

Aus dem
Institut für Neuropathologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Modulation der Dendritogenese
und Neurotransmitter Rezeptorbindungsichten
im ZNS durch NECAB2
– Untersuchungen im Knockout Mausmodell

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Lena Catharina Sessinghaus
aus Zweibrücken

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

08. Dezember 2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Neuronale Proteine	3
2.1.1 NECAB2	3
2.1.2 MAP2	6
2.1.3 Synaptobrevin	7
2.1.4 Synaptophysin	7
2.2 Neurotransmitterrezeptoren	8
2.2.1 Exzitatorische Neurotransmitterrezeptoren	9
2.2.2 Inhibitorische Neurotransmitterrezeptoren	10
2.3 Hirnstrukturen	11
2.3.1 Corpus Striatum	11
2.3.1.1 Zytoarchitektur und Projektionsbahnen	12
2.3.2 Hippocampusformation	14
2.3.2.1 Zytoarchitektur und Projektionsbahnen	14
2.3.3 Kortexareale	17
2.3.3.1 Primärer somatomotorischer Kortex	18
2.3.3.2 Primärer und sekundärer somatosensorischer Kortex	18
3 Material und Methoden	20
3.1 Materialien – tabellarische Auflistung	20
3.2 Pufferlösungen	22
3.3 Knockout Tiere	22
3.4 Golgi-Cox-Imprägnierung	23
3.4.1 Golgi-Cox-Lösung	24
3.4.2 Präparation und histologische Aufarbeitung der Gehirne	24
3.4.3 Identifikation und Selektion der Neuronen	25

3.4.4	Rekonstruktion und Auswertung	26
3.5	<i>In-vitro</i> Rezeptorautoradiographie	27
3.5.1	Präparation und histologische Aufarbeitung der Gehirne	28
3.5.2	Ablauf der radioaktiven Markierung	28
3.5.3	Quantifizierung	30
3.6	Immunhistochemie	33
3.6.1	Präparation und histologische Aufarbeitung der Gehirne	33
3.6.2	Ablauf der immunhistochemischen Markierung	34
3.6.3	Semiquantitative Auswertung	35
3.7	Statistische Analyse	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Morphologie Golgi-Cox-imprägnierter Neuronen	37
4.1.1	Verzweigungsstruktur	37
4.1.1.1	Medium Spiny Neurons	37
4.1.1.2	CA1-Neuronen	40
4.1.2	Dichte dendritischer Spines	43
4.1.2.1	Medium Spiny Neurons	44
4.1.2.2	CA1-Neuronen	45
4.1.3	Sholl-Analyse	46
4.1.3.1	Medium Spiny Neurons	46
4.1.3.2	CA1-Neuronen	48
4.2	<i>In-vitro</i> Rezeptorautoradiographie	49
4.2.1	Caudoputamen (CPu)	49
4.2.2	Hippocampusformation (HC)	50
4.2.3	Primärer somatomotorischer Kortex (M1)	51
4.2.4	Primärer somatosensorischer Kortex – <i>trunc region</i> (S1Tr)	53
4.2.5	Primärer somatosensorischer Kortex – <i>barrel field</i> (S1Bf)	54
4.2.6	Sekundärer somatosensorischer Kortex (S2)	55
4.3	Immunhistochemie	56
4.3.1	MAP2	56
4.3.2	Synaptobrevin	56
4.3.3	Synaptophysin	57

5	Diskussion	58
5.1	Hippocampusformation	58
5.1.1	Einfluss des NECAB2-Knockouts auf die neuronale Morphologie . .	58
5.1.1.1	Apikale Dendriten	58
5.1.1.2	Basale Dendriten	59
5.1.2	Einfluss des NECAB2-Knockouts auf Neurotransmitterrezeptorbin- dungsdichten im Hippocampus	61
5.1.2.1	Exzitatorische Neurotransmission	62
5.1.2.2	Inhibitorische Neurotransmission	64
5.1.3	Einfluss des NECAB2-Knockouts auf die neuronale Proteinexpres- sion im Hippocampus	66
5.1.3.1	MAP2	66
5.1.3.2	Synaptobrevin	66
5.1.3.3	Synaptophysin	67
5.2	Putamen	68
5.2.1	Einfluss des NECAB2-Knockouts auf die neuronale Morphologie . .	68
5.2.2	Einfluss des NECAB2-Knockouts auf die Neurotransmitterrezeptor- bindungsdichten im Putamen	69
5.3	Kortex	70
5.3.1	Einfluss des NECAB2-Knockouts auf die Neurotransmitterrezeptor- bindungsdichten im Kortex	70
6	Zusammenfassung	71
	Literaturverzeichnis	74
	Anhang	II

