammensetzung postsynaptischer Rezeptorfelder gezeigt werden (Abb. 2, Rasse et al., 2005; Schmid et al., 2008). In der Arbeit konnte weiterhin eine enge zeitliche Verbindung von prä- und postsynaptischen strukturellen Veränderungen aufgezeigt werden.

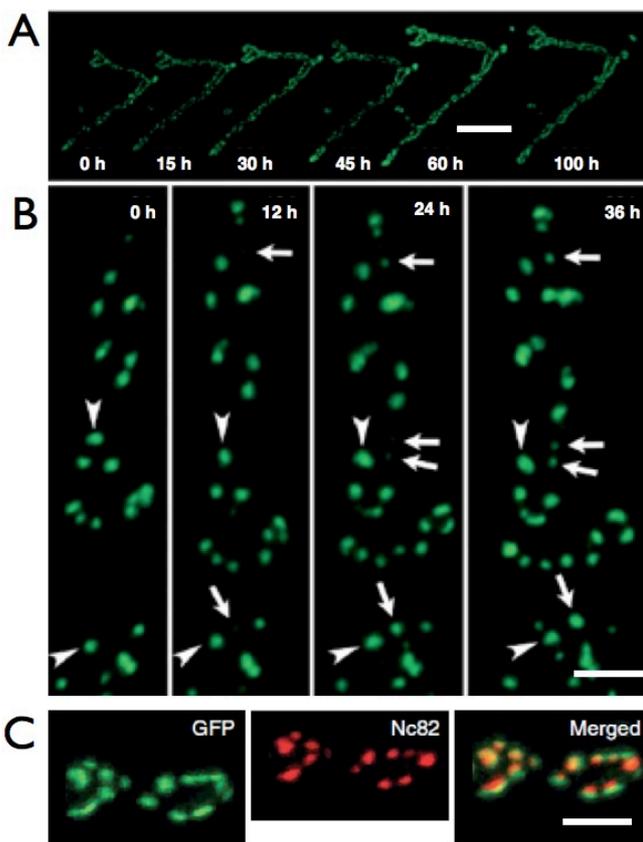


Abb. 2: Dynamik postsynaptischer Glutamaterezeptorfelder

Zeitserien konfokaler Aufnahmen GFP-markierter, postsynaptischer Glutamaterezeptoruntereinheiten (GluRIIA) an neuromuskulären Synapsen in *Drosophila melanogaster*. (A) Die Bildgebung zeigt das Wachsen und die Neubildung postsynaptischer Rezeptorfelder; Skalierbalken 10 μm . (B) Bei höherer Vergrößerung sind neu entstandene Rezeptorfelder mit Pfeilen, statische Rezeptorfelder mit Pfeilspitzen hervorgehoben; Skalierbalken 4 μm . (C)

Immunfluoreszenzfärbung gegen GFP und das Aktive-Zonen-Protein Bruchpilot an GluRIIA-GFP positiven neuromuskulären Synapsen. (A-C: modifiziert nach Rasse et al., 2005); Skalierbalken 2 μm .

Den postsynaptischen Rezeptorfeldern liegen spezialisierte Membranorganellen gegenüber, die die Freisetzung von Neurotransmitter steuern. Es konnte gezeigt werden, dass diese sog. Aktive Zonen (Südhof, 2012) im Rahmen synaptischer Plastizität strukturell modifiziert werden (Weyhersmüller et. al., 2011; Matz et al., 2010). Aktive Zonen bestehen aus einem komplexen Netzwerk unterschiedlicher Proteine (Schoch und Gundelfinger, 2006). Zahlreiche Bestandteile dieser elektronendichten Strukturen (Abb. 3) wie Bassoon, CAST, Piccolo sind bereits identifiziert, die Funktion der einzelnen Proteine innerhalb der Aktiven Zonen ist allerdings weitgehend unbekannt und Gegenstand aktueller Forschung (Kaeser et al., 2009; Kittel et al., 2006; Takao-Rikitsu et al., 2004; Wagh et al., 2006). Abb. 3 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen membranständiger Aktiver Zonen in hippocampalen Moosfaserboutons (Zhao et al., 2012). Bereits 1990 konnten Zalutsky und Nicoll aufzeigen, dass insbesondere in den Körnerzell-CA3-Pyramidenzellsynapsen Plastizität im wesentlichen von präsynaptischen Mechanismen getragen wird (Zalutsky und Nicoll, 1990). In der Arbeit wurde die unterschiedliche Ausprägung prä- und postsynaptischer Effekte an verschiedenen Synapsen dargestellt.

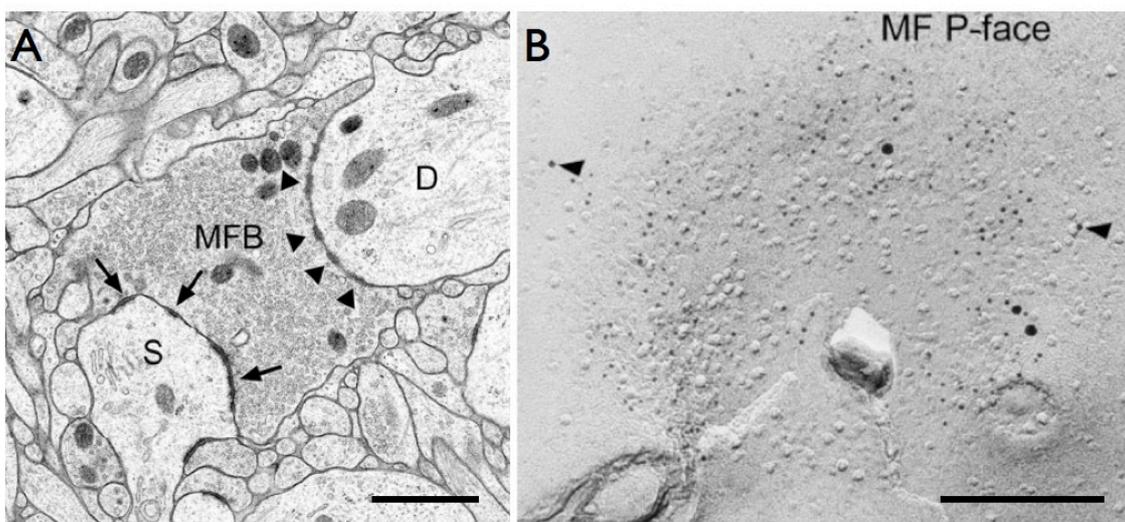


Abb. 3: Ultrastruktur hippocampaler Moosfasersynapsen

(A) Transmissionselektronenmikrographie einer Moosfasersynapse; Der anhand der zahlreichen synaptischen Vesikel identifizierte Bouton bildet zahlreiche synaptische Kontakte mit einem dendritischen Dorn (S, Pfeile). Davon zu unterscheiden sind nichtsynaptische Kontakte mit dem Dendritenschaft (D, Pfeilspitzen); Skalierbalken 1 μm (nach Zhao et al., 2012). (B) Kolokalisation der aktiven Zonen Proteine Cast und Bassoon. Die Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie mit dreifach Immuno-Gold Markierung von Basson, CAST und vGluT 1 zeigt die Lokalisation der präsynaptischen Proteine an der inneren Zellmembran; Skalierbalken 200 nm (nach Hagiwara et al., 2005).

Die Mechanismen, mit denen die molekularen Bausteine für strukturelle Plastizität zur Verfügung gestellt werden, sind weitgehend unbekannt. In hippokampalen Neuronenkulturen gibt es Hinweise, dass u.a. die Aktiven-Zonen-Proteine (AZ-Proteine) Piccolo und Bassoon in Transportvesikeln als präformierte Aktive Zonen in Synapsen transportiert und bei Bedarf zur Verfügung gestellt werden (Ahmari et al., 2000, Fejtova et al. 2006). Im intakten Gewebeverband konnte die Dynamik Aktiver Zonen bei Säugern bisher jedoch nicht visualisiert werden. Um die Bedeutung struktureller Veränderungen der Präsynapse für synaptische Plastizität zu verstehen, sind Zeitserienaufnahmen markierter Synapsen notwendig. Als Reporterproteine bieten sich hierbei transgen-exprimierte markierte Strukturproteine der Aktiven Zone wie CAST (cytomatrix of the active zone associated structural Protein; Deguchi-Tawarada et al., 2006; Hida et al., 2010) und Bassoon (Dresbach et al., 2003) an.

Hinter die Abbe'sche Grenze

Eine Herausforderung bei der Beschreibung synaptischer Plastizität ist die räumliche Ausdehnung der Aktiven Zonen. Durch die kleine Größe im Bereich der Diffraktionsgrenze sind Aktive Zonen lichtmikroskopisch primär nicht zugänglich, Elektronenmikroskopie-gestützte Studien haben jedoch wichtige Informationen über die Struktur Aktiver Zonen erbracht. So konnte in Aktiven Zonen neuromuskulärer Endplatten nicht nur ein symmetrischer Aufbau

mit Unterstrukturen (pegs, ribs und beams, Nagwaney et al., 2009) dargestellt werden, vielmehr konnte gezeigt werden, dass Aktive Zonen orthogonal zu den mit Acetylcholinrezeptoren besetzten postsynaptischen Falten ausgerichtet sind.

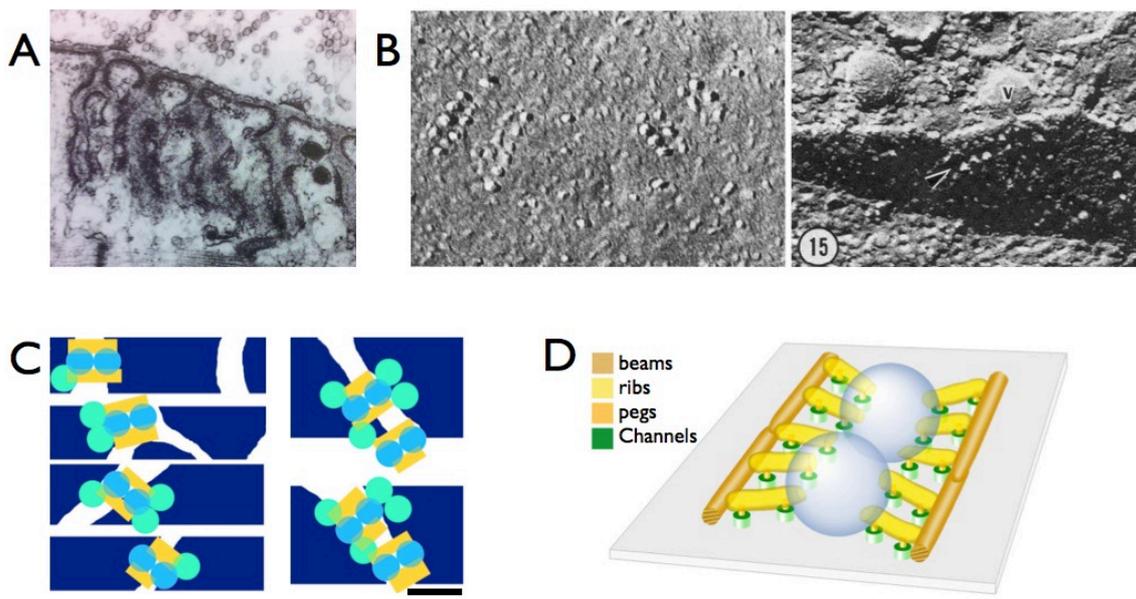


Abb. 4: Neuromuskuläre Endplatte

(A) Transmissionelektronenmikrographie eines Querschnittes durch die neuromuskuläre Endplatte; die präsynaptischen aktiven Zonen liegen den Mündungen der postsynaptischen Falten gegenüber. Die Breite der postsynaptischen Falten beträgt 50-100 nm (nach Peters et al., 1991). (B) Gefrierbruchelektronenmikrographie einer Endplatte; Am zytoplasmatischen Blatt der präsynaptischen Membran sind symmetrisch angeordnete Partikel zu erkennen. Die in zwei parallelen Zweierreihen angeordneten Partikel entsprechen präsynaptischen Kalziumkanälen. Das rechte Bild zeigt die Lagebeziehung eines exozytosebereiten synaptischen Vesikels (V) zu den beschriebenen Kalziumkanälen (Pfeilspitze); Skalierung anhand des Vesikeldurchmessers von 50 nm (nach Walrond und Reese, 1985). (C) Die schematische Darstellung verdeutlicht die orthogonale Ausrichtung der Längsachse der Aktiven Zonen zu den postsynaptischen Falten. (D) Die Proteine der neuromuskulären Aktiven Zone sind symmetrisch angeordnet und bilden Substrukturen, die mit pegs, ribs und beams bezeichnet werden (C, D: nach Nagwaney et al., 2009).

Die Kenntnis der Morphologie und Stöchiometrie der neuromuskulären Aktiven Zonen ermöglicht es, Abschätzungen der strukturellen Veränderungen im Rahmen präsynaptischer Plastizität vorzunehmen. Die Etablierung zuverlässiger Marker zur Darstellung Aktiver Zonen ist dabei von entscheidender Bedeutung. Trotz der detaillierten elektronenmikroskopischen Darstellung Aktiver Zonen und der Darstellung ihrer Kompartimentierung in pegs, ribs und beams ist die molekulare Identität dieser Kompartimente und somit die molekulare Architektur der Aktiven Zone bisher jedoch weitgehend unbekannt. Die Kenntnis der Lokalisation der Proteine innerhalb der Aktiven Zonen würde zudem Rückschlüsse auf deren Funktion ermöglichen.

Immunfluoreszenzuntersuchungen haben sich in den letzten Jahrzehnten als zuverlässiges Werkzeug zur Untersuchung von Proteinverteilungen erwiesen. Der Nachteil dieser Methode liegt in der von Abbe (Abbe, 1873) aufgezeigten Auflösungsbegrenzung lichtmikroskopischer Aufnahme-techniken. Berechnet man die maximale laterale Auflösung mit $d = \frac{\lambda}{2A}$ (λ = Wellenlänge des Lichtes, A = numerische Apertur des Objektivs), so zeigt sich, dass selbst bei kurzwelligem Licht und hochnumerischen Objektiven Auflösungen unterhalb von 200 nm nur schwer zu erreichen sind. Eine detailreiche Darstellung Aktiver Zonen, deren Größe im Bereich von 100 nm liegt, ist so mit konventioneller Lichtmikroskopie nicht möglich.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Techniken entwickelt, die unter Umgehung der Diffraktionsbarriere deutlich höhere laterale Auflösungen erreichen. Gemeinsame theoretische Grundlage dieser Methoden ist es, durch eine Begrenzung der Anzahl an zeitgleich emittierenden Fluorophoren die Auflösung zu verbessern. STED –Stimulated Emission Depletion- Mikroskopie- (Hell und Wichmann, 1994) erreicht eine laterale Auflösung von 35 nm durch Abtasten der Probe mit zwei überlagerten Laserstrahlen, die eine Fluoreszenzemission nur im Zentrum des Anregungsstrahls zulassen. dSTORM –direct stochastic optical reconstruction microscopy- (Heilemann et al., 2008; van de Linde et al., 2011) erzeugt Aufnahmen mit bis zu 10 nm Auflösung. Dazu

werden Filme der fluoreszenzgefärbten Präparate angefertigt. Die experimentellen Bedingungen werden dabei so gewählt, dass sich die meisten Fluorophore in einem reversiblen Aus-Zustand befinden. So erreicht man, dass in den einzelnen Frames stochastisch nur eine Subpopulation der Fluorophore Licht emittiert. Die genaue Lokalisation vereinzelter, zufällig aktivierter Fluorophore kann dann in den Einzelbildern mathematisch rekonstruiert werden. Die Summe der Einzelbilder ergibt das hochaufgelöste Bild.

Diese neuen lichtmikroskopischen Techniken bieten somit die Voraussetzungen für detailreiche Untersuchungen präsynaptischer Aktiver Zonen. Die Aktive Zone der neuromuskulären Endplatte bietet sich dabei durch ihren symmetrischen Aufbau in Kombination mit umfangreichen elektronenmikroskopischen und elektrophysiologischen Daten als Referenzpräparat für die Etablierung der Anwendung hochauflösender Techniken an.

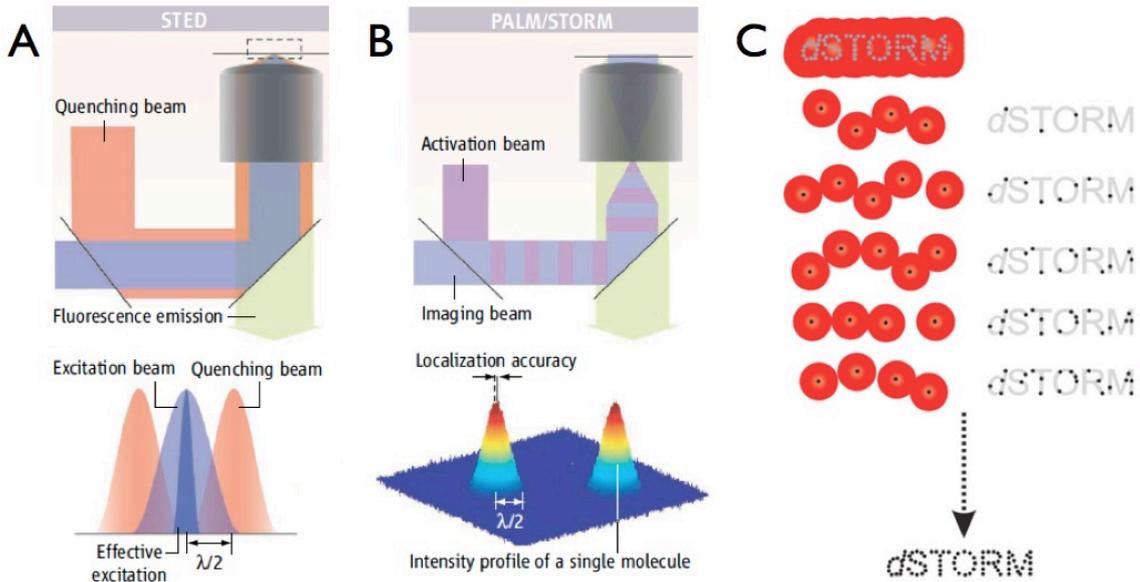


Abb. 5: Hochauflösende Lichtmikroskopie

Unterschiedliche Mikroskopietechniken umgehen die von Abbe (Abbe, 1873) definierten Auflösungsgrenzen der Lichtmikroskopie. **(A)** STED-Mikroskopie: durch Depletieren der Fluoreszenz im Randbereich des anregenden Laserstrahls

verschmälert sich die effektive Ausdehnung des anregenden Laserstrahls deutlich unter die diffraktionsbedingten Grenzen. **(B)** PALM/STORM: durch zufälliges Aktivieren und Inaktivieren einer kleinen Subpopulation der im Präparat vorhandenen Fluorophore erreicht man eine Vereinzelung der leuchtenden Fluorophore. Die beugungsbegrenzten Intensitätsprofile können mathematisch beschrieben und mit bis zu 5 nm Präzision auf das Zentrum des Lichtsignals zurückgerechnet werden **(A, B:** nach Pinaud und Dahan, 2008). **(C)** Konsekutiv aufgenommene unterschiedliche Subpopulationen von vereinzelt Fluorophoren erlauben die Rekonstruktion eines hochaufgelösten Bildes (nach van de Linde et al., 2011).

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, synaptische Plastizität auf dem Niveau einzelner Aktiver Zonen in lebendem Gewebe zu beschreiben. Dazu sollte die Dynamik Aktiver Zonen anhand der Bildgebung Aktiver-Zonen Marker in hippokampalen Moosfasersynapsen dargestellt werden. Als zweites Ziel sollte die Untersuchung der Ultrastruktur Aktiver Zonen mit aktuellen, hochauflösenden lichtmikroskopischen Verfahren etabliert werden.

Material und Methoden

Präparation

Versuchstiere

Für die Herstellung der organotypischen Schnittkulturen wurden C57/Bl 6 Mäuse im Alter von 2- 5 Tagen verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden an adulten Thy1-EGFPm Mäusen und C57/Bl6 Mäusen im Alter von 3-8 Wochen durchgeführt. Die Untersuchungen mit *d*STORM erfolgten an männlichen C57/Bl 6 Mäusen im Alter von 15 Wochen.

Lösungen

Es wurden folgende Lösungen verwendet:

Präparationslösung: 987,5 ml HBSS (Gibco 24020091), 12,5 ml Glucose 40%, 2 ml Kynurensäure 100 mM (Sigma K3375), pH 7,2-7,4);

Zellkulturmedium: 224,4 ml Aqua Pro injectione, 250 ml 2-fach konzentriert (Sigma M1018-10L), 250 ml BME ohne Glutamin (Gibco 41010026), 10 ml Glutamax 200mM (Gibco 35050038), 15,62ml Glucose 40%, pH 7,2, steril filtriert, 250 ml hitzeinaktiviertes Pferdeserum (Gibco 26050-088)];

Zytostatikamischung: [Ara-C (Sigma C 6645), Uridine (Sigma U 3750), 5-Fluorodeoxyuridine (Sigma F 0503)] 1:1:1;

Kulturmedium für Rollertubekulturen: 250 ml HBSS, 500 ml BME, 5 ml Glucose 40%, 2,5 ml Glutamine 200 mM, pH 7,4, steril filtriert, 250 ml hitzeinaktiviertes Pferdeserum;

Transfektionsmedium: DPBS (PAA H15-001), Glucose 27,8 mM

Organotypische Schnittkultur

Die Tiere wurden durch Enthaupten getötet. Der Kopf wurde zur Keimreduktion mit 70-prozentigem, unvergälltem Alkohol abgerieben. Für die folgenden Präparationsschritte wurde der Kopf mit einer spitzen Pinzette durch

Einstecken der leicht geöffneten Pinzette an der Schnauze fixiert. Diese Fixierung wurde bis zum Ende der Organentnahme nicht mehr gelöst. Die Haut wurde von okzipital nach frontal entlang der Sagittalnaht bis auf Höhe der Augen mit einer Federschere aufgeschnitten und die Hautlappen mit einer gebogenen Pinzette nach temporal abgezogen. Die knorpelige Schädelkalotte wurde in gleicher Weise vom foramen magnum ausgehend bis auf Höhe der Augen eingeschnitten. Dort wurden beidseits Schnitte nach temporal bis in die orbitae gemacht, ebenso entlang der Lambda-Naht. Nun wurden die vier Teile der Kalotte mit einer gebogenen Pinzette vorsichtig entfernt.

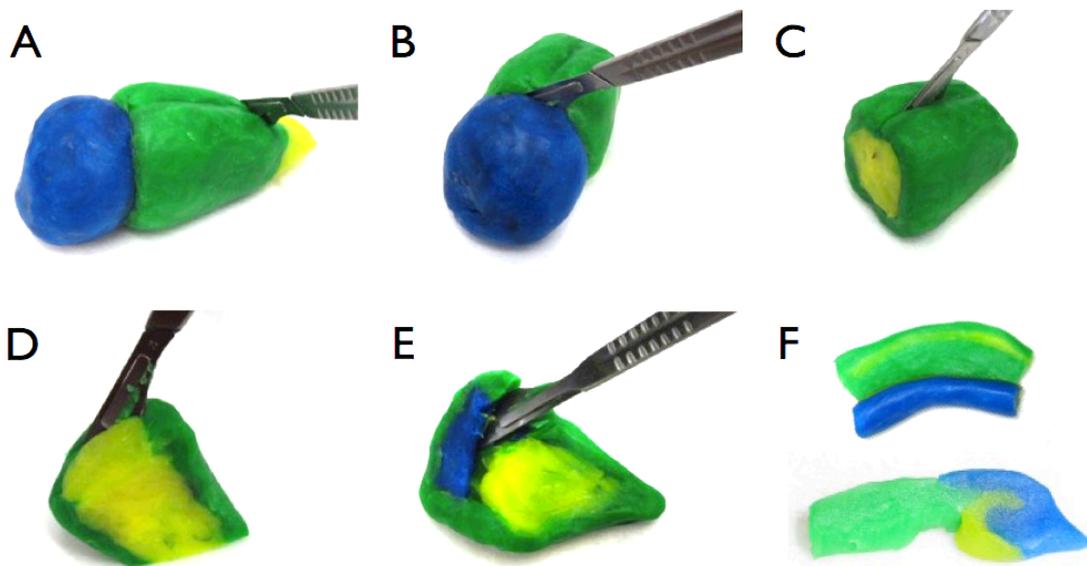


Abb. 6: Präparation des Mäusehippocampus am Modell

Nach Eröffnung des Schädels und Wegklappen der temporalen Schädelkuppen werden zunächst der Bulbus olfactorius (**A**: gelb) und das Cerebellum (**B**: blau) in situ abgetrennt und die Hemisphären durch einen sagittalen Schnitt (**C**) separiert. Nach Entfernung der Basalganglien liegt der Hippocampus (**D**: blau) frei. Durch vorsichtiges Einführen des Skalpells in den Seitenventrikel wird der Hippocampus auf das Skalpell aufgeladen (**E**) und kann vom Cortex getrennt werden (**F** oben: Cortexanteile grün, Cornu amonis blau). (**G**) Nach dem Schneiden ist die für den Hippocampus typische Morphologie zu erkennen (**F** unten: Gyrus dentatus gelb).

Am nun frei liegenden Gehirn wurden noch in situ die Riechkolben und Teile des Frontalhirns abgetrennt, ebenso das Cerebellum (Abb. 6 A,B

Riechkolben gelb, Cerebellum blau). Vor Entnahme aus dem Lager auf der verbliebenen Schädelbasis wurden die Hemisphären getrennt (Abb. 6 C).

Beide Hemisphären wurden zur weiteren Präparation in eiskalte Präparationslösung verbracht. Die Hemisphären wurden auf die Schnittfläche des Frontalhirns gestellt und durch Einstechen mit einem Skalpell mit gerader, spitzer Klinge in der Präparationschale fixiert. Mit einem gebogenen Skalpell wurden nun die Basalganglien (Abb. 6 D, Basalganglien gelb) in einem Schnitt vom Cortex getrennt. In der Innenansicht der Großhirnrinde kann nun ein leichter Bogen (Abb. 6 E, Übergang zwischen blau und gelb/grün) gesehen werden, der den Eingang zum Seitenventrikel markiert. Der Hippocampus konnte nun vorsichtig auf das gebogene Skalpell aufgeladen und mit einem Schnitt vom Großhirn getrennt werden. Der freigelegte Hippocampus wurde auf ein Stück Kopierfolie verbracht und überschüssige Präparationslösung mit einem saugfähigen Tuch entfernt. Anschließend wurde der Hippocampus mit einem Gewebeschnneider (Mcilwain Tissue Chopper MTC/2E, Firma Micle laboratories engineering Co. LTD) in 300 μm dicke Scheiben (Abb. 6 F) zerteilt und danach wieder in kalte Präparationslösung gegeben. Da die Schnitte häufig noch aneinander haften blieben, wurden sie vorsichtig mit den Skalpellen voneinander getrennt. Wenn nötig, wurden weit überstehende Reste des entorrhinalen Cortex gekürzt. Die Schnitte wurden nun mit zwei Metallspateln auf Zellkulturmembranen (Millicell-CM 0,4 μm Porengröße, Firma Millipore) transferiert. Nachdem die überschüssige Präparationslösung von der Membran aufgenommen war, wurden die Membranen in vorbereitete Zellkulturschälchen überführt.

Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 100 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO_2 und 37°C für mindestens 3 Wochen gehalten, alle 2-3 Tage wurde das Zellkulturmedium unter einer laminar flow Arbeitsbank gewechselt. Zwischen 3 und 5 Tagen nach der Präparation wurde dem Medium die Zytostatikamischung in einer Endkonzentration von 6,6 μM zugesetzt, die eine überschießende Gliaproliferation verhinderte. Das Zytostatika-Medium wurde nach 24 Stunden ausgetauscht. Die Schnittkulturen wurden für mindestens 3 Wochen im

Brutschrank kultiviert, bevor sie der Transfektion zugeführt wurden.

Einigen Kulturen wurden nach mehrfacher Bildgebung 100 μmol SpcAMPS (Firma Biomol) in das Kulturmedium zugegeben.

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden einige Schnittkulturen im Anschluß an die in vivo Bildgebung mit einigen Millimetern Sicherheitsabstand aus den Membranen ausgeschnitten und mit PFA 4% über Nacht fixiert. In einer Gefrierprobenschale wurde ein ca. 5mm hoher Spiegel an Einbettmedium [Tissue Tek (Firma Sakura Finetek)] vorgelegt. Es wurde gewartet, bis sich der Spiegel horizontal egalisiert hatte. Auf diesen Spiegel wurde nun vorsichtig mit einer Pinzette die Membran aufgelegt und der Schnitt vorsichtig mit Tissue Tek überschichtet. Im Anschluß wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Rollertube-Kulturen

Ein Teil der Hippocampusschnitte wurde statt auf Zellkulturmembranen auf Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläser (12 x 24 mm) verbracht und mit einem Tropfen gerinnenden Hühnerplasmas festgeklebt. Diese Kulturen wurden in verschlossenen Zellkulturröhrchen in einer rotierenden Trommel im Brutschrank gehalten. Die Zytostatika wurden hier in einer Endkonzentration von 4,4 mM dem Kulturmedium für 3 Tage hinzugefügt.

Beide organotypischen Zellkulturen wurden ohne Anwendung von Antibiotika oder Antimykotika geführt.

Transkardiale Perfusion

Für die Immunfluoreszenzfärbungen an THY1-EGFPm Mäusen wurden die Tiere mit einem peritoneal applizierten Mäusenarkotikum aus [Ketanest 0,8 %, Rompun 0,08 %; 10 $\mu\text{l/g}$ Körpergewicht] narkotisiert. In Narkose erfolgte die transkardiale Perfusion mit PFA 4%. Nach der Perfusion wurden die Gehirne entnommen und über Nacht in 30% Saccharose-Lösung zur Kryoeinbettung

vorbereitet. Die Gehirne wurden in Tissue Tek eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Akutpräparate

Für Immunfluoreszenzaufnahmen an nativen Hirnschnitten wurden Wildtypmäuse C57/Bl 6 im Alter P 15 - P 21 verwendet. Die Tiere wurden mit Äther betäubt und durch Enthauptung getötet. Das Gehirn wurde nach der gleichen Methode aus dem Schädel entnommen wie bei der Herstellung der Schnittkultur beschrieben. Die Gehirne wurden in toto in Tissue Tek eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die gesamte Präparation wurde ein Zeitlimit von zwei bis maximal vier Minuten nicht überschritten

Musculus levator auris

Der Musculus levator auris (MLA) ist ein okzipital gelegener, oberflächlicher, ca. 3- 6 Muskelfasern dicker Muskel. Er entspringt der Mittellinie des Schädels im Bereich der Sagittalnaht und zieht zum knorpeligen Gerüst der Ohrmuschel; der Muskel lässt sich in einen caudalen dickeren und einen kranialen dünneren Teil untergliedern (Agnaut-Petit et al., 1987).

Zur Präparation wurden 6-10 Wochen alte C57/Bl6 Mäuse in Isofluran lethal anästhesiert. Nach dem Rasieren im Bereich des Nackens und zwischen den Ohren wurde das Fell von Höhe der Augen bis in den Lumbalbereich medial eröffnet und nach lateral abpräpariert. Der häutige Teil der Ohrmuscheln wurde entfernt.

Der Muskel wurde im Folgenden mit einer stumpfen Kanüle von kranial mit 0,5 - 1 ml PBS unterspritzt und damit angehoben. Dadurch wurde die Trennung von weiteren oberflächlichen Muskeln möglich. Daraufhin wurde der MLA durch Dissektion des Ansatzknorpels lateral gelöst. Dann wurden rechter und linker MLA in der Medianlinie getrennt. Nun wurden verbliebene muskuläre und sehnige Verbindungen durchtrennt und der Muskel mit der Oberfläche nach

unten zur Feinpräparation in einer Zellkulturschale mit Sylgardboden mit Insektennadeln aufgespannt. Im Anschluss an die Feinpräparation wurde der Muskel in PFA 4% für 30 min fixiert und zwei mal in PBS für 30 min gewaschen. Während der gesamten Präparation wurde der Muskel im Intervall mit PBS benetzt, um ein oberflächliches Austrocknen zu vermeiden.

Nach der Fixation wurden die neuromuskulären Endplatten mit α -Bungarotoxin-Konjugaten (s.u.) gefärbt. Der Muskel wurde in Tissue Tek eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Transfektion

Plasmide

Folgende Plasmide wurden verwendet: GFP-CAST (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ohtsuka T., Universität von Toyama); GFP-Bassoon 95-3938 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gundelfinger E, Leibnizinstitut für Neurobiologie Magdeburg); Strawberry-CAST, GFP-CAST 1-901, GFP-CAST 2701-2871 Andlauer T, Rudolf-Virchow Zentrum Universität Würzburg).

Elektroporation

Die Auswahl der organotypischen Kulturen erfolgte unter dem Mikroskop; entscheidendes Kriterium war ein leicht zugänglicher Gyrus dentatus unter einer möglichst dünnen Deckschicht aus Zelldetritus und Glia. Bei optimaler Präparation lagen die Körnerzellen an der Oberfläche des Schnitts.

Die Elektroporation erfolgte unter visueller Kontrolle an einem aufrechten Mikroskop (Axioskop F2, Firma Zeiss) mit einem Wasserimmersionsobjektiv mit 63-facher Vergrößerung (W-Plan-Apochromat, 63 x 1,0 NA, Firma Zeiss) und einer CCD Kamera (iXon plus EMCCD, Firma Andor). Für die Transfektion wurden die Schnitte in eine sterile Badschale aus Plexiglas (Eigenbau) transferiert. Während der Transfektion befanden sich die Schnitte in einem

phosphatgepufferten Transfektionsmedium. Die Transfektion fand bei Zimmertemperatur statt.

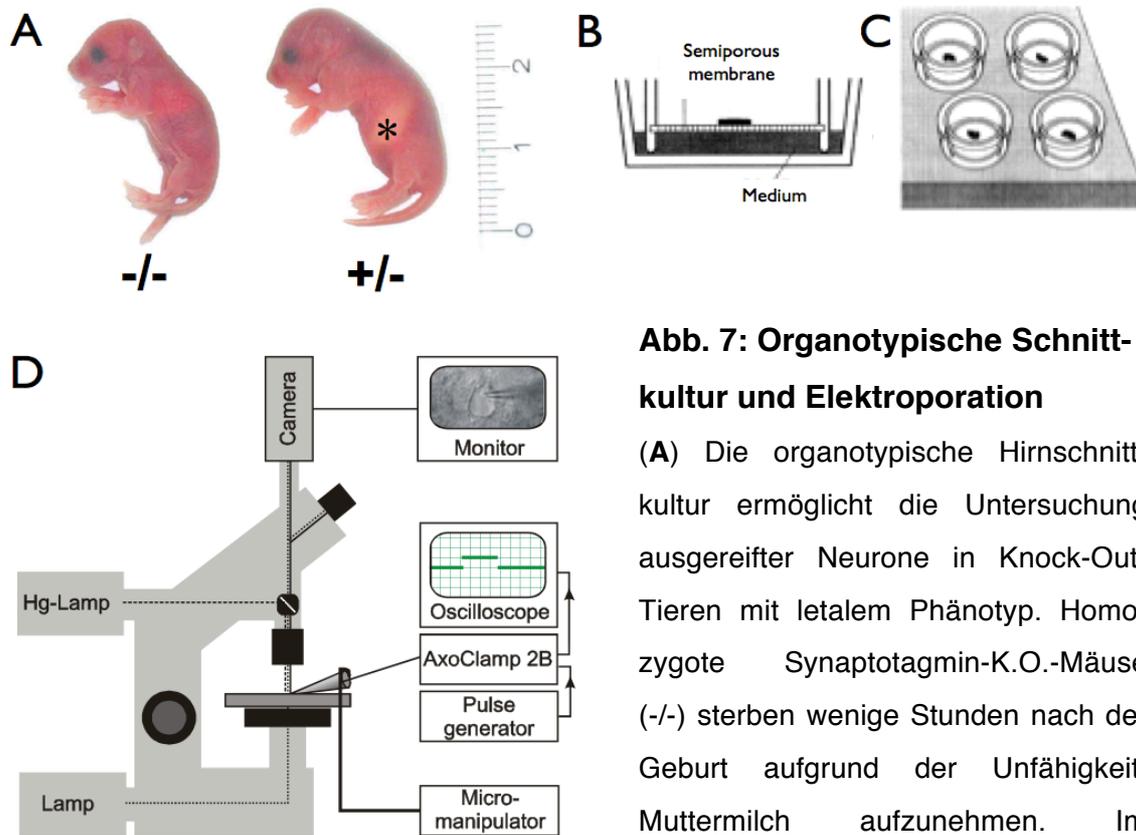


Abb. 7: Organotypische Schnittkultur und Elektroporation

(A) Die organotypische Hirnschnittkultur ermöglicht die Untersuchung ausgereifter Neurone in Knock-Out-Tieren mit letalem Phänotyp. Homozygote Synaptotagmin-K.O.-Mäuse (-/-) sterben wenige Stunden nach der Geburt aufgrund der Unfähigkeit, Muttermilch aufzunehmen. Im

Vergleich mit dem heterozygoten Geschwister fällt die geringere Größe und das Fehlen des Milchflecks(*) auf. (B) schematische Zeichnung der Zellkulturschalen; die Zellkulturschalen werden gerade so hoch mit Kulturmedium befüllt, dass die Membran an der Unterseite komplett benetzt ist. Der Gasaustausch der Schnitte erfolgt über die mediumfreie Oberfläche. Während der Präparation werden die Schalen mit Präparationsmedium auf einem -20°C kalten Aluminiumblock gekühlt (nach Gähwiler et al., 1997). (C) schematische Darstellung des Aufbaus eines Elektroporationsmessstandes; durch Modifikation eines Axoclamp 2B werden Spannungspulse im einstelligen Volt Bereich ermöglicht. Elektroporiert wurde mit hyperpolarisierenden Rechteckpulsen mit einer Dauer von 1 ms bei einer Frequenz von 100 Hz für 200 ms.

Für die Elektroporation wurden Glasmikroelektroden (Borosilicatglaskapillaren GB200F-10, Firma Science Products; DMZ Universal Puller, Firma Zeitz Instruments) mit einem elektrischen Widerstand zwischen 5 und 11 MΩ

verwendet. Es hatte sich als günstig erwiesen, die Elektroden frühestens einen Tag nach dem Ziehen zu verwenden, um Zelladhäsionen zu vermeiden. Die Steuerung der Elektroden erfolgte mit elektronischem Mikromanipulator (Firma Scientifica). Die Elektroden wurden mit DNA-Transfektionspuffermix [4-fach Elektroporationspuffer [4 x 138 mM NaCl, 4 x 5,4 mM KCl, 4 x 1 mM MgCl₂, 4 x 5 mM HEPES, DNA, Aqua bidest. steril] gefüllt.

Für die Applikation des Stromes wurde ein modifizierter Axoclamp 2B (Firma Axon Instruments) verwendet, die Transfektionsimpulse wurden mit einem Max 21 Stimulator (Firma Zeitz Instruments) generiert. Transfiziert wurde mit einer negativen Rechteck-Wechselspannung mit Amplituden zwischen zwei und 7,5 Volt bei einer Frequenz von 20 Hz und einer Einzelimpulsdauer von 1 ms. Die Spannungsamplitude wurde dabei so an den jeweiligen Pipettenwiderstand angepasst, dass zum einen eine Reaktion an den Zielzellen zu sehen war (pulsatiler Ausstrom von DNA-Transfektionsmix, Kontraktion der Zellen) und gleichzeitig nicht mehr als 10 % der Zellen sichtbare Schäden zeigten. In späteren Experimenten wurde die Transfektion auch mit einem Axoporator (Firma Axon Instruments) durchgeführt.