Abkürzungsverzeichnis

α	Signifikanzniveau
°C	Grad Celsius
5-HT	5-Hydroxytryptamin
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
A _{2A} R	Adenosinrezeptor Typ 2A
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ABM	antibiotic biosynthesis motif
ACh	Acetylcholin
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure
AS	Aminosäure
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
Bf	Barrel field
bzw.	beziehungsweise
CA1 _{ap}	apikaler Ast eines CA1-Neurons
CA1 _{ba}	basaler Ast eines CA1-Neurons
CaMKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CC	Corpus callosum
CPu	Caudoputamen
DAG	Diacylglycerin
dest.	destillata
DG	Gyrus dentatus
EC	entorhinaler Kortex
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
ERK	extracellular signal-regulated kinases
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
Gr	Stratum granulosum
HC	Hippocampus
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IHC	Immunhistochemie
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
Lam.	Lamina
Luc	Stratum lucidum
LTP	Langzeit-Potenzierung
M1	Primärer somatomotorischer Kortex
ml	Milliliter

mM	Millimol
mm	Millimeter
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
mGlu ₅	metabotroper Glutamatrezeptor Typ 5
Mol	Stratum moleculare
mV	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamiddinukleotidphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ncl.	Nucleus
NECAB	neuronales calciumbindendes Protein
NHR	NECAB Homologie Region
nM	Nanomol
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSF	N-Ethylmaleinimid-sensitiver Faktor
OD	optische Dichte
Or	Stratum oriens
PKC	Proteinkinase C
PBS	phosphate buffered saline
Py	Stratum pyramidale
Rad	Stratum radiatum
RAR	Rezeptorautoradiographie
s	Sekunde
S1	Primärer somatosensorischer Kortex
S2	Sekundärer somatosensorischer Kortex
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SNARE	soluble N-ethylmaleinimid-sensitive factor receptor
SNc	Substantia nigra Pars compacta
SNr	Substantia nigra Pars reticulata
Sub	Subiculum
Syb	Synaptobrevin
Syp	Synaptophysin
Syx1	Syntaxin 1
t	target
TESPA	3-Triethoxysilyl-Propylamin
THC	Δ ⁹ -Tetrahydrocannabinol
Tr	Trunc region
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
v	vesicle
VAMP2	Vesikel-assoziiertes Membranprotein 2
Vgl.	Vergleich
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

Das menschliche Gehirn umfasst ein mächtiges Netzwerk an verschiedenartigen Nervenzellen. Diese Vielfalt an Neuronen ist notwendig, um die zum Teil überaus komplexen Vorgänge innerhalb dieses komplizierten Geflechtes zu ermöglichen.

Jede dieser Nervenzellen besteht wiederum aus einer enormen Fülle an spezifischen neuronalen Proteinen. Dabei bleibt es trotz umfassender Forschung noch eine Utopie, die Gesamtheit an Nervenzellen inklusive ihrer einzelnen Bausteine vollständig zu identifizieren, geschweige denn ihre Funktion im Gesamtgeschehen restlos zu verstehen. Umso mehr werden die neuronalen Proteine und Nervenzellen weiterhin bedeutende Zielobjekte der Wissenschaft sein, nicht nur um die Neugier des Forschergeistes nach Wissen um die grundlegenden Zusammenhänge zu stillen, sondern vor allem auch um pathologische Vorgänge zu entschlüsseln. Dies ist elementar, um Krankheitsentstehung zu verstehen und Ansatzpunkte zu finden, dieser entgegenzuwirken.

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich nun mit einem dieser noch weitgehend unverstandenen Eiweiße, dem neuronalen calciumbindenden Protein 2 (NECAB2). Bisherige Studien befassten sich vor allem mit Lokalisation und Struktur von NECAB2.

Dabei handelt es sich um ein im ZNS (zentrales Nervensystem) exprimiertes Protein, welches in besonders hohem Maße in Teilen der Basalganglien, insbesondere dem Striatum [1], sowie in der Hippocampusformation [2], [3] nachweisbar ist. Subzellulär befindet sich NECAB2 als zytosolisches Protein sowohl in Axonen als auch in Dendriten [4]. Eine Strukturanalyse von NECAB2 offenbarte zudem eine Aufteilung in drei verschiedene Domänen, welche ferner eine Bindungsstelle für Calciumionen umfassen [4].

Zwei Studien von Canela et al. untersuchten die Funktion von NECAB2 in der Zelle und konnten eine Einflussnahme auf deren Signaltransduktion nachweisen, generiert durch calciumabhängige Interaktion des Proteins mit Neurotransmitterrezeptoren. Eine Potenzierung der nachfolgenden Signalwege konnte zum einen für den Adenosin-Rezeptor 2A (A_{2A}R) im Striatum [1] und zum anderen für den metabotropen Glutamaterezeptor 5 (mGlu₅) in der CA1-Region des Hippocampus [2], gezeigt werden. Bisher wurde des Weiteren sowohl eine Einflussnahme von NECAB2 auf den Prozess der Exozytose vermutet [5] als auch über eine Funktion als Transkriptionsfaktor spekuliert [6].

Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein NECAB2-Knockout Modell der Maus genutzt, um die Auswirkungen eines Fehlens dieses Proteins im Vergleich zum Wildtyp zu analysieren. Es kamen drei verschiedene Methoden zur Anwendung, um Eigenschaften und Funktionsweisen des NECAB2-Proteins unter verschiedenen Gesichtspunkten näher zu beleuchten.

Mithilfe dieser gewählten Methoden sollen insbesondere die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Beeinflusst NECAB2 die dendritische Plastizität und die strukturelle Morphologie von Neuronen im Striatum und Hippocampus?

Hierzu wurden Hirnschnitte Golgi-Cox imprägniert, eine histologische Methode, welche die Neuriten von Nervenzellen präzise darstellt. Analysiert wurden die neuronale Morphologie mit Anzahl, Länge und Verzweigung der Dendriten, die Dichte an Spines sowie die Komplexität der Neuronen im Putamen und im Sektor 1 des Cornu ammonis (CA1).

2. Hat der NECAB2-Knockout Einfluss auf die Bindungsdichten von Neurotransmitterrezeptoren im Hippocampus und Striatum sowie möglicherweise konsekutiv in den kortikalen Regionen einiger somatomotorischer und somatosensorischer Rindengebiete?

Methode der Wahl hierfür ist die *In-vitro* Rezeptorautoradiographie. Dabei können die Bindungsdichten spezifischer radioaktiv markierter Liganden gemessen werden. In den Zielregionen Hippocampus, Putamen, dem primären somatomotorischen Kortex M1 sowie den somatosensorischen Rindengebieten S1 und S2 wurden jeweils die Ligandenbindungsdichten von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-, α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure (AMPA)-, und γ -Aminobuttersäure (GABA_A)-Rezeptoren analysiert.

3. Beeinflusst NECAB2 die Expression der neuronalen Proteine Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2), Synaptobrevin und Synaptophysin und bedingt damit Änderungen in der synaptischen Plastizität und dendritischen Dynamik im Hippocampus?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden die oben genannten Proteine immunhistochemisch markiert, sodass anschließend in den Hippocampi eine semiquantitative Auswertung ihrer Densität erfolgen konnte.

2 Literaturdiskussion

2.1 Neuronale Proteine

In den folgenden Abschnitten sollen die wichtigsten Punkte zu den neuronalen Proteinen diskutiert werden, welche für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind.

2.1.1 NECAB2

Das neuronale calciumbindende Protein 2 – NECAB2 – ist Mitglied einer besonderen Gruppe calciumbindender Proteine, deren Familie sich bisher noch NECAB1 und NECAB3 zuordnen lassen. Diese neue Gruppe calciumbindender Proteine wurde 2001 erstmals von Bernier et al. als Produkt des Transkriptionsfaktors Pax6 beschrieben [6] und später von Sugita et al. genauer identifiziert und hinsichtlich der Struktur sowie des Verteilungsmusters analysiert [4]. Im Folgenden wird aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit insbesondere auf NECAB2 detailliert eingegangen.