Es wurden in einer Sitzung über die gesamte Ausdehnung des Gyrus dentatus 15-60 möglichst oberflächlich liegende Körnerzellen elektroporiert. Bis zu 50 % der elektroporierten Zellen zeigten in den folgenden Tagen das gewünschte Expressionsmuster. Die Expressionskontrolle erfolgte frühestens 12 Stunden nach der Elektroporation. Erfolgreich transfizierte Zellen konnten bis zu 40 Tage nachbeobachtet werden.

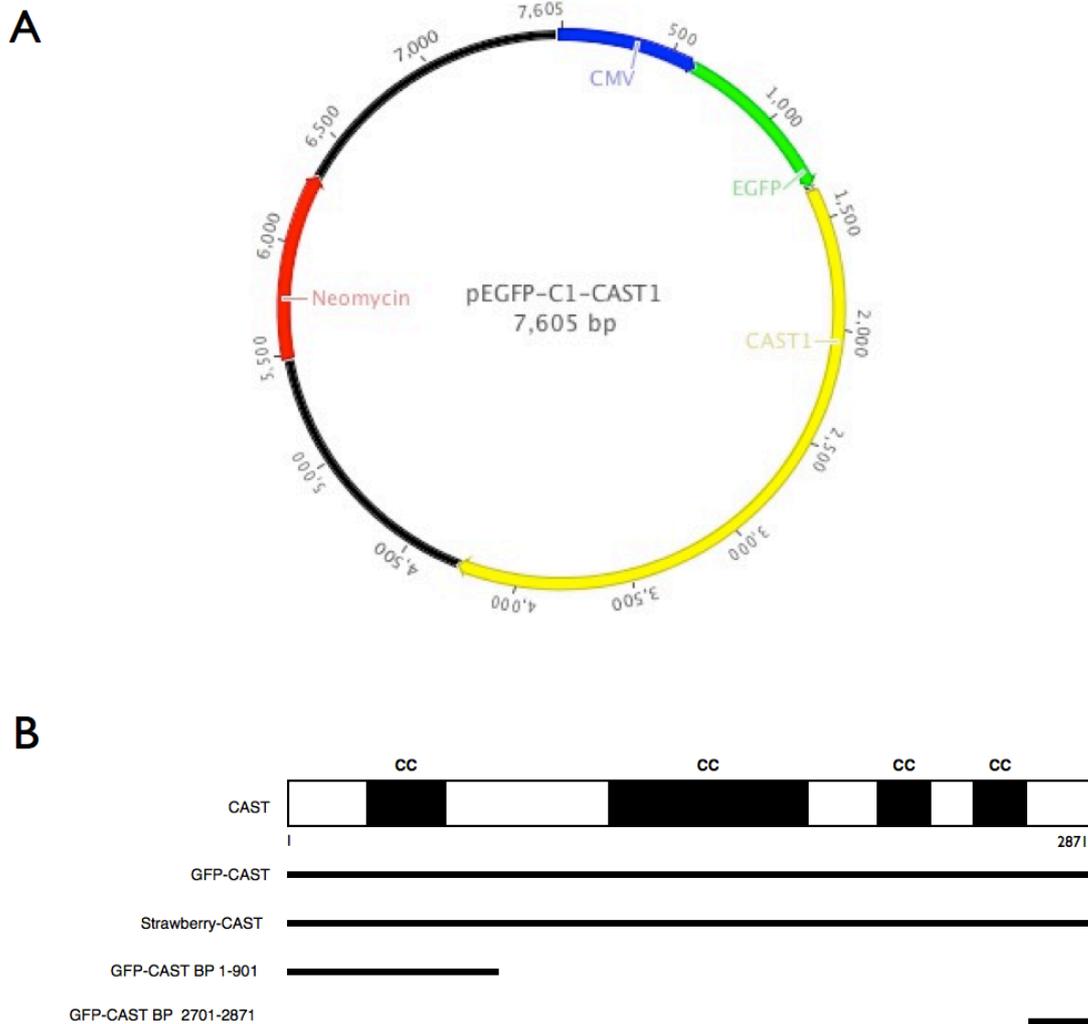


Abb. 8: Plasmide

(A) Alle verwendeten Plasmide enthielten den CMV-Promotor und ein N-terminal fusioniertes Fluorophor. (B) Vergleich unterschiedlicher Cast Fusionsproteine anhand der Tertiärstruktur; (nach Ohtsuka et al., 2002, CC = Coiled-Coil Domänen:GFP-CAST; Strawberry-CAST; GFP-CAST 1-901; GFP-CAST 2701-2871.

Immunfluoreszenz

Kryotomie

ZNS und Schnittkulturen

Die Akutpräparationen sowie die transkardial perfundierten Gehirne und die Schnittkulturen wurden auf einem Kryotom (Kryostat 100 Firma Leica) mit einer Stärke von 10 μm geschnitten und auf beschichtete Objektträger (Ultrafrost Plus, Firma Menzel) aufgezogen. Nach kurzer Antrocknungszeit wurden die Schnitte bis zur Färbung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Musculus levator auris

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden Kryoschnitte in unterschiedlicher Dicke mit einer maximalen Stärke von 20 μm angefertigt (Kryostat 3050, Firma Leica). Für die Bildgebung mittels dSTORM wurden auch Semidünnschnitte von 0,5 μm angefertigt; Objekt- und Kammertemperatur wurden hierbei bei $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ gewählt. Die Semidünnschnitte wurden einzeln auf Objektträger aufgezogen. Nach jedem Schnitt wurden Klinge und Schnittstreckerglas mit einem Pinsel gereinigt.

Immunfluoreszenz-Färbung

Die Immunfluoreszenzfärbungen der unterschiedlichen Präparate wurden nach einem einheitlichen Protokoll durchgeführt. Vor dem Färben wurden die Schnitte mit 50 % BSA/ 5 % NGS blockiert. Nach 2 h wurde die Blockerlösung abgekippt und die Erstantikörper in 1 % BSA/5% NGS in 0,3 % PBT zugesetzt. Die Erstantikörper verblieben über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf den Schnitten. Nach 4-maligem Waschen mit PBS wurden die Präparate mit den Zweitantikörpern für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte eingedeckt und mit Nagellack versiegelt.

Erstantikörper

anti-Bassoon 1:200 (ZNS) 1: 300 (NMJ) (Enzo SAP7F407)

anti-CAST:1: 100 (Firma Synaptic Systems 143 103).

anti-Piccolo 1:10000 (Synaptic Systems 1110402)

Zweitantikörper

konventionelle Immunfluoreszenz: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit, Cy 3 goat anti Mouse; STED: Atto 532 goat anti mouse; dSTORM: Alexa Fluor 647 F(ab')₂ Fragment goat anti-mouse (Invitrogen A-21237); Alexa Fluor 532 goat anti-mouse IgG (Invitrogen A-11002).

Toxin-Färbung

Das Schlangengift α -Bungarotoxin ist ein 74-Aminosäure großes Peptid und bindet hochspezifisch an beide Bindungsstellen des nikotinischen Acetylcholinrezeptors. Fluorophor-Toxin Konjugate sind kommerziell erhältlich. Für die Färbungen von Endplatten wurden Bungarotoxin-Alexa 488 und Bungarotoxin Alexa 647 (Invitrogen B-13422, B-35450) verwendet. Die Muskeln wurden bei einer Konzentration von 5 μ g/ml für 30 Min gefärbt und im Anschluß 2 x 30 Minuten gewaschen.

Bildgebung

Bildgebung an Schnittkulturen

Die Bildgebung der Schnittkulturen erfolgte *in vitro* an einem aufrechten, konfokalen Mikroskop (LSM 5 Pascal Firma Zeiss) mit einem Wasserimmersionsobjektiv (W-Plan-Apochromat 63x 1,0 NA, Firma Zeiss). Zunächst wurden unter Epifluoreszenzbeleuchtung (Xcite Firma Exfo) bei 5-facher Vergrößerung Zellen mit DsRed Expression identifiziert. Bei 63-facher

Vergrößerung wurden dann einzelne Boutons in der Mitte des Gesichtsfeldes eingestellt. Die konfokalen Aufnahmen erfolgten sowohl als sequentieller als auch als simultaner Scan beider Kanäle. Die Öffnung des pinholes wurde auf eine airy unit eingestellt. Für die Kantenlänge der Pixel wurden 70 nm gewählt. Die Auflösung in der z-Achse wurde nach den Vorschlägen der Software so eingerichtet, dass der Abstand der z-Ebenen jeweils die Hälfte der optischen Schnittdicke betrug.

Bei den Aufnahmen wurde üblicherweise der Mittelwert über vier Linienscans aufgezeichnet, um das Hintergrundrauschen zu reduzieren und gleichzeitig ein möglichst geringes Bleichen der Fluorophoren und eine geringe Phototoxizität zu erreichen. Anregungslaser für GFP war ein 488 nm Argon Laser, Dsred wurde mit einem 543nm HeNe Laser angeregt. Hauptfarbteiler war ein dichroider Spiegel mit Reflektionen für 405 nm, 488 nm und 543 nm, der NebenfARBteiler teilte bei 545 nm. Die GFP Fluoreszenz wurde zusätzlich durch einen Bandpassfilter von 505-530 nm, DsRed zusätzlich durch einen Langpassfilter 560 nm gefiltert. Laserintensität, Gain und Pixelttime wurden individuell an das jeweilige Fluoreszenzverhalten der Boutons angepasst. Dabei wurde darauf geachtet, die Herstellerempfehlungen für den Gain nicht zu überschreiten. Die Kontrolle erfolgte über das Helligkeitsprofil der Aufnahmen. Ziel war es, einige wenige Bildpunkte im Zielbereich sättigen zu lassen. Die Aufnahmen erfolgten als unidirektionale Linienabtastung, da sich gezeigt hatte, dass bei diesem Verfahren kein Versatz zwischen den einzelnen Bildzeilen festzustellen war.

Konventionelle Immunfluoreszenz

Die Bildgebung der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte an einem inversen konfokalen Mikroskop (SP5, Firma Leica) mit einem Ölimmersionobjektiv mit 100 facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1,4 (Firma Leica), und mittels Strukturierter Beleuchtung (Apotom, Firma Zeiss) 63-fach Objektiv (Plan Apochromat 1,4 NA, Ölimmersion)

durchgeführt.

Hochauflösende Immunfluoreszenz

STED

Für STED-Mikroskopie wurden die Gefrierschnittpräparate wie oben beschrieben hergestellt. Als Fluorophor für den STED-Kanal wurde Atto 532 verwendet. Die Präparate wurden mit Mowiol eingedeckt und die Deckgläser unter leichtem Druck aufgebracht um eine möglichst dünne Schicht Eindeckmedium zwischen Präparat und Deckglas zu bekommen. Der STED-Kanal wurde einer softwaregestützten Dekonvolution mit Autoquant unterzogen.

dSTORM

Entscheidend für eine gute Qualität der dSTORM Aufnahmen ist ein geringer Abstand der Probe zum Deckglas; Neben Einbettungen des gesamten Muskels wurden deshalb auch Kryoschnitte mit einer Schichtdicke von 0,5 μm -20 μm verwendet. Durch die Schnitte konnte zum einen Hintergrundfluoreszenz reduziert werden, zum anderen garantierten die Schnitte durch die plane Oberfläche einen gleichmäßigen und geringen Abstand zum Deckglas. Deshalb wurde darauf geachtet, dass das Gewebe ohne Falten auf die Objektträger aufgezogen wurde. Insbesondere bei Färbungen an hippokampalem Gewebe wurden Gewebefalten mechanisch entfernt. Im Anschluß an die Färbung wurde der verwendete PapPen von den Objektträgern entfernt.

Bei einem Teil der Aufnahmen wurde das Gewebe direkt auf Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläser aufgezogen und die Immunfluoreszenzfärbung auf dem Deckglas durchgeführt. Für diese Färbungen wurden statt des PapPens Sylgardkammern auf das Deckglas aufgeklebt. Die vorgenannten Maßnahmen sind entscheidend, um einen möglichst geringen Abstand der Probe zum

Deckglas zu erreichen, da die Aufnahmen unter highly inclined thin illumination durchgeführt werden.

Das für die *d*STORM Aufnahmen nötige reversible Schalten der Fluorophore Alexa 647 und Alexa 532 wurde durch Zugabe von 100 mM Mercaptoethylamin (MEA, Sigma) in PBS pH 7,4 - 8,4 erreicht; Bei einigen Aufnahmen wurde dem Puffer enzymatisch Sauerstoff entzogen [5-50 Units/ml Glucoseoxidase (Sigma), 100-1000 Units/ml Katalase (Sigma), 5-10 % (w/v) Glucose]. Die *d*STORM Aufnahmen wurden in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Markus Sauer (Biozentrum, Uni Würzburg) an einem selbstgebauten *d*STORM Mikroskop durchgeführt. Für die Rekonstruktion der Daten wurde die Software rapidStorm (AG Sauer) verwendet.

Bildbearbeitung

Für die Abbildungen der konfokalen Bildgebung wurden mit ImageJ hintergrundkorrigierte, normalisierte Maximalprojektionen konfokaler Bildstapel angefertigt. Für die Darstellung in Abb. 12 wurde keine Normalisierung durchgeführt.

Bei der Darstellung von Aufnahmen in kurzen Zeitabständen wurde keine Hintergrundkorrektur vorgenommen.

Einige Bilder (Abb. 11, Abb. 14, Abb. 16, Abb. 17) wurden vor der Maximalprojektion der einer dreidimensionalen, 10-fach-iterativen Deconvolution mit Autoquant unterzogen. Die Punkt-Verteilungskurve wurde dabei von der Software aus den Meßdaten anhand der voreingestellten Parameter (Pixel size, Fluorophore, Vergrößerung, numerische Apertur, Immersionmedium, und Aufnahmemodus) abgeschätzt; zudem wurden aus den den Bilddaten Korrekturfaktoren für sphärische Abberationen errechnet.

Alle Bilder wurde mit einem Gauss Filter mit einem Radius von 1,5-2 Bildpunkten gefiltert.

Die Kolokalisationsanalysen (Abb. 16, Abb. 17) wurden softwaregestützt mit Imaris durchgeführt. Dabei wurden in den dreidimensionalen Stacks pixel

ausgewählt, die sowohl für anti-Bassoon als auch für GFP-CAST positiv waren. Die Analyse erfolgte zum einen anhand eines softwaregestützten Algorithmus als auch manuell (Pearson's Koeffizienten automatisch: -0,26 – 0,43; manuell: 0,30- 0,79). Bildpunkte mit Kollokalisierung von GFP-Cast und anti-Bassoon wurden als eigener Kanal dargestellt (Abb. 16, Abb. 17: Kollokalisationskanal).

Ergebnisse

Das notwendige Rüstzeug: Langzeitbeobachtung hippocampaler Neurone

Um Veränderungen hippocampaler synaptischer Strukturen zu beobachten und um die Möglichkeit zu schaffen, mit Einzelzellelektroporation Plasmide zu transfizieren, wurden organotypische Hirnschnittkulturen etabliert. Der Hippocampus zeichnet sich durch eine klare Histoarchitektur in Form zweier ineinandergreifender C-förmiger Bögen, dem Gyrus dentatus (GD) und dem Cornu ammonis aus. Diese Struktur kann im nativen Hippokampusgewebe bereits im Hellfeldbild dargestellt werden. Nach wenigen Wochen in Kultur zeigen die organotypischen Schnittkulturen die typische Histoarchitektur in Doppel-C Konfiguration, die durch neugebildete Zellen ergänzt wird. In Abbildung 9 A ist der GD deutlich zu erkennen (Pfeilspitzen). Um einzelne Körnerzellen darzustellen, wurden Zellsomata im Bereich des GD durch Elektroporation mit einem Transgen transfiziert, das unter dem CMV-promotor ein DsRed-Chromophor exprimiert (Abb. 9 B); Nach 12 -24 Stunden konnten anhand der DsRed-Expression Körnerzellen in typischer Morphologie und Lage identifiziert werden (Abb. 9 C). Die Unterscheidung der Körnerzellen von den Pyramidenzellen des Cornu ammonis wurde durch den charakteristischen, breit gefächerten Dendritenbaum und das Moosfaseraxon mit seinen ca. zehn großen en-passant Varikositäten ermöglicht. Von den Körnerzellen konnten ferner Zellen mit unregelmäßiger Morphologie abgegrenzt werden, die keiner Subpopulation zugeordnet werden konnten (Abb. 9 D).

Um Plastizität über längere Zeiträume darzustellen, war es notwendig, individuelle Moosfasern über lange Zeiträume zuverlässig wiederzuerkennen.

Dafür wurden Körnerzellen über Tage und Wochen wiederholt mit konfokaler Mikroskopie aufgenommen.

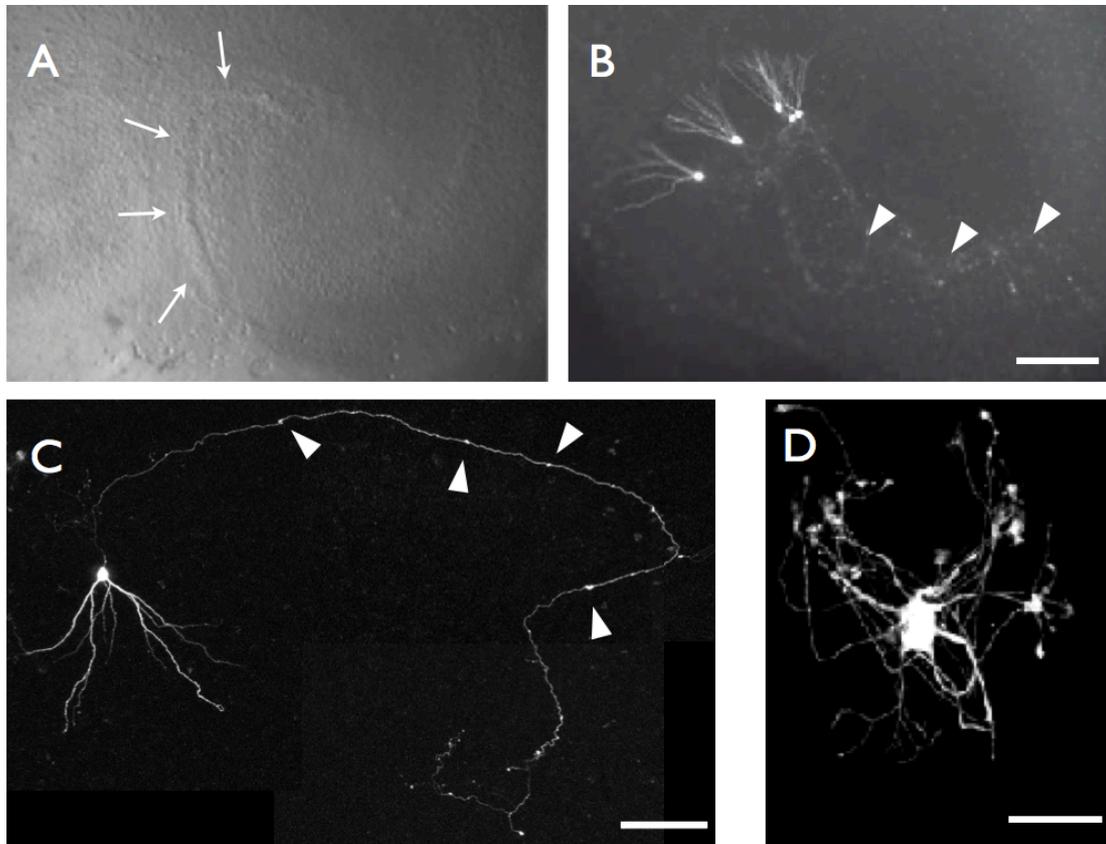


Abb. 9: Transfizierte Schnittkulturen

(A) Hellfeldaufnahme einer hippocampalen Schnittkultur. Nach ca. 21 Tagen in Kultur ist die typische Histoarchitektur des Hippocampus zu erkennen. Pfeile verdeutlichen die Lage des GD. (B) In der Überlagerung von Hellfeldbild und Epifluoreszenzaufnahme sind die DsRed-transfizierten Körnerzellen in typischer Lokalisation und Morphologie zu erkennen. Pfeilspitzen zeigen den Verlauf des Moosfasertraktes an; Skalierbalken (A und B) 50 μm . (C) Panoramaaufnahme einer transfizierten Körnerzelle; die Zellen lassen sich morphologisch anhand des charakteristischen Dendritenbaums und des langen Axons mit unregelmäßig verteilten varikösen Auftreibungen (Pfeilspitzen) identifizieren; Skalierbalken 100 μm (D) komplex geformte Zelle unklarer Identität im GD; Skalierbalken 10 μm .

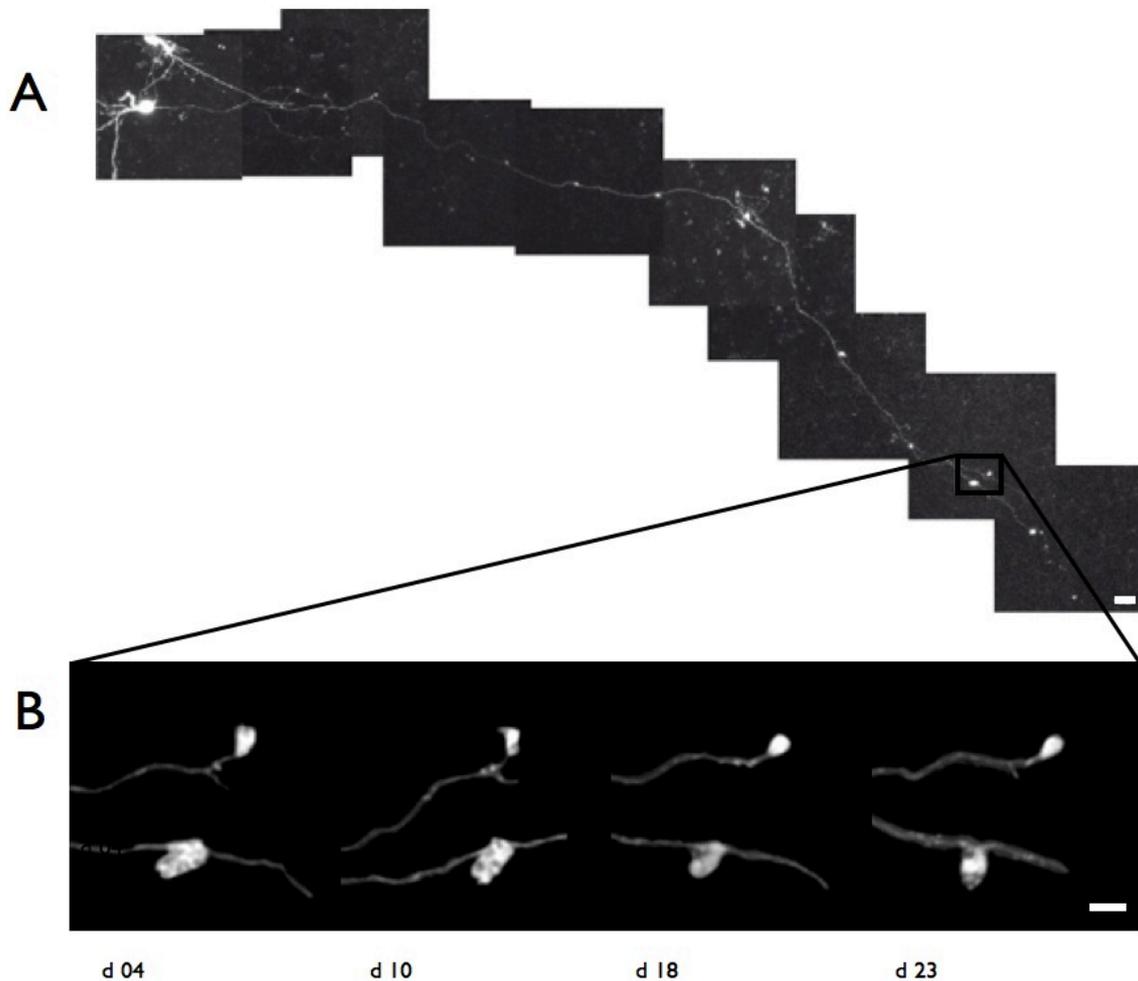


Abb. 10: Dynamik individueller Moosfaserboutons

(A) Die DsRed transfizierten Körnerzellen lassen sich über Tage und Wochen im Brutschrank kultivieren und wiederholt durch konfokale Mikroskopie darstellen; Skalierbalken 20 μm . (B) Serienaufnahme eines Moosfaserboutons zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion (d=Tage). Es zeigt sich, dass individuelle Boutons in der Schnittkultur zuverlässig über einen langen Zeitraum wiedererkannt werden. Besonders im Vergleich der Aufnahmen an den Enden der Zeitskala zeigen sich deutliche Größenänderungen der Boutons. Weiterhin auffällig ist die inhomogene Anfärbung des größeren Boutons; Skalierbalken 5 μm .

Abbildung 10 zeigt eine Körnerzelle mit dem zugehörigen Moosfaseraxon. Anhand der Axonform und der Entfernung der Boutons vom Soma konnten

auch in Schnitten mit mehreren transfizierten Neuronen einzelne Boutons über lange Zeiträume eindeutig identifiziert werden. Die Abbildung zeigt Aufnahmen zweier Moosfaserboutons, die über einen Zeitraum von 23 Tagen erstellt wurden. Deutlich zu sehen sind Veränderungen in Form und Größe der Boutons. Darüberhinaus zeigt sich eine inhomogene Anfärbung der Boutons. Dies könnte an einer ungleichmäßigen Verteilung des zytosolischen Markers DsRed liegen, mit Bereichen innerhalb des Boutons, die keinen Farbstoff enthalten. Diese nicht angefärbten Bereiche entsprechen am wahrscheinlichsten einem Negativ-Abbild dendritischer Spines, die sich in die Boutons einstülpen (Rollenhagen et al., 2007).

Die Etablierung der Einzelzell-Elektroporation an organotypischen hippocampalen Schnittkulturen bildet die Grundlage für die Untersuchung synaptischer Plastizität. Dabei bietet die Stabilität der Kulturen über Wochen und die Möglichkeit durch Einbringen von Transgenen individuelle Neurone zu markieren ideale Voraussetzungen zur Untersuchung der Dynamik Aktiver Zonen.

Aktive Zonen in Bewegung?

Um die Plastizität aktiver Zonen darzustellen, sollten Komponenten der Aktiven Zone transgen markiert und lichtmikroskopisch analysiert werden. Dafür wurden hippocampale Körnerzellen mit zwei Transgenen cotransfiziert (DsRed und GFP-CAST) und mit konfokaler Bildgebung dargestellt. Die Cotransfektion mit dem DsRed-Transgen ermöglichte das zuverlässige Wiederauffinden der transfizierten Zellen. In den DsRed-markierten Moosfasersynapsen zeigt das Fusionsprotein GFP-CAST unterschiedliche Färbemuster: Schon bei geringer Anregungsleistung fallen hell fluoreszierende, punktförmige GFP-CAST-Aggregate (Abb. 11 A) auf, die sich sowohl in den Boutons als auch in den Axonen finden. Bei hoher Anregungsleistung sind länglich gestreckte, schwach markierte Aggregate (Abb. 11 B) sichtbar, die häufig Stellen von schwächerer

DsRed-Fluoreszenz flankieren. Der besseren Verständlichkeit halber werden diese Aggregate im Folgenden als Punkte und Banden bezeichnet.

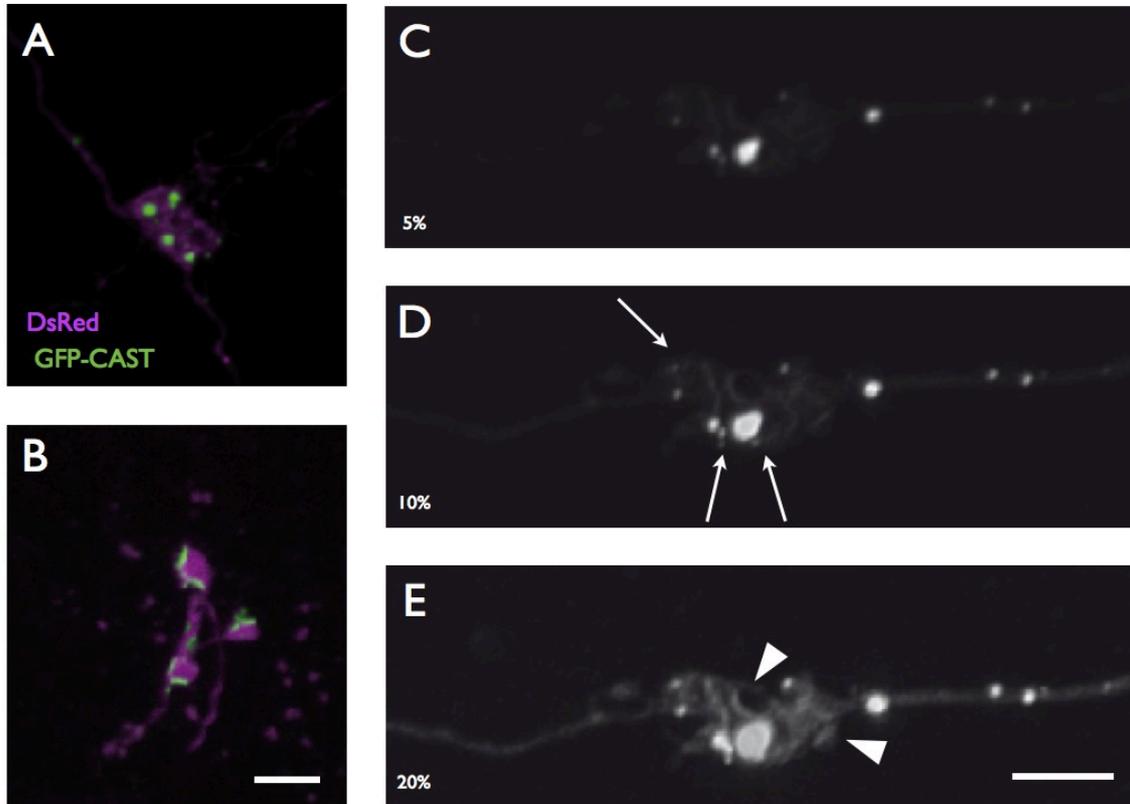


Abb. 11: präsynaptische Verteilung von GFP-CAST

Die Expression von GFP-CAST führt zu unterschiedlichen Signalmustern: **(A)** Einige Boutons zeigen hell fluoreszierende Punkte. **(B)** In anderen Boutons fallen schwächer fluoreszierende, länglich-gestreckt bis komplex geformte Banden auf; Skalierbalken **(A, B)** 5 μm . **(C)-(E)** Punkte und Banden können in einzelnen Boutons koexistieren. Bedingt durch die schwächer ausgeprägte Fluoreszenz müssen Banden mit deutlich höherer Laserleistung aufgenommen werden. Dies bedingt die Sättigung des Sensors und den Blooming-Effekt im Bereich der stark fluoreszierenden Punkte; relative Laserleistung im Bild jew. unten links; Skalierbalken **(C-E)** 5 μm .

Um zu klären, ob Punkte und Banden in individuellen Boutons koexistieren können, wurde eine Aufnahmeserie mit unterschiedlichen Anregungslichtstärken durchgeführt (Abb. 11 C-E), wobei mit der schwächsten Anregungsintensität begonnen wurde. Dabei wurde ein Überstrahlen

(Blooming-Effekt) der hell leuchtenden Punkte in den Aufnahmen mit hoher Anregungsintensität bewusst in Kauf genommen. Die Aufnahmen zeigen, dass Punkte und Banden in individuellen Boutons coexistieren.

Die Intensität der Banden variiert in den Boutons eines Axons. Abbildung 12 zeigt zwei Boutons eines Axons. Der proximale Bouton zeigt trotz höherer Anregungsintensität kein bandenförmiges Muster. Dies spricht für eine expressionsunabhängige Ursache der Anfärbungsunterschiede, z.B. einem lokal-regulierten Einbau von GFP-CAST in die Banden.

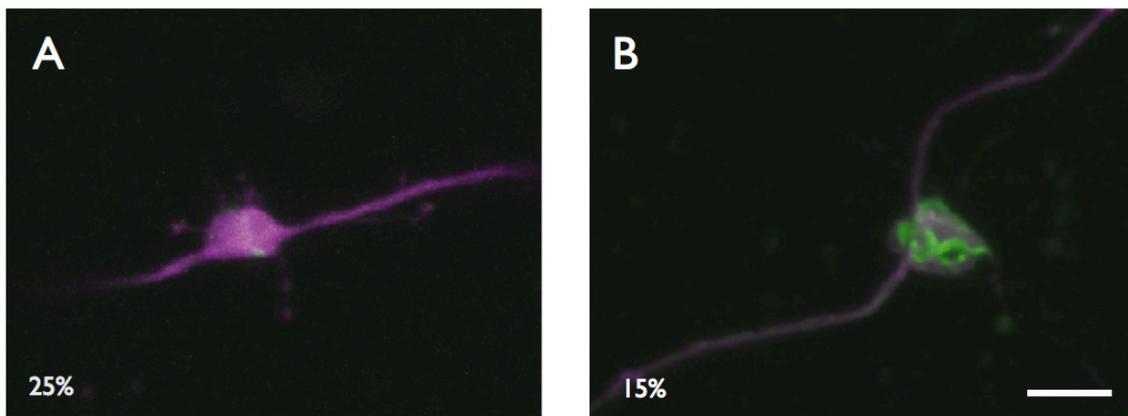


Abb. 12: Anreicherungsunterschiede zwischen Boutons eines Axons

(A) und (B): Moosfaserboutons desselben Axons; trotz höherer Anregungsintensität (relative Laserleistung) ist in Bouton (A) nur schwache GFP-CAST Fluoreszenz zu erkennen; Skalierbalken 5 μm

Fluorophor-Fusionsproteine neigen dazu, Aggregate zu bilden (Shaner et al., 2004). Um auszuschließen, dass die beobachteten punktförmigen Markierungen auf GFP-Interaktionen zurückgehen, wurde im Fusionsprotein das Fluorophor GFP gegen das Fluorophor mStrawberry ausgetauscht. In den mStrawberry-CAST transfizierten Zellen zeigten sich ebenfalls die vorher beschriebenen Punkte (Abb. 13 A), aus Gründen der spektralen Trennung wurde hier pAmCyan-C1 als transgen für die zellmarkierung verwendet.

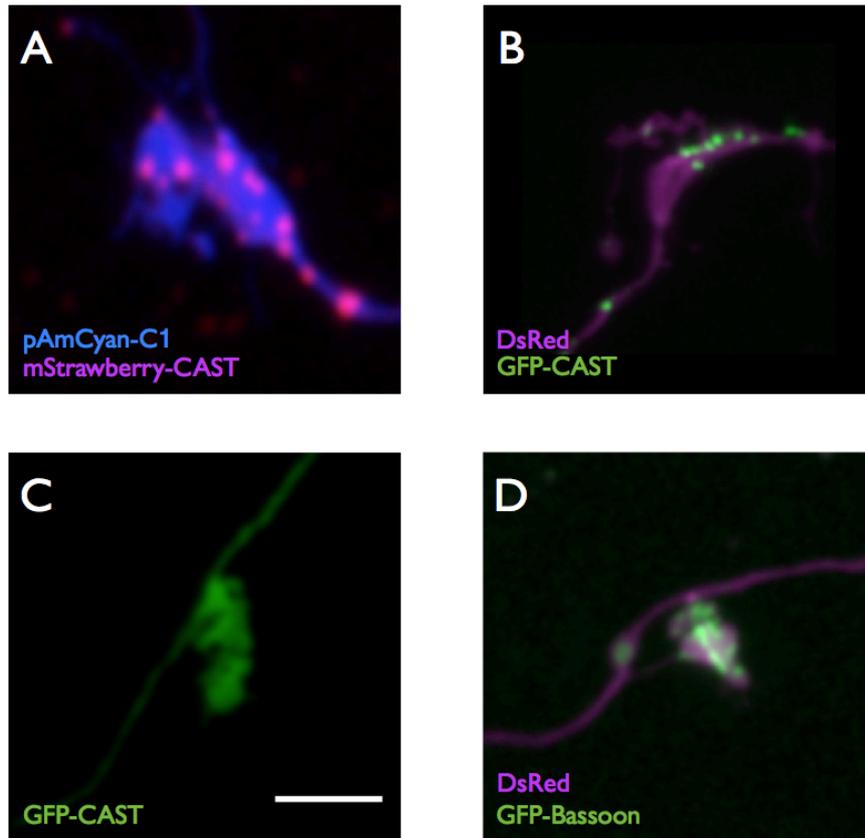


Abb. 13: CAST-spezifische Agglomeration

(A) Strawberry-CAST gleicht in seinem Fluoreszenzmuster mit Punkten und Banden dem Muster von GFP-CAST. (B) Bei Transfektion mit Konstrukt 3 (siehe Abb. 8) sind deutlich Punkte zu erkennen. (C) Transfektion mit Konstrukt 4; auffällig ist eine diffuse Färbung des gesamten Boutons ohne Bildung von Punkten oder Banden; Skalierbalken 5 μm . (D) Transfektion von GFP-Bassoon; das Muster der präsynaptischen Fluoreszenz gleicht stark dem Fluoreszenzmuster bei Transfektion mit GFP-CAST. Es zeigten sich ebenfalls Punkte und Banden; Skalierbalken 5 μm .

Um darüberhinaus zu prüfen, ob es sich bei der Aggregation um eine intrinsische Eigenschaft des CAST-Proteins handelt, wurden 2 GFP-CAST Plasmide mit unterschiedlicher Länge der CAST-DNA hergestellt (s.a. Abb. 8: GFP-CAST-1-901 und GFP-CAST-2701-2871). Vergleicht man die Färbemuster beider Fragmente (Abb. 13 B und C), zeigten sich in den Transfektionen mit dem N-terminalen CAST-Fragment Punkte, wohingegen das C-terminale Fragment eine diffuse zytoplasmatische Färbung aufwies. Die Ergebnisse

verdeutlichen, dass es sich bei den Punkten um eine CAST und nicht GFP vermittelte Aggregation handelt, zu der die N-terminale Aminosäuresequenz entscheidend beiträgt.

Um die strukturelle Relevanz von Punkten und Banden für die Architektur der Aktiven Zone besser zu verstehen, wurde ein Vergleich mit weiteren synaptischen Markern durchgeführt. Dazu wurden Körnerzellen mit dem Fusionsprotein GFP–Bassoon - einem weiteren AZ-Protein - transfiziert. In der konfokalen Bildgebung zeigt sich ein mit den GFP-CAST Transfektionen vergleichbares Färbemuster.

Um die Plastizität Aktiver Zonen darzustellen, sollte die Dynamik des GFP-CAST Signals geprüft werden. Dazu wurden GFP-CAST transfizierte Moosfaserboutons in unterschiedlichen Zeitintervallen aufgenommen. In Abbildung 14 werden die strukturellen Veränderungen von GFP-CAST bei einem Aufnahmeintervall von 7 Stunden verdeutlicht. Dazu wurden zwei konfokale Aufnahmen des transgenen Proteins farblich codiert überlagert. Die magenta-gefärbten Punkte und Banden repräsentieren die erste Aufnahme, die grün markierten die zweite Aufnahme. Somit stellen sich Banden, die zu beiden Zeitpunkten an derselben Stelle nachgewiesen werden konnten, durch die spektrale Überlagerung von magenta und grün weiß dar, solche, die nur bei der ersten Aufnahme zu sehen waren, magenta. Banden, die wiederum erst während des Aufnahmeintervalls entstanden, sind grün abgebildet. Die weißen Linien geben die Umrisse des Boutons wieder. Innerhalb des Zeitintervalls sind deutliche Veränderungen der Form und Anzahl des GFP-CAST Signals zu sehen. Beispielhaft ist mit einem Pfeil eine neu entstandene Bande markiert. In den Aufnahmen konnten noch weitere dynamische Prozesse aufgezeigt werden. Der an der Axonmündung hervorgehobene Punkt (Pfeilspitze) verschwand innerhalb des Zeitintervalls. An seiner Stelle fand sich eine langgestreckte Bande (grün), unweit derer ein neuer CAST-Punkt detektierbar

wurde. Aufgrund des großen Zeitintervalls zwischen den Aufnahmen kann man nicht sicher davon ausgehen, dass es sich um denselben Punkt handelte. Dennoch unterstützen diese Beobachtungen die These, dass es sich bei den CAST-Punkten um Transportvesikel für AZ-Proteine handeln könnte. Im Sinne von AZ-Transportvesikeln könnte man den neu detektierten Punkt als Transportvesikel nach Abgabe von AZ-Proteinen an die neu entstandene Bande interpretieren. Für eine abschließende Beurteilung fehlen allerdings molekulare Marker die eine zuverlässige Identifizierung von PTV's ermöglichen könnten.