NECAB1 und -2 werden ausschließlich im zentralen Nervensystem exprimiert, während NECAB3 zusätzlich in verschiedenen weiteren Gewebearten, insbesondere in der Skelettmuskulatur, zu finden ist [4]. Weitere Studien zur genaueren Lokalisation von NECAB2 demonstrierten ein besonders hohes Vorkommen im Striatum [1], im Hippocampus [2], [3] und im Rückenmark [5]. Subzellulär zeigt sich das Verteilungsmuster dieses Proteins sowohl präsynaptisch in Axonen als auch postsynaptisch in Dendritenästen und Spines. Im Rückenmark konnte NECAB2 in besonders hohem Maße in präsynaptischen Axonterminalen, sogenannten Boutons, lokalisiert werden [5]. Dabei beschränkt sich die Verteilung von NECAB2 als hydrophilem, zytosolischem Protein ohne transmembranären Anteil [4] nicht ausschließlich auf das Zytosol, sondern weist teilweise Assoziation zu Zellorganellen wie dem endoplasmatischen Retikulum oder intrazellulären Vesikeln auf [1]. In der Hippocampusformation wurde von Canela et al. ein hohes Vorkommen an NECAB2 insbesondere in der CA1-Region nachgewiesen [2]. Eine spätere Studie von Zimmermann et al., die sich einer anderen Nachweismethode für das Protein bedienten, konnte ein besonders hohes Vorkommen von NECAB2 in der hippocampalen CA2-Region aufzeigen [3]. Auch im Hinterhorn des Rückenmarks konnte ein erhöhtes Vorhandensein von NECAB2 nachgewiesen werden. Dabei war das Protein dort insbesondere in exzitatorischen, glutamatergen Zellen zu lokalisieren [5], [7]. Dieser Beobachtung entsprechend sind auch in der Hippocampusformation die NECAB2 enthaltenden Neurone mehrheitlich glutamaterge, hippocampale Projektionszellen und nur eine Minderheit davon wurde als GABAerge

Interneurone identifiziert [3].

Die strukturelle Betrachtung der NECAB-Proteine zeigte im groben Überblick drei Teile, eine N-terminale EF-Hand, benachbart die sogenannte NECAB-Homologie-Region (NHR) und am C-terminalen Ende ein DUF176-Motiv oder ABM (antibiotic biosynthesis monooxygenase motif), das bisher nur aus Bakterien bekannt ist [4].

Das Motiv der EF-Domäne ist bei vielen calciumbindenden Proteinen zu finden und wurde bereits 1973 durch Kretsinger et al. erstmals benannt und seitdem ausführlich erforscht [8]. Die Bindung eines Calciumions führt zu einer Konformationsänderung, was konsekutiv die Interaktion mit anderen Proteinen erlaubt [9]. Für NECAB2 wurde einerseits das Vorhandensein zweier terminaler EF-Hände beschrieben [7], während andererseits bei den NECABs nur von einer singulären EF-Hand mit einer Bindungsstelle für Calcium ausgegangen wird [4], [1]. Der EF-Hand benachbart liegt die sogenannte NECAB-Homologie-Region, eine Struktur, welche im Abgleich mit bestehenden Datenbanken keine Homologien zu bisher sequenzierten Proteinen erkennen lässt [4]. Dabei handelt es sich um eine Sequenz, welche in ihrer Sekundärstruktur eine Doppelhelix ausbilden kann [4]. Dieses Motiv scheint relevant, um Proteinen durch Strukturänderungen eine Oligomerisierung sowie Interaktion mit anderen Eiweißmolekülen zu ermöglichen [10]. Die dritte Domäne am C-terminalen Ende der NECAB-Proteine beinhaltet eine enzymatische ABM(antibiotic biosynthesis motif)-Einheit mit bislang größtenteils unverstandener Funktion, welche seither nur bei bakteriellen Eiweißen identifiziert wurde. Bei Bakterien der Gattung *Escherichia coli* beispielsweise stellt diese Enzymformation einen Teil einer Redoxreaktion dar, welche die Bildung toxischer, reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle minimiert [11].