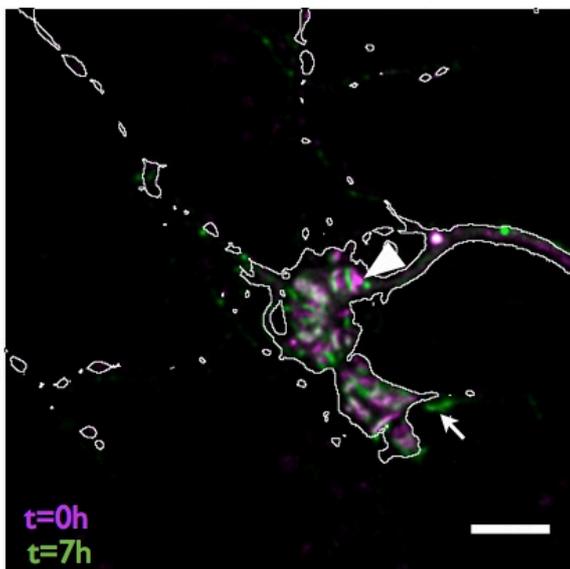


Abb. 14: Plastizität des GFP-CAST-Signals

Farbcodierte Überlagerung zweier Aufnahmen im Abstand von 7 Stunden; dargestellt ist die GFP-CAST Fluoreszenz zum Zeitpunkt $t=0\text{ h}$ in magenta und zum Zeitpunkt $t=7\text{ h}$ in grün. Skalierbalken $5\ \mu\text{m}$.

In den bisher beschriebenen Experimenten wurden Zeitserien mit Intervallen von mehreren Tagen bis hin zu wenigen Stunden durchgeführt. Für die Auswertung schneller dynamischer Prozesse unzureichend sind solche Zeitintervalle jedoch unzureichend. Starkes Photobleichen machte eine Reinkubation im Brutschrank zum Erholen der Fluorophore notwendig. Durch die erforderlichen Medienwechsel und Reinkubationszeiten konnten nur Aufnahmeintervalle im Stundenbereich erreicht werden. Im Brutschrank unterschieden sich Temperatur, Medium und Atmosphäre von den Aufnahmebedingungen. Um den Einfluss der Temperatur auf das

Aufnahmeintervall zu testen, wurden Zeitserien bei einer Raumtemperatur von 37 °C durchgeführt. Bei den Aufnahmen konnte das Aufnahmeintervall auf 15 Minuten reduziert werden. Auch bei diesen kurzen Zeitintervallen zeigten sich deutliche Veränderungen der Aktiven Zonen (Abb. 15). Die Pfeilspitze deutet auf einen Bereich, in dem eine Bande neu entsteht. Noch weitaus deutlicher treten die Umbauvorgänge am Übergang zum Axon zutage, wo innerhalb des Aufnahmeintervalls eine Bande intermittierend entsteht und wieder verschwindet (Pfeile). Die Aufnahmen verdeutlichen die hohe Proteindynamik der Moosfasersynapsen selbst während kleiner Zeiträume.

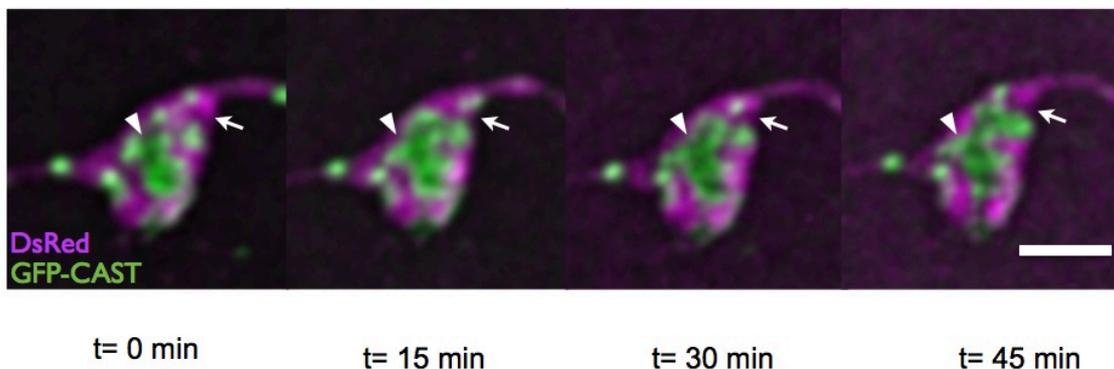


Abb. 15: Dynamik der GFP-CAST-Signale im Minutenbereich

Aufnahmen bei 37°C; Durch Erhöhung der Badtemperatur konnte das Aufnahmeintervall deutlich verkürzt werden. In den zeitlich hochauflösenden Aufnahmen zeigen sich deutliche Veränderungen der GFP-Fluoreszenz. Pfeile und Pfeilspitzen verdeutlichen Gebiete mit auffälligen Änderungen. Skalierbalken 2 μm .

Die vorhergehenden Experimente hatten gezeigt, dass sowohl Punkte als auch Banden auf intrinsische Eigenschaften von CAST zurückgehen. Um zu klären, welches der Signale das Korrelat Aktiver Zonen war, wurden organotypische Schnittkulturen nach konfokaler Bildgebung fixiert und 10 μm dicke Gefrierschnittpräparate angefertigt. Anhand des DsRed-Signals konnten einzelne Boutons aufgefunden und den konfokalen Aufnahmen zugeordnet werden.

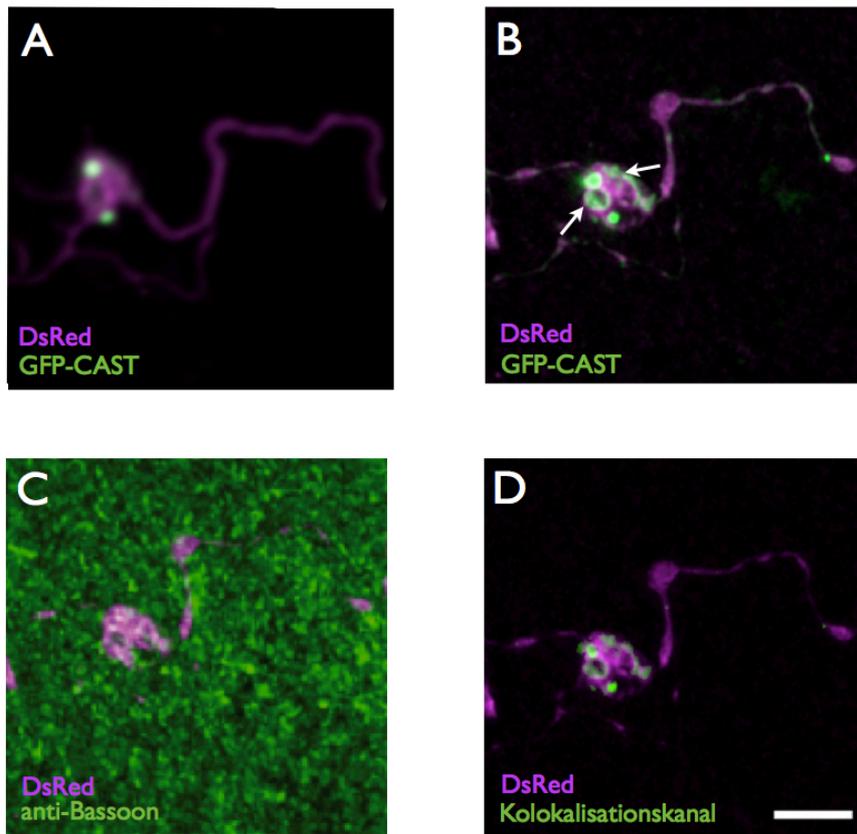


Abb. 16: Doppelfärbung Aktiver Zonen

Immunfluoreszenzfärbungen an 10 μm dicken Gefrierschnitten von transfizierten Moosfaserboutons; **(A)** Die Aufnahme eines hippocampalen Moosfaserboutons zeigt zwei Punkte, aber keine Banden. **(B)** Nach Fixierung und histologischer Aufbereitung lassen sich einzelne Boutons wieder eindeutig anhand ihrer Form und des Verlaufs des entsprechenden Axons identifizieren. Im Bouton sind nun auch Banden darstellbar (Pfeile). **(C)** Immunfluoreszenzfärbung mit anti-Bassoon **(D)** Kolokalisationsanalyse von GFP-CAST und anti-Bassoon: der Kolokalisationskanal (grün) zeigt Bildpunkte, in denen GFP-CAST und anti-Bassoon kolokalisieren. Es fällt eine klare Kolokalisation von CAST und anti-Bassoon im Bereich der Banden und im Bereich der Punkte auf. Skalierbalken 5 μm

Um Aktive Zonen innerhalb der Boutons zu visualisieren, wurden an den Gefrierschnitten Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen das AZ-Protein Bassoon durchgeführt. In transfizierten Moosfaserboutons ließen sich Kolokalisationen zwischen GFP-CAST und anti-Bassoon nachweisen. So konnten individuelle Moosfaserboutons in der lebenden Schnittkultur und

anschließend im Gefrierschnittpräparat visualisiert werden (Abb. 16) Anhand der individuellen Morphologie der Synapse und des Verlaufs des Axons ließen sich Boutons eindeutig identifizieren. Es fällt auf, dass neben den Punkten, die bereits im lebenden Präparat zu sehen waren, nun auch Banden zu sehen sind (Abb. 16 B: ringförmige Bande; langgestreckte Bande). Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich an der Verwendung lichtstarker Ölimmersionsobjektive mit hoher numerischer Apertur bei der Aufnahme der fixierten Präparate. In den Präparaten war eine dichte anti-Bassoon-Immunfluoreszenz detektierbar, da auch ausserhalb der transgen markierten Boutons Synapsen mit Aktiven Zonen liegen. Sowohl in Punkten als auch in Banden kolokalisieren GFP-CAST und anti-Bassoon (Abb. 16 D).

In weiteren Boutons können ebenfalls Kolokalisationen in Punkten (Abb. 17 A) wie in Banden (Abb. 17 B) nachgewiesen werden. Dabei fällt auf, dass Banden stets Kolokalisationen aufweisen, Punkte jedoch nur teilweise.

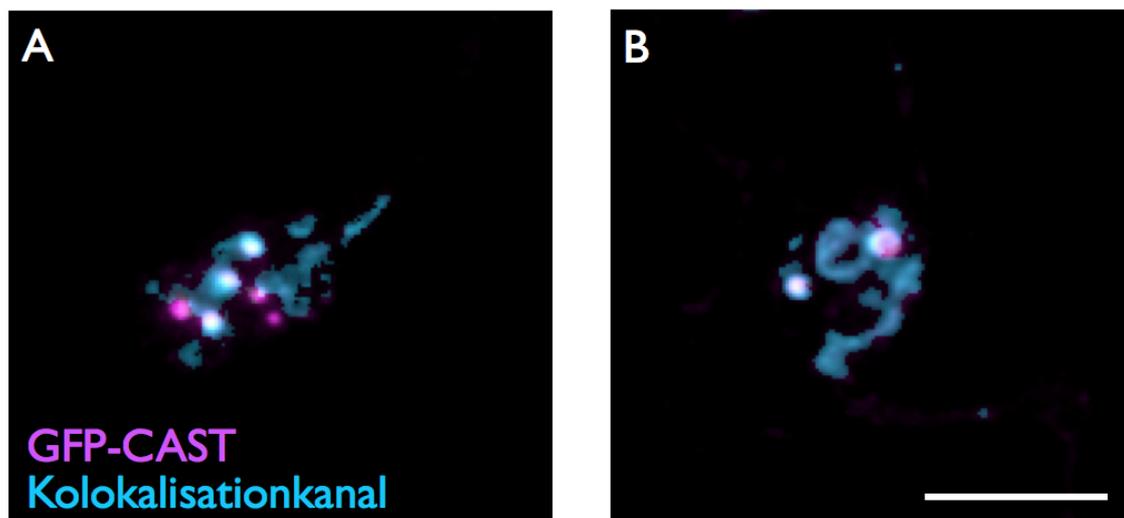


Abb. 17: Partielle Kolokalisation von GFP-CAST und anti-Bassoon

In weiteren Kolokalisationsanalysen zeigt sich ein heterogenes Bild.

(A) und (B) zeigen die Überlagerung des Kokalisationkanals (cyan) mit dem GFP-CAST-Signal (magenta). (A) Einige GFP-CAST-Punkte zeigen klare Kolokalisation mit der Bassoon-Immunfluoreszenz, andere kolokalisieren nicht. (B) Die komplexen Formen der Banden kolokalisieren in beiden Kanälen sehr gut; Skalierbalken 5 μm .

Aus der Schnittkultur ins native Gewebe

Bei der Darstellung Aktiver Zonen in der organotypischen Schnittkultur wurde klar, dass die Diffraktionslimitierung konventioneller Lichtmikroskopie ein entscheidendes Hindernis bei der Bestimmung zahlreicher Parameter wie Anzahl und Größe, und damit auch der Bewertung plastischer Prozesse darstellt. Im vergangenen Jahrzehnt wurden unterschiedliche lichtmikroskopische Techniken entwickelt um die Diffraktionsgrenze zu umgehen (Hell, 2007). Um hippocampale Moosfasersynapsen mit höchstauflösender Lichtmikroskopie darzustellen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen an fixiertem ZNS von THY1-EGFP-Mäusen angefertigt und mit konfokaler Mikroskopie aufgenommen. Immunfluoreszenzfärbungen gegen das AZ-Protein Bassoon wurden so als Referenzmarker für Aktive Zonen etabliert. In den Gefrierschnitten von THY1-EGFP-Hirnen ließen sich angeschnittene Moosfaseraxone mit großen en-passant-Synapsen klar erkennen (Abb. 18). In der Immunfluoreszenz zeigte Bassoon im Moosfasertrakt ein klar gruppiertes Muster. Die Gruppierungen ließen sich einzelnen Moosfaserboutons zuordnen: Eine Bassoon-Gruppe entsprach den Aktiven Zonen eines Boutons. Eine komplette Kolokalisation war nicht zu erwarten, da in dieser Tierlinie nicht alle Körnerzellen GFP markiert sind, so dass zwischen den markierten Boutons im Bild noch zahlreiche weitere Synapsen zu erwarten sind.

Das gruppierte anti-Bassoon-Signal wurde als Referenzmarker benutzt, um in Doppelfärbungen mit anti-CAST individuelle Boutons indirekt nachzuweisen. In den Doppelfärbungen mit anti-CAST und anti-Bassoon zeigten sich deutliche Kolokalisationen im Bereich der Bassoon-Gruppierungen. In den dicht gelabelten Boutons ließen sich Banden und Punkte nicht unterscheiden.

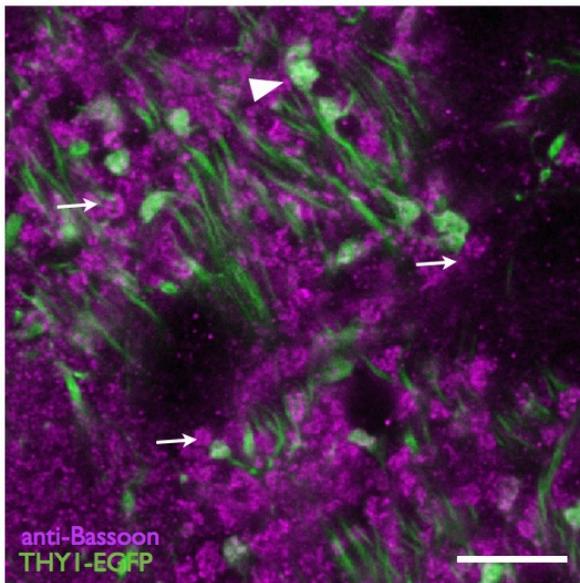
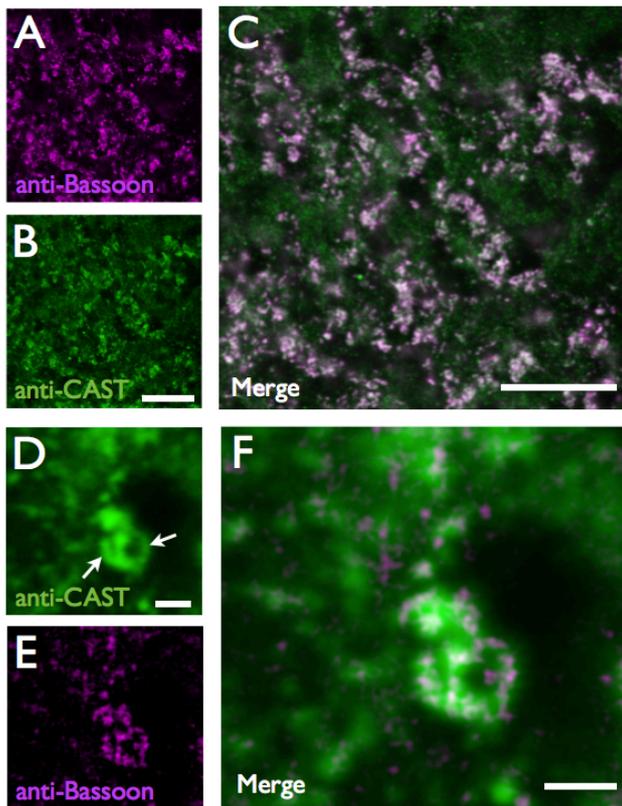


Abb. 18: Bassoon-Immunfluoreszenz im nativen Gewebe von Thy1-EGFPm-Mäusen

Immunfluoreszenzfärbung Aktiver Zonen im Hippocampus von THY1-EGFP Mäusen. Als Marker für Aktive Zonen wurde ein Antikörper gegen das AZ-Protein Bassoon verwendet. Im gewählten Ausschnitt aus dem Moosfasertrakt mit GFP-markierten Moosfaseraxonen fällt die Clusterung des Bassoon-Signals in kleine

Gruppen (Pfeile) auf. In der Überlagerung beider Kanäle lassen sich einzelne Gruppen jew. einem Bouton (Pfeilspitze) zuordnen. Skalierbalken 10 μm

Um Punkte und Banden besser in die Architektur Aktiver Zonen einzuordnen, wurden mit STED-Mikroskopie hochaufgelöste Bilder angefertigt (Abb 19). In grün ist die anti-CAST-Immunfluoreszenz mittels konfokaler Bildgebung dargestellt, magenta zeigt die anti-Bassoon-Immunfluoreszenz mit STED-Mikroskopie. In den Aufnahmen zeigte die anti-CAST-Immunfluoreszenz dabei bandenförmige Strukturen, die in der Hochauflösung der anti-Bassoon-Immunfluoreszenz teilweise zu einer Aneinanderreihung einzelner Punkte zerfielen. Dies verdeutlicht, dass eine Unterscheidung in Punkte und Banden in erheblichem Maße von den optischen Eigenschaften des verwendeten Mikroskops abhängt. Es wird deutlich, dass die Umgehung der lichtmikroskopischen Auflösungsgrenze eine entscheidende experimentelle Anforderung an strukturelle Untersuchungen Aktiver Zonen ist.



**Abb. 19: Immundoppelfärbung mit anti-CAST und anti-Bassoon:
Überschreiten der Abbe'schen Grenze...**

Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von anti-CAST und anti-Bassoon im nicht fixierten Mäusehippocampus

(A) Die anti-Bassoon Immunfluoreszenz zeigt ein gruppiertes Muster, wobei eine Gruppe einem Bouton entspricht. (B) In der anti-CAST-Immunfluoreszenz lassen sich Cluster darstellen. (C) In der Überlagerung beider Kanäle zeigt sich im Bereich der Cluster eine klare Kolokalisation des anti-CAST und des anti-Bassoon-Signals. Skalierbalken 10 μm (D-F) Detailaufnahme eines Clusters mittels STED-Mikroskopie; In grün ist die anti-CAST-Immunfluoreszenz mittels konfokaler Bildgebung dargestellt, magenta zeigt die anti-Bassoon-Immunfluoreszenz mit STED Bildgebung. (D) In der konfokalen Bildgebung der CAST-Immunfluoreszenz zeigen sich länglich-gebogene Banden (Pfeile). (E) anti-Bassoon-Färbung bei STED-Auflösung. Die langgestreckten Banden lassen sich als Aneinanderreihung kleinerer Signale darstellen. (F) In der Überlagerung beider Kanäle fällt die Kolokalisation von anti-CAST und anti-Bassoon in den Clustern auf. Skalierbalken 2 μm

Vorzüge der Symmetrie: Molekulare Architektur von Synapsen

Die vorausgehenden Ergebnisse zeigen, dass die Beschreibung von Aktiven Zonen und insbesondere die Beschreibung von plastischen Prozessen deutlichen Einschränkungen durch die lichtmikroskopischen Auflösungsgrenzen unterliegen. Dabei erschwert nicht nur die Auflösungsgrenze die Darstellung der nanoskopischen Aktiven Zonen, zusätzlich behindert auch die geringe Auflösung in z-Ausrichtung eine Beurteilung ihrer unregelmäßigen, dreidimensionalen Anordnung in den vergleichsweise großen Moosfaserboutons. Darüberhinaus erschwert insbesondere die ausgeprägte Plastizität der Moosfaserboutons die Erstellung einer detaillierten Karte synaptischer Proteine.

Höchstaufauflösende Lichtmikroskopie mit der *d*STORM Methode erlaubt heutzutage laterale Auflösungen bis zu 10 nm und bietet damit die Voraussetzung, Substrukturen in Aktiven Zonen aufzuzeigen. Um die Schwierigkeiten zu umgehen, die aus den Besonderheiten der Moosfaserboutons resultieren, wurde die neuromuskuläre Endplatte von Mäusen als Präparat für hochauflösende Lichtmikroskopie gewählt. Durch die Anordnung der Aktiven Zonen entlang der postsynaptischen Falten an der Muskelfasermembran hat diese Synapse einen zweidimensionalen Charakter. Durch diese Zweidimensionalität, die symmetrische Organisation der AZ-Proteine und die gute elektronenmikroskopische Charakterisierung bietet diese Synapse ideale Voraussetzungen für die Analyse der Architektur Aktiver Zonen.

Um die räumliche Anordnung Aktiver Zonen-Proteine in der neuromuskulären Endplate mit *d*STORM zu analysieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen der präsynaptischen AZ-Proteine Piccolo und Bassoon angefertigt. In beugungsbegrenzten Epifluoreszenzaufnahmen zeigten beide synaptischen Marker ein punktiertes Färbemuster (Abb. 20 A, B).

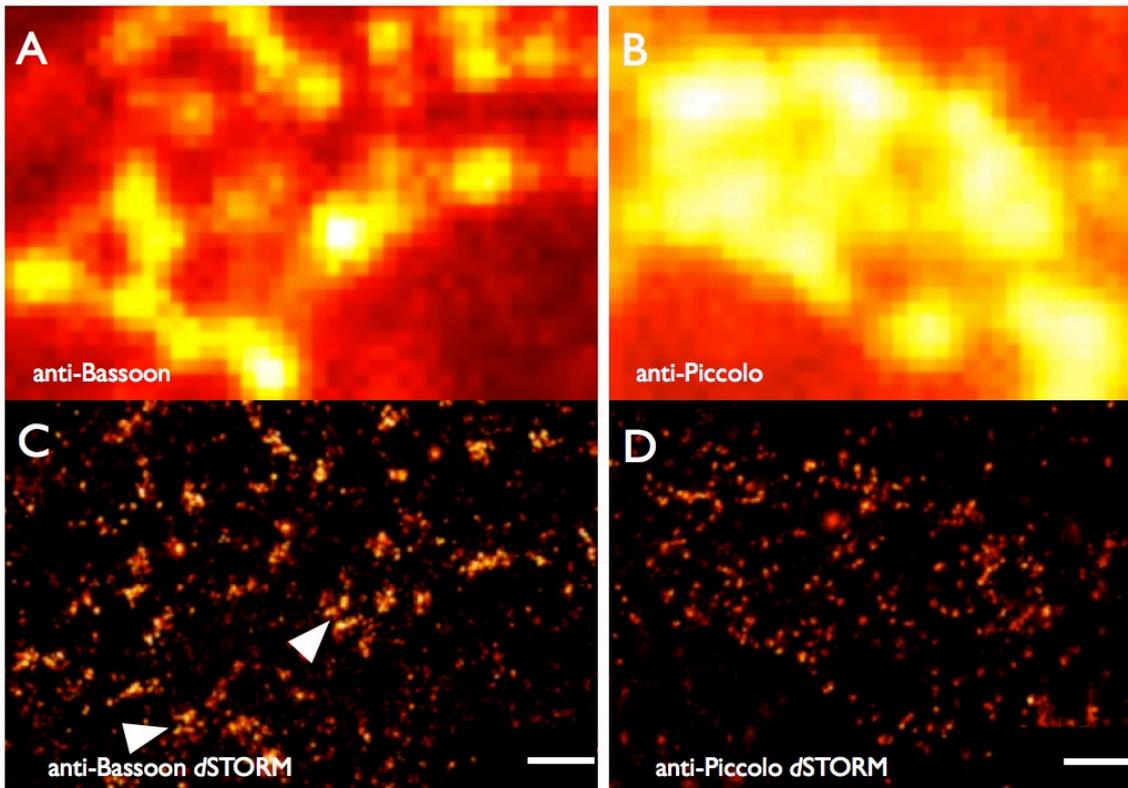


Abb.20: ... und noch vier mal weiter: Vergleich von Piccolo und Bassoon mit einer lateralen Auflösung von 20 nm

Epifluoreszenzbild und *d*STORM Bildgebung **A** und **B** zeigen beugungsbegrenzte Muster präsynaptischer Proteine in konventioneller Epifluoreszenzbildgebung mit anti-Bassoon und anti-Piccolo. Hochauflösende *d*STORM Bildgebung läßt rechteckige Bassooncluster (**C**) mit einer Länge von 120-150 nm und einer Breite von 80-100 nm erkennen, wohingegen sich mit anti-Piccolo (**D**) diskrete Punkte zeigen; Skalierbalken = 500 nm in **A-D**.

In der hochauflösenden Bildgebung fallen in der Bassoon-Immunfluoreszenz rechteckige Cluster auf, die zum Teil eine in der Längsachse verlaufende zentrale Aufhellung aufwiesen (Pfeilspitzen). Die Cluster haben dabei eine Größe von ca. 80 nm in der Querachse und 120 nm in der Längsachse. Bedenkt man die räumliche Ausdehnung der Primär- und Sekundärantikörper von 10-20 nm, lassen sich diese Daten gut zu Auswertungen elektronenmikroskopischer Aufnahmen Aktiver Zonen in

Beziehung setzen. Interpretiert man die Cluster als einzelne Aktive Zonen, würde die zentrale Aufhellung dem Bereich entsprechen, an dem exozytosebereite synaptische Vesikel gebunden sind. Die hochaufgelöste Bildgebung von anti-Piccolo zeigte kleine diskrete Punkte und somit klare Unterschiede zu den anti-Bassoon-Färbungen.

Die Ergebnisse sind ein klarer Hinweis, dass Piccolo und Bassoon in unterschiedlichen Kompartimenten der Aktiven Zone lokalisiert sind. Versucht man mit diesen Daten den genannten Proteinen die Aktiven Zonen-Strukturen "pegs, ribs und beams" zuzuordnen, könnte man Bassoon im Bereich der "pegs" oder "ribs" verorten, wohingegen Piccolo eher im Bereich der "beams" lokalisieren würde. Um diese Aussagen zu verifizieren, sind weitere Studien mit Mehrkanal-*d*STORM Aufnahmen notwendig. Die bisherigen Ergebnisse zeigen jedoch, dass die *d*STORM-Technologie in der Lage ist, ultrastrukturelle Informationen in Aktiven Zonen zu erheben.

Die präsynaptischen Aktiven Zonen liegen postsynaptischen Falten gegenüber, an deren Rand nikotinische Acetylcholinrezeptoren lokalisiert sind. Elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten die Weite der postsynaptischen Falten mit ca. 50-100 nm und damit unterhalb der lichtmikroskopischen Diffaktionsgrenze bestimmen. Aufgrund der Lage und Ausrichtung der Aktiven Zonen entlang der Falten sollten postsynaptische Falten mit *d*STORM als Referenzsignal etabliert werden. Dazu wurden Färbungen der postsynaptischen Rezeptorfelder mit fluorophormarkiertem Bungarotoxin angefertigt. Bungarotoxin bindet dabei an beide Bindestellen der postsynaptischen Acetylcholinrezeptoren (Ralston et al., 1987; Kubalek et al., 1987). Die Bungarotoxin-Färbungen zeigen die Ausdehnung der neuromuskulären Endplatten an, die mit fingergerartigen Strukturen die innervierte Muskelfaser partiell umgreifen. In der konventionellen Lichtmikroskopie zeigen diese „Finger“ unregelmäßig angeordnete Streifen, die den postsynaptischen Falten entsprechen. Die Öffnung der Spalten lässt sich in der konventionellen Lichtmikroskopie nicht darstellen. Abbildung 21 zeigt einen Ausschnitt aus einer Endplatte mit hochauflösender Lichtmikroskopie. Im Ausschnitt sind mehrere

postsynaptische Falten angeschnitten (Pfeile). Die *d*STORM- Technik ermöglicht die Darstellung der Faltenöffnung mit einer Weite von 70 -100 nm. Die dreidimensionale Anordnung der Endplatten im Präparat führt dazu, dass einige Bereiche der Endplatten defokussiert sind. In diesen Bereichen lassen sich die Faltenöffnungen nicht darstellen.

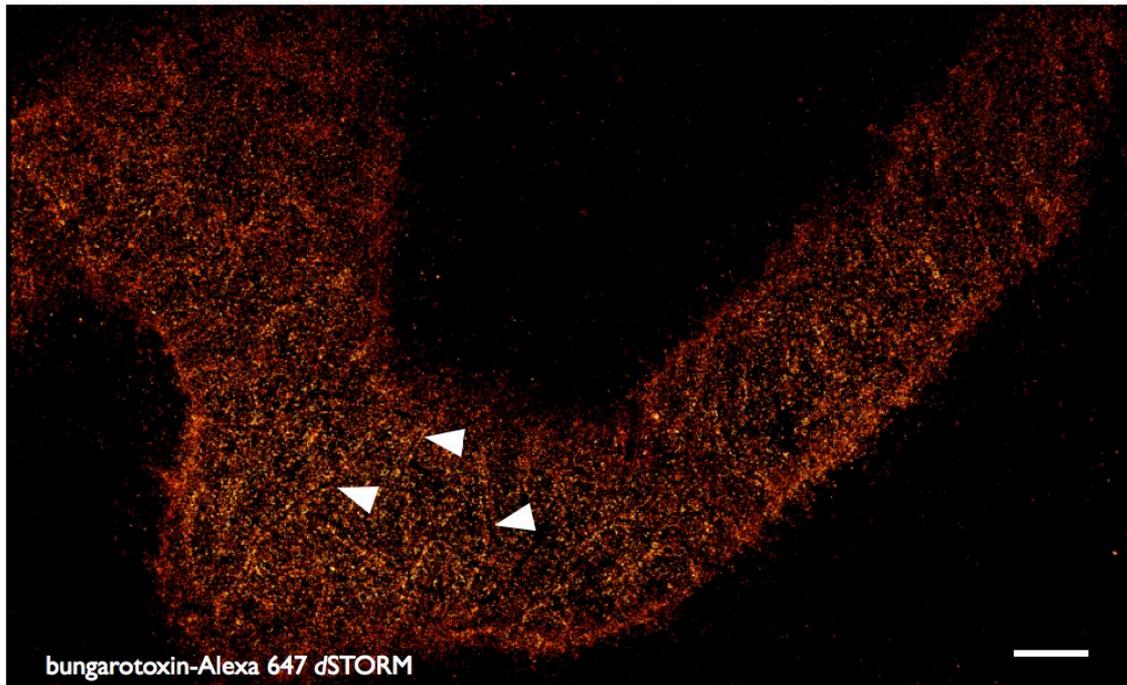


Abb. 21: *d*STORM-Bildgebung postsynaptischer Falten

Bungarotoxin-Färbung postsynaptischer Acetylcholinrezeptoren; die hochauflösende Bildgebung zeigt die 70-100 nm breiten Öffnungen der postsynaptischen Falten (Pfeilspitzen).

Hochauflösende Mikroskopie in Schnittkulturen

Die vorausgehenden Experimente haben gezeigt, dass die Überwindung der lichtmikroskopischen Auflösungsgrenzen eine der entscheidenden Herausforderungen zur optischen Untersuchung Aktiver Zonen ist. *d*STORM ermöglicht die Darstellung Aktiver Zonen in bisher lichtmikroskopisch nicht erreichter Auflösung.

Im folgenden Abschnitt sollen technische Lösungen vorgestellt werden, die es ermöglichen, hochauflösende Mikroskopie auch an lebenden Präparaten

durchzuführen. Um die hohe Auflösung zu erreichen, müssen die Präparate bestimmten Anforderungen genügen. Zum einen ist die Verwendung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur und zum anderen ein möglichst geringer Abstand der Präparate zum Deckglas notwendig. Dies bei lebenden Präparaten zu erreichen, erfordert die Verwendung von inverser Mikroskopie, da Objektive mit hoher numerischer Apertur (anders als die in der Schnittkultur verwendeten Wasserimmersionsojektive) Öl als Immersionsmedium verwenden. Ferner folgt aus der Tatsache, dass in Stoppini-Kulturen durch die Zellkulturmembranen hindurch lichtmikroskopische Bildgebung nicht möglich ist, die Notwendigkeit, die Kulturen für inverse Mikroskopie umzudrehen. Die Zellkulturmembranen werden vom Hersteller fest an einem Kunststoffring befestigt, der auf der Seite der Kulturen einen Rand von 5 mm aufweist. Da dieser Rand ein Annähern der semipermeablen Membran an ein Deckglas verhindern würde, wurde vor der Herstellung der organotypischen Kulturen der Rand der Membranen bis auf eine Höhe von ca. 1 mm abgedreht. Die Membranen wurden dazu in einer maßgefertigten Spannzange eingespannt. Abbildung 22 A zeigt den Herstellungsprozess; im Vergleich der Originalmembran mit der bearbeiteten Membran ist deutlich die Verringerung der Randhöhe zu sehen.

Um die modifizierten Membranen mit inverser Mikroskopie aufzunehmen, wurde eine spezielle Badkammer entwickelt, die es ermöglicht, den kultivierten Hippocampusschnitt an ein exzentrisch im Kammerboden eingelassenes Deckglas anzunähern. Die Membran wird dazu mit der Kultur nach unten mit dem Fixierring in der Kammer arretiert. Das Feingewinde des Plexiglasstempels ermöglicht nun die präzise Annäherung der Kultur an das Deckglas (Abb. 22 B). Die Verwendung dieser Badkammer ermöglicht es, Stoppini-Kulturen an inversen Mikroskopen zu betrachten, ohne die Membran zerschneiden zu müssen (Seidl et al, 2010).



Abb. 22: Mit α Storm in die Schnittkultur

Inverse Mikroskopie bietet den Vorteil Objektive mit hoher numerischer Apertur zu verwenden. **(A)** Für die Bildgebung am Inversen Mikroskop mussten die Zellkulturmembranen modifiziert werden. Mit der angefertigten Spannzange (links) konnte der Rand der Zellkulturmembranen auf der Drehbank entfernt werden (Mitte). Der Vergleich der Original- mit der modifizierten Membran (rechts) zeigt den Unterschied in der Randhöhe. **(B)** Meßkammer für Inverse Mikroskopie; die Schnittkulturen werden mit dem Schnitt nach unten in der Kammer mit dem äußeren Gewinding fixiert. Der Stempel ermöglicht das Annähern des Schnittes an den Deckglasboden.

Eine weitere Methode, organotypische Schnittkulturen inverser Mikroskopie zugänglich zu machen sind sog. Rollertubekulturen. Die Hippocampuschnitte werden in diesem Fall nicht auf Membranen gegeben, sondern auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern mit einem Tropfen gerinnenden Hühnerplasmas festgeklebt. Da nun der Stoffaustausch der Kulturen sowohl mit dem Kulturmedium als auch mit der

Brutschrankatmosphäre nur noch von einer Seite erfolgen kann, werden die Kulturen in einer rotierenden Trommel im Brutschrank inkubiert, so dass sie in zeitlichem Wechsel entweder mit der flüssigen oder der Gasphase in Kontakt kommen. Im Verlauf einiger Wochen kommt es zu einer Ausdünnung der Zellschichten, so dass schließlich noch eine Zellschicht hippocampustypisch organisierter Zellen übrig bleibt. Diese können ebenso wie die Stoppini-Kulturen mit Elektroporation transfiziert werden.

Damit konnten hippocampale Körnerzellen in typischer Morphologie dargestellt werden (Abb. 23 A). Die Transfektion mit GFP-CAST zeigte ebenfalls ein Muster aus Punkten und Banden. Durch das Festwachsen auf dem Deckglas wird gleichzeitig ein sehr geringer Abstand erreicht, so dass diese Präparate für hochauflösende Lichtmikroskopie anwendbar werden.

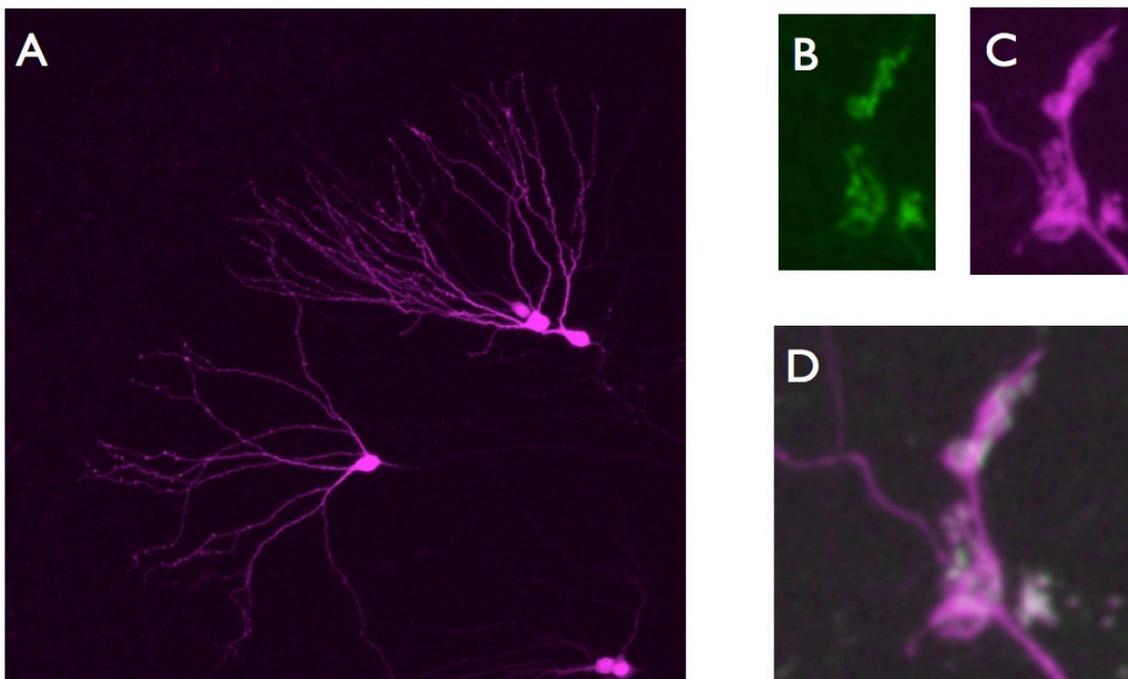


Abb. 23: Rollertube Kulturen

(A) In Rollertube-Kulturen mit DsRed markierte Körnerzellen zeigt sich die typische Zellmorphologie. (B) GFP-Bassoon und DsRed (C) cotransfizierter Moosfaserbouton; Auch in den Rollertube-Kulturen zeigt sich das typische Muster aus Punkten und Banden. (D) Überlagerung beider Kanäle.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden präsynaptische Aktive Zonen lichtmikroskopisch analysiert. Dabei zeigte sich eine hohe Dynamik hippocampaler Aktiver Zonen und spezifische Verteilungen präsynaptischer Proteine. Im Folgenden möchte ich zunächst auf die Bedeutung der organotypischen Schnittkultur für Plastizitätsexperimente und die spezifischen Schwierigkeiten der transgenen Expression in diesem Präparat eingehen. Anschließend sollen die Ergebnisse aus den Versuchen zur Darstellung der Plastizität Aktiver Zonen im Kontext aktueller Studien betrachtet werden. Abschließend sollen die Ergebnisse aus der hochauflösenden Bildgebung in Relation zu elektronenmikroskopischen Daten betrachtet werden und Perspektiven für die Anwendung hochauflösender Lichtmikroskopie zur Darstellung von synaptischer Plastizität aufgezeigt werden.