Aufgrund der strukturellen Gegebenheiten kann vermutet werden, dass NECAB2 calciumabhängig mit anderen Proteinen interagiert. Diese Hypothese wird durch zwei Studien von Canela et al. bestätigt, die sich mit der Interaktion von NECAB2 mit Rezeptorproteinen befasst haben. Die Informationen im nun folgenden Abschnitt entstammen vollständig der Studie von Canela et al. [1], welche die Interaktion von NECAB2 mit dem Adenosinrezeptor 2A ($A_{2A}R$) im Rattenmodell untersuchten. Neben der Existenz von $A_{2A}R$ in den Neuronen des Striatum [12] konnte eine Koexpression von NECAB2 dokumentiert und anschließend eine Interaktion der beiden Proteine in Abhängigkeit von der intrazellulären Calciumkonzentration nachgewiesen werden. Dabei kommt es zur Bindung der NECAB-Homologie-Region an das C-terminale Ende des $A_{2A}R$, wobei sehr hohe Konzentrationen an Calcium wiederum eine Dissoziation der Moleküle zur Folge haben. Die Verbindung von NECAB2 und $A_{2A}R$ hatte verschiedene Konsequenzen. In Zellen mit Koexpression von NECAB2 konnte ein Einfluss auf die Rezeptorquantität an der Zellmembran nachgewiesen werden. Weiterhin konnte eine vermehrte Assoziation von NECAB2 mit der Zellmembran dokumentiert werden. Zusätzlich veränderte die Interaktion der beiden Proteine auch die Qualität der vom Rezeptor initiierten Signalverarbeitung. Dem $A_{2A}R$ nachgeschaltet ist der sogenannte ERK(extracellular signal-regulated kinases)-Signalweg, der bei Rezeptoraktivierung durch Phosphorylierung eines Nachbarproteins gestartet wird. Durch eine

Bindung von NECAB2 an den Rezeptor kommt es zur vermehrten Phosphorylierung und damit zu einer potenzierten Aktivierung des konsekutiven Signalweges mit vermehrter Bildung von cAMP, was letztendlich zu einer Änderung der Transkription von Proteinen führen kann.

In einer späteren Studie von Canela et al. [2] wurde die Interaktion von NECAB2 mit einem weiteren Rezeptor, dem metabotropen, G_q -Protein-gekoppelten Glutamaterezeptor 5, Isoform a und b ($mGlu_{5a,b}$), analysiert. Die Resultate werden in der nachstehenden Passage zusammengefasst. Ein gemeinsames Verteilungsmuster von NECAB2 und $mGlu_5$ in den postsynaptischen Kompartimenten wie Dendritenschaft und Spines der hippocampalen Pyramidenzellen der Ratte, insbesondere in der CA1-Region, wurde dokumentiert. In Analogie zu oben zitierter Studie [1] kommt es in Verbindung mit dem Rezeptor $mGluR5$ zu einer Translokation von NECAB2 in Richtung der Zellmembran. Es konnte dargelegt werden, dass es ebenso zu einer calciumabhängigen Interaktion der Proteine kommt, wobei bei steigender intrazellulärer Calciumkonzentration ebenfalls eine Abnahme der Eiweißverbindung zu beobachten ist. Im Unterschied zur Interaktion mit $A_{2A}R$ nimmt NECAB2 keinen Einfluss auf die quantitative Rezeptorexpression von $mGlu_5$ an der Zelloberfläche. Funktionell führte die Interaktion von NECAB2 mit $mGlu_5$ zu einer Verstärkung der Signaltransduktion und nimmt damit ebenfalls potenziierenden Einfluss auf die Rezeptorfunktion von $mGlu_5$ mit konsekutiv vermehrter Bildung von IP3 und DAG.

Andere Untersuchungen implizierten bezüglich der Funktion von NECAB2, aufgrund seiner vorwiegend präsynaptischen Verteilung in exzitatorischen Zellen des Rückenmarks, eine Rolle im Prozess der synaptischen Übertragung bei der Schmerzweiterleitung. Der Vermutung von Zhang et al. nach scheint präsynaptisches NECAB2 calciumabhängig die Exozytose zu verstärken [5]. Bernier et al. beschrieben die Proteine der NECAB-Familie weiterhin als Produkte eines Transkriptionsfaktors, welche mutmaßlich selbst die Expression von anderen Proteinen induzieren können [6].