Organotypische Schnittkulturen

Plastizität ist eine der herausragenden Eigenschaften unseres Gehirns und nach heutigem Verständnis wichtige Voraussetzung für Lernen und Gedächtnis. In den vergangenen 20 Jahren hat sich unser Verständnis vom Ausmaß der Plastizität deutlich geändert. Nachdem über viele Jahre das Dogma eines auf zellulärer Ebene statischen Gehirns herrschte, haben Erkenntnisse über die Bedeutung adulter Neurogenese für Lern- und Gedächtnisaufgaben aufzeigen können, dass sich Plastizität auf unterschiedlichen Organisationsebenen vollzieht (Deng et al. 2010; Gross 2000; Raineteau et al., 2004; Schmidt-Hieber et al., 2004). Bisher wurde Plastizität elektrophysiologisch charakterisiert (Bliss und Lomo, 1973). Dadurch erfolgte eine Fokussierung auf funktionelle Aspekte der synaptischen Plastizität. Mit der Entdeckung und Weiterentwicklung fluoreszierender Proteine wurde es möglich,

die analytischen Möglichkeiten lichtmikroskopischer Bildgebung deutlich zu erweitern. Es gelang so, Zellen und subzelluläre Strukturen mit fluoreszierenden Proteinen zu markieren und in Zeitserienaufnahmen Informationen über die Dynamik zellulärer Systeme zu erhalten (Rasse et al., 2005). Ein wesentlicher Schritt für die Beobachtung neuronalen Gewebes über längere Zeiträume war die Entwicklung von Gewebekulturen, die die zeitliche Begrenzung, wie sie z.B. bei der Untersuchung akuter Hirnschnitte vorliegt, entschärfte (Stoppini et al., 1991). Kulturen z.B. dissoziierter hippocampaler Neurone lassen sich leicht über mehrere Tage kultivieren und bieten gute Voraussetzungen für die Lichtmikroskopie (Banker und Goslin 1998; Higgins und Banker, 1998; Withers und Banker, 1998). Die einfache Handhabung und etablierte Verfahren zur elektrischen und chemischen Transfektion können jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass Neuronenkulturen nur bedingt die Eigenschaften nativer Neurone widerspiegeln; klare Anzeichen dafür sind die begrenzte Kulturdauer von wenigen Tagen, aber auch die undifferenzierte Form der Neurone. Dies ist nicht verwunderlich, da in dem artifiziellen System z.B. die Funktion der Gliazellen z.B. Die Produktion von Wachstumsfaktoren nicht oder nur unzureichend wiedergegeben wird (Higgins und Banker, 1998). Organotypische Schnittkulturen (Stoppini et al. 1991; Gähwiler et al. 1997, Gähwiler et al., 1998) bieten den Vorteil eines intakten Gewebeverbandes, in dem die Neurone in einem natürlicheren Mikromilieu wachsen. Die natürliche Zellmorphologie (Abb. 9) und die Stabilität der Kulturen über Monate verdeutlichen dies. Natürlich ist auch die hippocampale Schnittkultur ein artifizielles System, dies ergibt sich schon allein daraus, dass der natürliche neuronale Informationszufluss aus dem Entorrhinalen Cortex abgetrennt wird und plastische Anpassungen zu erwarten sind. Dennoch konnte gezeigt werden, dass organotypische Schnittkulturen in zahlreichen Punkten die Eigenschaften von Akuthirnschnitten widerspiegeln (Bahr, 1995).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass hippocampale Moosfasersynapsen strukturellen Veränderungen unterliegen. Es ist bekannt (Debanne et al., 1998; Galimberti et al., 2006), dass Moosfaserboutons

strukturellen und funktionellen Änderungen unterliegen. Galimberti et al. konnten zeigen, dass die Moosfaserboutongröße positiv mit der Größe der postsynaptischen Ströme und ebenso mit der Anzahl der präsynaptischen Aktiven Zonen korreliert.

Anzahl und Größe präsynaptischer Aktiver Zonen sind wesentliche Determinanten der Transmitterfreisetzung (Benett et al., 1989; Atwood und Karunanithi, 2002; Clarke et al., 2012; Südhof, 2012). Im Rahmen präsynaptischer Plastizität sind also Änderungen der Aktiven Zonen zu erwarten. Wie eingangs dargestellt, bedürfen diese Änderungen allerdings teilweise der Transkription und *de novo* Proteinbiosynthese (Huang et al., 1994). Wie gezeigt, ermöglichen die organotypischen hippokampalen Schnittkulturen nicht nur die Langzeitbeobachtung markierter Neurone über Tage und Wochen; durch den intakten Gewebeverband können auch Prozesse zur Stabilisierung langzeitplastischer Veränderungen wie Transkription und Translation synaptischer Proteine erfolgen.

Das Einbringen transgener Fusionsproteine hat sich in den letzten Jahren als wichtiges Werkzeug bei der Untersuchung synaptischer Proteine erwiesen (Rasse et al., 2005). Dabei haben sich genetisch leicht zu verändernde Organismen wie *Drosophila melanogaster* als ideales Objekt für gezielte Manipulationen herausgestellt (Rodríguez, Didiano und Desplan, 2012), da hier mit überschaubarem Aufwand genetisch-unterschiedliche Tierlinien hergestellt und gehalten werden können. Bei Mäusen ist die Herstellung transgener Tierlinien unter anderem wegen der längeren Generationszeit deutlich aufwendiger. Wie in dieser Arbeit gezeigt, bietet die organotypische Schnittkultur eine komfortable Möglichkeit, Vertebratenzellen mit Plasmiden zu transfizieren und so Transgen-exprimierende Zellen zu erhalten. Durch Einzelzellelektroporation kann diese Manipulation zielgerichtet erfolgen. Somit bietet sich der Vorteil, dass im gleichen Präparat sowohl Kontrolle als auch manipulierte Zellen vorhanden sind (Rathenberg et al., 2003). Bei der Analyse der Daten ist allerdings der genetische Hintergrund zu beachten, d.h. erfolgreich transfizierte Zellen besitzen sowohl die wildtypischen als auch die transgenen

Allele, im vorliegenden Fall CAST/GFP-CAST. Dies bedeutet auch, dass schon vor Transfektion CAST-positive Aktive Zonen in den Boutons zu erwarten waren. Somit lässt sich nicht unterscheiden, ob eine neu fluoreszierende Aktive Zone tatsächlich eine Neubildung ist, oder ob nur im Rahmen des regulären Proteinaustausches eine bisher nicht markierte Aktive Zone neu eingefärbt wurde. In den Transfektionen mit GFP-CAST fiel auf, dass Boutons entlang eines Axons unterschiedlich stark angefärbt waren. Postuliert man aufgrund Darstellung von GFP-CAST Signalen in distalen Boutons, dass im Überexpressionssystem allen Boutons eines Axons das Fusionsprotein als Substrat für Aufbau Aktiver Zonen zur Verfügung steht, kann man die Anfärbeunterschiede als Hinweis auf einen lokal differenziert geregelten Einbau synaptischer Proteine in Aktive Zonen verstehen. Somit können plastische von nicht plastischen Synapsen unterschieden werden.

Das CASTing Aktiver Zonen

Die GFP-CAST transfizierten Boutons zeigten unterschiedliche Färbemuster, für die die Begriffe Punkte und Banden eingeführt wurden. Im Zuge dieser Arbeit sollte geklärt werden, welchen synaptischen Substrukturen diese Färbemuster zuzuordnen sind. Für die Punkte lässt sich diese Frage nicht abschließend beantworten. Durch den starken Promotor (CMV) kommt es zu einer Überexpression des Fusionsproteins, das sich zu Aggregaten zusammenballen kann, die als Artefakt anzusehen wären. Um auszuschließen, dass eine fluorophorbedingte Polymerization für die Entstehung der Punkte verantwortlich ist (Shaner et al., 2005), wurden Transgene mit unterschiedlichen Fluorophoren transfiziert. Gegen die Hypothese eines fluorophorinduzierten Artefakts sprechen die Tatsachen, dass die Aggregation fluorophorunabhängig ist und vom N-Terminus des CAST-Proteins vermittelt wird. Die N-terminal vermittelte Aggregation schließt jedoch nicht aus, dass ein Teil der Punkte doch Überexpressionsartefakten geschuldet ist. Die Beobachtung, dass in Immunfluoreszenzfärbungen Punkte nur teilweise mit Bassoon kolokalisieren,

unterstützt die These, dass es sich um ein Nebeneinander unterschiedlicher Phänomene handelt. -Proteine werden in Transportvesikel für Aktive-Zonen-Proteine, sog. PTVs (Ohtsuka et al. 2002, Dresbach et al., 2006) transportiert. Da CAST in PTVs nur in Kombination mit Bassoon transportiert wird (Maas et al., 2012) könnten die Punkte, die nicht mit Bassoon kolokalisieren, Ausdruck der Überexpression sein, Punkte mit Kolokalisation das Korrelat von Aktiven Zonen oder von PTV's. Die Zeitserienaufnahme (Abb. 14), in der ein Punkt scheinbar Material an eine Bande abgegeben hat, unterstützt die Hypothese, dass es sich bei Punkten um PTVs handeln könnte. Weiterhin spricht auch die Tatsache, dass bei der Transfektion des N-terminalen-CAST-Fragments Punkte auftraten für ein Artefakt, da in diesen Fragmenten die für die Bindung von Piccolo und Bassoon notwendigen Coiled Coil Domänen (Ohtsuka et al., 2002, Hida und Ohtsuka 2011, Maas et al., 2012) fehlen. Somit erscheint es unwahrscheinlich dass es bei diesen Punkten um Transportvesikel handelt. Weitere Klarheit könnten Transfektionen mit Synapsen typischen Promotoren (Synapsin –Promotor) oder Färbungen mit einem Transportvesikel-spezifischen Marker bringen.

Ergibt sich bei Punkten noch ein heterogenes Bild, lassen die Ergebnisse bei Banden klarere Rückschlüsse zu. In der Immunfluoreszenz kolokalisieren selbst komplex geformte GFP-CAST Banden mit anti-Bassoon. Dies ist ein klarer Hinweis, dass es sich bei Banden um ein strukturelles Korrelat Aktiver Zonen handelt. Konnte man in den Kolokalisationsanalysen der Punkte mit anti-Bassoon aufgrund der hohen Dichte der anti-Bassoon Immunfluoreszenz eine zufällige Kolokalisation beider Signale aufgrund der schlechten optischen Auflösung in z-Richtung nicht ausschließen, scheint dies bei den komplex geformten Banden nicht wahrscheinlich. Darüber hinaus finden sich Banden häufig an Stellen, an denen mutmaßlich dendritische Dornen in die Boutons einsprossen (Rollenhagen et al., 2007). Mittels Antikörperfärbungen gegen postsynaptische Rezeptoren könnte weitergehende Gewissheit erlangt werden, ob es sich sowohl bei Banden als auch Punkten um Aktive Zonen handeln könnte. Die bekannte präsynaptische Plastizität der Körnerzell-CA3-

Pyramidenzellsynapse findet ihren Ausdruck in der deutlichen strukturellen Dynamik der Banden. Besonders die Aufnahmen bei Körpertemperatur zeigen die Plastizität Aktiver Zonen selbst in kurzen Zeiträumen.

Jenseits der Abbe'schen Grenze

Die Einteilung in Punkte und Banden erfolgte auf Grundlage der konfokalen Bildgebung. Anhand der aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Rollenhagen et al., 2007) bekannten Dimensionen Aktiver Zonen in Moosfaserboutons wurde klar, dass die lichtmikroskopische Beugungsgrenze erhebliche Einschränkungen in der Beurteilbarkeit der Ergebnisse bringen würde. Unter Umgehung der Auflösungsgrenze wurden STED-Aufnahmen mit einer lateralen Auflösung von ca. 80 nm erstellt. Im Vergleich der hochaufgelösten anti-Bassoon Färbung mit den beugungsbegrenzten Aufnahmen von anti-CAST fiel auf, dass Banden sich bei besserer Auflösung als Aneinanderreihung von Punkten darstellen lassen. Damit blieb die Frage offen, ob es sich bei der Differenzierung von Punkten und Banden nicht um Auflösungsartefakte handelte. Es wird klar, dass zum Verständnis der plastischen Veränderungen ein weiterer Schritt erfolgen muß, und eine möglichst detailreiche Karte der Aktiven Zone auf molekularem Niveau notwendig ist. Dabei sind die dreidimensionale Gestalt des Boutons, die komplex angeordneten Aktiven Zonen, und das hohe Ausmaß an Plastizität kritisch für die Eignung des Boutons zur Etablierung hochaufgelöster Mikroskopie zu beurteilen.

Die räumlichen Ausmaße Aktiver Zonen liegen unter der lichtmikroskopischen Auflösungsgrenze. Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung von höchstauflösender Lichtmikroskopie (*d*STORM) an Aktiven Zonen. Die vorläufige Beschränkung der Präparate auf die neuromuskuläre Endplatte der Maus bot dabei weitreichende Vorteile. Die gute elektronen-mikroskopische Charakterisierung der Synapse (Engel et al.,

1989; Harlow et al., 2001; Nagwaney et al., 2009) ebenso wie die symmetrische Struktur und die zweidimensionale Anordnung der Aktiven Zonen half, zentrale Probleme der Bildgebung an Moosfasersynapsen zu umgehen. In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal die Verteilungen zweier AZ-Proteine mit lichtmikroskopischen Verfahren nachgewiesen werden. Die laterale Auflösung von 20 nm zeigt die anti-Bassoon-Färbung als gruppiertes Muster mit rechteckiger Form mit einer Längsachse von 127 nm (SD 26; SE 7; n=15) und einer Querachse 102 nm (SD 23; SE 6; n=15). Elektronenmikroskopische Analysen der Größe (Nagwaney et al., 2009; Fukuoka et al., 1987) von Aktiven Zonen anhand der präsynaptischen Kalziumkanäle hatten diese mit 60 nm x 80 nm bestimmt. Die räumliche Ausdehnung der Erst- und Zweitantikörper (Ban et al., 1994; Leatherbarrow et al., 1991, Limbach et al., 2011) kann bei dieser Auflösung zu einer systematischen Fehleinschätzung der Größe der Aktiven Zonen führen. Diese kann bis zu 30 nm betragen. Bedenkt man zudem Einflüsse wie die Fixationsmethode, so zeigt sich, dass die Größenabschätzungen der Aktiven Zonen mit *d*STORM mit denen aus der Elektronenmikroskopie vergleichbar sind.

Die markanten Unterschiede der hochaufgelösten Bilder der anti-Piccolo-Färbung deuten an, dass Piccolo in einem anderen Kompartiment der Aktiven Zone lokalisiert ist als Bassoon. In den elektronenmikroskopischen Daten werden die zentral über Kalziumkanälen angeordneten pegs und ribs a der "Aussenseite" der Aktiven Zonen von beams flankiert (Nagwaney et al., 2009). Die jetzt vorliegenden Daten lassen vermuten, dass Piccolo weiter lateral, d.h. im Bereich der "beams" liegt, wohingegen Bassoon zentral im Bereich der "pegs" und "ribs" zu finden wäre. Um die Verteilungen der synaptischen Proteine in Relation zueinander visualisieren zu können, sind hochauflösende *d*STORM-Mehrkanalaufnahmen notwendig. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden erste Vorversuche unternommen, geeignete Fluorophor-Paare zu finden. Jedoch bereits die hier dargestellten Ergebnisse zeigen klar, dass *d*STORM es ermöglicht, die subsynaptische Verteilung von Proteinen differenziert zu analysieren. Dabei bietet *d*STORM gegenüber der

Elektronenmikroskopie den Vorteil einer einfacheren Probenaufarbeitung und eines größeren Gesichtsfeldes, und somit den Vorteil einer größeren Probengröße. Diese technischen Voraussetzungen werden es ermöglichen, quantitative Aussagen aus elektrophysiologischen Plastizitäts-Experimenten strukturell nachzuvollziehen.

Perspektive

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Darstellung synaptischer Plastizität auf molekularem Niveau möglich ist. Es wurde jedoch deutlich, dass die unzureichende Auflösung ein entscheidendes Hindernis bei der Analyse Aktiver Zonen ist. Um die Vorteile höchstauflösender Lichtmikroskopie zu nutzen, wurden an Endplatten Färbungen unterschiedlicher prä- und postsynaptischer Proteine am fixierten Muskelpräparat gemacht. Zukünftige Aufgabe wird es sein, die methodischen Vorteile höchstauflösender Lichtmikroskopie auch für die organotypische Schnittkultur nutzbar zu machen. Mit der Entwicklung einer speziellen Aufnahmekammer und der Etablierung der organotypischen Rollertubekulturen wurden wichtige Voraussetzungen dafür geschaffen. Ein zentraler Baustein wird das Einbringen geeigneter Fluorophore in das lebende Gewebe sein. Hier bieten sich entweder schaltbare fluoreszierende Proteine oder die Verwendung biochemischer Sonden wie Snap-tag an (van de Linde et al., 2011), ein SNAP-CAST-Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits hergestellt. Dabei bieten insbesondere biologisch-chemische Sonden wie Snap-tag oder Fluorophor-gekoppelter Toxine wie α -Bungarotoxin den Vorteil einer geringen Größe im Vergleich zu Antikörpern (Kubalek et al., 1987).

Der weitere erfolgreiche Einsatz von d STORM wird von drei experimentellen Herausforderungen abhängen: zum Einen die Anfertigung geeigneter Präparate, wobei die hohe Auflösung neben der Frage nach geeigneten *in vivo* Modellen auch die Frage nach geeigneten, artefaktarmen

Fixationsverfahren aufwirft. Eine Möglichkeit könnte hierbei die Anwendung von Hochdruckgefrierverfahren sein (Zhao et al., 2012). Darüberhinaus wird die Weiterentwicklung schaltbarer, photostabiler und heller Fluorophore, insbesondere fluoreszierender Proteine eine Anforderung von zentraler Bedeutung bleiben. Zuletzt gilt es festzuhalten, dass trotz der Vorteile der *d*STORM Technik die herausragende Auflösung der Elektronenmikroskopie weiterhin nicht erreicht wird. Es wird eine der Herausforderungen zukünftiger Projekte sein, die Vorteile beider Techniken im Sinne korrelativer Mikroskopie (Oberti et al., 2011, Modla et al., 2010) schließlich mit elektrophysiologischen Analysen (Wang et al., 2010) für quantitative Analysen zu kombinieren.

In der Kombination können z.B. offene Fragen des Vesikelzyklus oder der Plastizität neuromuskulärer Endplatten besser adressiert werden. So ist beispielsweise unklar, wie an neuromuskulären Aktiven Zonen die räumliche und molekulare Integrität nach Vesikelfusion wiederhergestellt wird (Yao et al., 2009). Wie werden die komplexen, symmetrischen Aktiven Zonen nach der Transmitterfreisetzung von Vesikelproteinen gereinigt? Werden Veränderungen der Freisetzungswahrscheinlichkeit und Anzahl freigesetzter Quanten im Rahmen der Plastizität der Endplatten z.B. durch die Länge Aktiver Zonen kodiert? Hochauflösende Bildgebung wie *d*STORM ergänzt den neurophysiologischen Werkzeugkasten und wird es ermöglichen, ein detaillierteres Bild der Physiologie der Neurotransmission zu zeichnen.

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, strukturelle Veränderungen präsynaptischer Aktiver Zonen als mögliches Korrelat synaptischer Plastizität zu detektieren. Damit soll die Hypothese getestet werden, dass strukturelle Plastizität Aktiver Zonen eine zentrale Rolle bei der Informationsverarbeitung im Gehirn und bei Lern- und Gedächtnisprozessen spielt.

Dazu war es notwendig Methoden zu etablieren, die die strukturelle Analyse Aktiver Zonen und deren Veränderung in vitalem Gewebe ermöglichen. Um die Untersuchungen in einem Gewebe mit plastischen Eigenschaften durchzuführen, wurden Methoden zur Herstellung organotypischer hippocampaler Hirnschnittkulturen etabliert, da hippocampale Moosfasersynapsen ausgeprägte präsynaptische Plastizität aufweisen (Bliss und Collingridge, 1993). Durch Einzelzellektroporation wurde es möglich, individuelle Neurone mit Transgenen zur Markierung der gesamten Zelle (DsRed) und synaptischer Substrukturen wie Aktive Zonen (z.B.: GFP-CAST, einem Fluorophor-markierten AZ-Protein) zu transfizieren. Mit konfokaler Bildgebung transfizierter Zellen konnten strukturierte Anreicherungen von GFP-CAST in Moosfaserboutons dargestellt werden. Konfokale Bildgebung von Doppelimmunfluoreszenzfärbungen zur detaillierten Analyse der Proteinlokalisierung zeigte ein diffraktionsbedingtes Auflösungsdefizit, das auch durch die Anwendung von STED-Mikroskopie nicht zufriedenstellend gelöst werden konnte. Um eine präzise Karte synaptischer Proteine zu erstellen, wurde hochauflösende Mikroskopie (*d*STORM) mit einer lateralen räumlichen Auflösung von 20 nm etabliert. Dabei erwiesen sich die ausgeprägte Plastizität, die hohe Dichte an Aktiven Zonen und die variable Gestalt der Boutons im hippocampalen Präparat als problematisch.

Aus diesem Grund wurde die elektronenmikroskopisch gut charakterisierte neuromuskuläre Endplatte mit ihrer symmetrischen molekularen

Struktur als Präparat für *d*STORM verwendet. An der Endplatte konnte die molekulare Organisation der Aktiven-Zonen-Proteine Piccolo und Bassoon dargestellt werden. Zudem konnten erstmals die Mündungen postsynaptischer Falten lichtmikroskopisch aufgelöst werden. So gelang es Werkzeuge zu etablieren, die mit lichtmikroskopischen Methoden die Darstellung der Architektur Aktiver Zonen mit molekularer Auflösung ermöglichen. Die Herausforderung wird es sein, diese neue Dimension in funktionellem Kontext zu nutzen. Die experimentellen Grundlagen dazu wurden durch eine spezielle Badkammer und die Etablierung von Rollertubekulturen bereits gelegt. Dabei ermöglicht *d*STORM die Adressierung quantitativer Fragestellungen bis hin zur Bestimmung der Molekülanzahl.

Referenzen

- Abbe E (1873) Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Schultzes Archiv für Mikroskopische Anatomie* 9:413-469.
- Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ (2000) Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci* 3:445-451.
- Alberini CM (2008) The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. *Neurobiol Learn Mem* 89:234-246.
- Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J (2007) The hippocampal formation. In: *The Hippocampus book* (Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J), pp3-36. New York: Oxford UP.
- Angaut-Petit D, Molgo J, Connold AL, Faillé L (1987) The levator auris longus muscle of the mouse: a convenient preparation for studies of short- and long-term presynaptic effects of drugs or toxins. *Neurosci Lett* 82:83-88.
- Atwood HL, Karunanithi S (2002) Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. *Nat Rev Neurosci* 3:497–516.
- Bahr BA (1995) Long-term hippocampal slices: a model system for investigating synaptic mechanisms and pathologic processes. *J Neurosci Res* 42:294-305.
- Ban N, Escobar C, Garcia R, Hasel K, Day J, Greenwood A, McPherson A (1994) Crystal structure of an idiotype-anti-idiotypic Fab complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1604-1608.
- Banker G, Goslin K (1998) Getting started. In: *Culturing nerve cells* (Banker G, Goslin K, 2nd edition) pp462-498. Cambridge: MIT Press.

REFERENZEN

- Bennett MR, Lavidis NA, Lavidis-Armson F (1989) The probability of quantal secretion at release sites of different length in toad (*Bufo marinus*) muscle. *J Physiol (Lond)* 418:235–249.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)* 232:331-356.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Clarke GL, Chen J, Nishimune H (2012) Presynaptic Active Zone Density during Development and Synaptic Plasticity. *Front Mol Neurosci* 5:12.
- Davis HP, Squire LR (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96:518-559.
- Debanne D, Gähwiler BH, Thompson SM (1998) Long-term synaptic plasticity between pairs of individual CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures. *J Physiol (Lond)* 507:237-247.
- DeFelipe J, Jones EG (1988) From: Studies on the Human cerebral Cortex IV: Structure of the Olfactory, Cerebral Cortex of Man and Mammals. In: *Cajal on the cerebral Cortex* (DeFelipe J, Jones EG, 1st ed), pp289-376. New York: Oxford UP.
- Deguchi-Tawarada M, Inoue E, Takao-Rikitsu E, Inoue M, Kitajima I, Ohtsuka T, Takai Y (2006) Active zone protein CAST is a component of conventional and ribbon synapses in mouse retina. *J Comp Neurol* 495:480-496.

REFERENZEN

- Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11: 339-350.
- Dresbach T, Hempelmann A, Spilker C, tom Dieck S, Altmann WD, Zuschratter W, Garner CC, Gundelfinger ED (2003) Functional regions of the presynaptic cytomatrix protein bassoon: significance for synaptic targeting and cytomatrix anchoring. *Mol Cell Neurosci* 23:279-291.
- Dresbach T, Torres V, Wittenmayer N, Altmann WD, Zamorano P, Zuschratter W, Nawrothki R, Ziv NE, Garner CC, Gundelfinger ED (2006) Assembly of active zone precursor vesicles: obligatory trafficking of presynaptic cytomatrix proteins Bassoon and Piccolo via a trans-Golgi compartment. *J Biol Chem* 281:6038-6047.
- Engel AG, Nagel A, Fukuoka T, Fukunaga H, Osame M, Lang B, Newsom-Davis J, Vincent A, Wray DW, Peers C (1989) Motor nerve terminal calcium channels in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. Morphologic evidence for depletion and that the depletion is mediated by autoantibodies. *Ann N Y Acad Sci* 560:278-290.
- Fejtova A, Gundelfinger ED (2006) Molecular organization and assembly of the presynaptic active zone of neurotransmitter release. *Results Probl Cell Differ* 43:49-68
- Fukuoka T, Engel AG, Lang B, Newsom-Davis J, Prior C, Wray DW (1987) Lambert-Eaton myasthenic syndrome: I. Early morphological effects of IgG on the presynaptic membrane active zones. *Ann Neurol* 22:193-199.
- Fukuoka T, Engel AG, Lang B, Newsom-Davis J, Vincent A (1987) Lambert-Eaton myasthenic syndrome: II. Immunoelectron microscopy localization of IgG at the mouse motor end-plate. *Ann Neurol* 22:200-211.

REFERENZEN

- Gähwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM (1997) Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 20:471-477.
- Gähwiler BH, Thompson SM, McKinney RA, Debanne D, Robertson RT (1998) Organotypic slice cultures of neural tissue. In: *Culturing nerve cells* (Banker G, Goslin K, 2nd edition) pp36-78. Cambridge: MIT Press.
- Galimberti I, Gogolla N, Alberi S, Santos AF, Muller D, Caroni P. (2006) Long-term rearrangements of hippocampal mossy fiber terminal connectivity in the adult regulated by experience. *Neuron* 50:749-763.
- Geiger JR, Jonas P (2000) Dynamic control of presynaptic Ca^{2+} -inflow by fast-inactivating K^+ -channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron* 28:927-939.
- Gross CG (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1:67-73.
- Hagiwara A, Fukazawa Y, Deguchi-Tawarada M, Ohtsuka T, Shigemoto R (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.
- Hallermann S, Pawlu C, Jonas P, Heckmann M (2003) A large pool of releasable vesicles in a cortical glutamatergic synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8975-8980.
- Harlow ML, Ress D, Stoschek A, Marshall RM, McMahan UJ (2001) The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction. *Nature* 409:479-484.

REFERENZEN

- Hebb DO (1949) The first stage of perception: Growth of the assembly. In: The organisation of behavior: a neuropsychological theory. pp60-79. New York, John Wiley & Sons.
- Heilemann M, van de Linde S, Schüttpeitz M, Kasper R, Seefeldt B, Mukherjee A, Tinnefeld P, Sauer M. (2008) Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew Chem Int Ed Engl* 47:6172-6.
- Heim R, Tsien RY (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* 6:178-182.
- Hell SW, Wichmann J (1994) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 19:780-782.
- Hell SW (2007) Far-field optical nanoscopy. *Science* 316:1153-1158.
- Hida Y, Ohtsuka T (2010) CAST and ELKS proteins: structural and functional determinants of the presynaptic active zone. *J Biochem* 148:131-137.
- Higgins D, Banker G (1998) Types of nerve cell cultures, Their Advantages and Limitations. In: *Culturing nerve cells* (Banker G, Goslin K, 2nd edition) pp11-35. Cambridge: MIT Press.
- Huang YY, Li XC, Kandel ER (1994) cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell* 79:69-79.
- Kaesler PS, Deng L, Chávez AE, Liu X, Castillo PE, Südhof TC (2009) ELKS2 α /CAST deletion selectively increases neurotransmitter release at inhibitory synapses. *Neuron* 64:227-239.

REFERENZEN

- Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, Fouquet W, Schmidt M, Schmid A, Wagh DA, Pawlu C, Kellner RR, Willig KI, Hell SW, Buchner E, Heckmann M, Sigrist SJ (2006) Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺-channel clustering, and vesicle release. *Science* 312:1051-1054.
- Kubalek E, Ralston S, Lindstrom J, Unwin N (1987) Location of subunits within the acetylcholine receptor by electron image analysis of tubular crystals from *Torpedo marmorata*. *J Cell Biol* 105:9-18.
- Leatherbarrow RJ, Stedman M, Wells TN (1991) Structure of immunoglobulin G by scanning tunnelling microscopy. *J Mol Biol* 221:361-365.
- Limbach C, Laue MM, Wang X, Hu B, Thiede N, Hultqvist G, Kilimann MW (2011) Molecular in situ topology of Aczonin/Piccolo and associated proteins at the mammalian neurotransmitter release site. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:392-401.
- Maas C, Torres VI, Altmann WD, Leal-Ortiz S, Wagh D, Terry-Lorenzo RT, Fejtová A, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC (2012) Formation of Golgi-derived active zone precursor vesicles. *Journal of Neuroscience* 32:11095-11108.
- Matz J, Gilyan A, Kolar A, McCarvill T, Krueger SR (2010) Rapid structural alterations of the active zone lead to sustained changes in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:8836-8841.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20:445-468.
- Modla S, Mendonca J, Czymmek KJ, Akins RE (2010) Identification of neuromuscular junctions by correlative confocal and transmission electron microscopy. *J Neurosci Methods* 191:158-165.

REFERENZEN

- Nagwaney S, Harlow ML, Jung JH, Szule JA, Ress D, Xu J, Marshall RM, McMahan UJ (2009) Macromolecular connections of active zone material to docked synaptic vesicles and presynaptic membrane at neuromuscular junctions of mouse. *J Comp Neurol* 513:457-468.
- Oberti D, Kirschmann MA, Hahnloser RHR (2011) Projection neuron circuits resolved using correlative array tomography. *Front Neurosci* 5:50.
- Ohtsuka T, Takao-Rikitsu E, Inoue E, Inoue M, Takeuchi M, Matsubara K, Deguchi-Tawarada M, Satoh K, Morimoto K, Nakanishi H, Takai Y (2002) Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc 13-1. *J Cell Biol* 158:577-590.
- Peters A, Palay SL, Webster HD (1991) The fine structure of the nervous system: Neurons and their supporting cells. (3rd ed), New York: Oxford UP.
- Pinaud F, Dahan M (2008) Biochemistry. Zooming into live cells. *Science* 320:187-188.
- Raineteau O, Rietschin L, Gradwohl G, Guillemot F, Gähwiler BH (2004) Neurogenesis in hippocampal slice cultures. *Mol Cell Neurosci* 26:241-250.
- Ralston S, Sarin V, Thanh HL, Rivier J, Fox JL, Lindstrom J (1987) Synthetic peptides used to locate the alpha-bungarotoxin binding site and immunogenic regions on alpha subunits of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 26:3261-3266.
- Rasse TM, Fouquet W, Schmid A, Kittel RJ, Mertel S, Sigrist CB, Schmidt M, Guzman A, Merino C, Qin G, Quentin C, Madeo FF, Heckmann M, Sigrist SJ (2005) Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation in vivo. *Nat Neurosci* 8:898-905.

REFERENZEN

- Rathenberg J, Nevian T, Witzemann V (2003) High-efficiency transfection of individual neurons using modified electrophysiology techniques. *J Neurosci Methods* 126:91-98.
- del Valle Rodríguez A, Didiano D, Desplan C (2012) Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. *Nat Methods* 9:47-55.
- Rollenhagen A, Sätzler K, Rodríguez EP, Jonas P, Frotscher M, Lübke JHR (2007) Structural determinants of transmission at large hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 27:10434-10444.
- Schmid A, Hallermann S, Kittel RJ, Khorramshahi O, Frölich AMJ, Quentin C, Rasse TM, Mertel S, Heckmann M, Sigrist SJ (2008) Activity-dependent site-specific changes of glutamate receptor composition in vivo. *Nat Neurosci* 11:659-666.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429:184-187.
- Schoch S, Gundelfinger ED (2006) Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res* 326:379-391.
- Seidl AH, Rubel EW (2010) A simple method for multiday imaging of slice cultures. *Microsc Res Tech* 73:37-44.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22:1567-1572.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59:223-239.

REFERENZEN

- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182.
- Stuart GJ, Dodt HU, Sakmann B (1993) Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflugers Arch* 423:511-518.
- Südhof TC (2012) The presynaptic active zone. *Neuron* 75:11-25.
- Takao-Rikitsu E, Mochida S, Inoue E, Deguchi-Tawarada M, Inoue M, Ohtsuka T, Takai Y (2004) Physical and functional interaction of the active zone proteins, CAST, RIM1, and Bassoon, in neurotransmitter release. *J Cell Biol* 164:301-311.
- van de Linde S, Löschberger A, Klein T, Heidbreder M, Wolter S, Heilemann M, Sauer M (2011) Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat. Protocols* 6: 991-1009.
- Wagh DA, Rasse TM, Asan E, Hofbauer A, Schwenkert I, Dürrbeck H, Buchner S, Dabauvalle M, Schmidt M, Qin G, Wichmann C, Kittel R, Sigrist SJ, Buchner E (2006) Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* 49:833-844.
- Walrond JP, Reese TS (1985) Structure of axon terminals and active zones at synapses on lizard twitch and tonic muscle fibers. *J Neurosci* 5:1118-1131.
- Wang X, Wang Q, Engisch KL, Rich MM (2010) Activity-Dependent Regulation of the Binomial Parameters p and n at the Mouse Neuromuscular Junction In Vivo. *J Neurophysiol* 104:2352-2358.
- Weyhersmüller A, Hallermann S, Wagner N, Eilers J (2011) Rapid active zone remodeling during synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience* 31:6041-6052.

REFERENZEN

- Withers GS, Banker G (1998) Characterizing and Studying Neuronal Cultures. In: Culturing nerve cells (Banker G, Goslin K, 2nd edition) pp113-151. Cambridge: MIT Press.
- Yao C-K, Lin YQ, Ly CV, Ohyama T, Haueter CM, Moiseenkova-Bell VY, Wensel TG, Bellen HJ (2009) A synaptic vesicle-associated Ca²⁺ channel promotes endocytosis and couples exocytosis to endocytosis. *Cell* 138:947-960.
- Zalutsky RA, Nicoll RA (1990) Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science* 248:1619-1624.
- Zhao S, Studer D, Chai X, Graber W, Brose N, Nestel S, Young C, Rodríguez EP, Saetzler K, Frotscher M (2012) Structural plasticity of hippocampal mossy fiber synapses as revealed by high-pressure freezing. *J Comp Neurol* 520:2340-2351.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Manfred Heckmann für die anhaltende vertrauensvolle Betreuung und die zahlreichen anregenden Gespräche darüber, was Wissenschaft und Welt im Innersten zusammenhält.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Peter Jonas für die freundliche Aufnahme am Physiologischen Institut der Universität Freiburg. Die experimentellen und wissenschaftlichen Erfahrungen, die ich dort sammeln konnte, seien es Kapazitätsmessungen an Akuthirnschnitten der Ratte oder die Elektroporation von Synaptophluorinen in organotypische Schnittkulturen, bilden die Grundlage dieser Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Michael Sendtner für die Möglichkeit meine Arbeit an organotypischen Schnittkulturen am Institut für klinische Neurobiologie fortsetzen zu können und für die Einbindung in den Sonderforschungsbereich 581 *Molekulare Modelle für Erkrankungen des Nervensystems*.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Markus Sauer, Herrn Dr. Sebastian van de Linde und Herrn Thorge Holm für die wissenschaftliche und technische Unterstützung bei der Etablierung und Anwendung von dSTORM an neuromuskulären Endplatten der Maus.

Frau Prof. Dr. Claudia Sommer danke ich für die Begutachtung meiner Dissertation.

DANKSAGUNG

Besonderer Dank gilt Frauke Köhler und Tanja Martini für die technische Unterstützung bei der Herstellung und Unterhaltung der organotypischen Schnittkulturen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Sigrist für die Unterstützung bei der Entwicklung des Projektes, Herrn Till Andlauer für die Generierung des Stawberry-CAST- und der CAST-Fragment-Plasmide und Herrn Dr. Wernher Fouquet für die Hilfe bei der STED Bildgebung.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Dr. Tobias Langenhan und Herrn Dr. Robert Kittel für die wissenschaftliche Hilfe, bei Frau Maria Oppmann für die freundliche Unterweisung in molekularbiologische Arbeitsweisen und für die technische Assistenz, und bei den restlichen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts für die anhaltende Unterstützung. Insbesondere danke ich den Mitarbeitern der elektronischen und feinmechanischen Werkstätten Herrn Franz-Josef Sauer, Herrn Armin Liebenstein, und Herrn Christian Geiger für kreative und passgenaue Lösungen experimenteller Herausforderungen.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Christian Pawlu und Herrn PD. Dr. Stefan Hallermann für die Einführung in neurophysiologische Arbeitstechniken und den freundschaftlichen Start in die Neurowissenschaften. Herrn Dr. Patrick Stock danke ich für die Freundschaft und Hilfe und die unterhaltsamen Gespräche über Neurowissenschaft und drüberhinaus.

Ich danke Frau Dr. Kirsa Neuser für die Begleitung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern für die beständige Förderung und Motivation danken. Ihr anhaltendes Interesse hat diese Arbeit wesentlich mitgetragen.