Obige Studienergebnisse zusammenfassend konnte bereits gezeigt werden, dass NECAB2 in Abhängigkeit von der intrazellulären Calciumkonzentration, vermittelt durch EF-Hände, eine Konformationsänderung durchläuft, welche einerseits die Bindung mit anderen Proteinen ermöglicht sowie andererseits die Voraussetzungen zur Homodimerisation liefert. Weiterhin gibt es sowohl Hinweise auf eine Einflussnahme des Proteins im präsynaptischen Prozess der Exozytose von Neurotransmittern als auch auf eine Funktion im postsynaptischen Kompartiment durch Interaktion mit Rezeptoren und Einwirkung auf neuronale Signaltransduktionen und konsekutiv die zelluläre Funktion. Auch eine Wirkung als Transkriptionsfaktor wird diskutiert. Da NECAB2 sich insbesondere in exzitatorischen, glutamatergen Zellen befindet und dieses System scheinbar in unterschiedlicher Art und Weise beeinflusst, handelt es sich möglicherweise um einen wichtigen modulatorischen Faktor in der exzitatorischen Neurotransmission. Auf Grundlage dieser bisherigen Erkenntnisse wurden die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit formuliert und eine Ana-

lyse von Neurotransmitter Rezeptorbindungsichten, von morphologischen Alterationen und eine semiquantitative Auswertung dendritischer Proteine durchgeführt.

Da der Abgleich mit Datenbanken für sequenzierte Proteine zeigte, dass die NECAB-Proteine von Mensch und zumindest Ratte sich in ihrer Aminosäuresequenz nicht unterscheiden [4], scheinen funktionelle Überlegungen aus dem Tiermodell potentiell auf den Menschen übertragbar zu sein.

2.1.2 MAP2

Die Abkürzung MAP2 steht für Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2, womit schon eine wichtige Eigenschaft dieses neuronalen Eiweißes genannt wird, nämlich die Verbindung zu Teilen des Zytoskelettes, das aus den zwei Hauptkomponenten Tubulin und Aktin sowie verschiedenen Intermediärfilamenten zusammengesetzt wird.

Man kann vier übergeordnete MAPs sowie weitere Subtypen differenzieren [13]. Das in der vorliegenden Arbeit analysierte MAP2 ist spezifisch in Neuronen und dort wiederum ausschließlich in Dendriten und in den dendritischen Spines lokalisiert [14], [15]. Die Assoziation zu den Tubulinmolekülen ist durch eine Bindung von MAP2 an deren C-terminalem Ende möglich [13]. Diese Konnexion von Tubulin und MAP2 hat eine stabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli. Zusätzlich können dadurch Querverbindungen zu anderen Zellbestandteilen hergestellt werden [13], [16]. Die Bindung von MAP2 an die Mikrotubuli bewirkt deren festeren Zusammenhalt, was jedoch konsekutiv eine verminderte Dynamik und Polymerisation dieses Zytoskelettanteils zur Folge hat [17].

Die Aktivität von MAP2 kann durch Phosphorylierung seiner spezifischen Bindungsstellen für Phosphat [17] reguliert werden [18]. Wann eine Phosphorylierung stattfindet, wird bedarfsgerecht über Signalkaskaden reguliert, welche von aktivierten Neurotransmitterrezeptoren ausgehen. Beispielsweise führt die Aktivierung des NMDA-Rezeptors zu einer Dephosphorylierung von MAP2 [19], [20], was konsekutiv eine Destabilisierung des Mikrotubuligerüsts bewirkt, damit aber auch die Möglichkeit zum Umbau und zur Polymerisation eröffnet. Auch für die Aussprossung neuer Zellfortsätze scheint das Vorhandensein von MAP2 unverzichtbar [21]. Weiterhin besitzt MAP2 die Fähigkeit, eine Querverbindung zwischen Mikrotubuli und Aktinfilamenten herzustellen [16]. Eine solche Verbindung ist grundlegend für verschiedene zelluläre Prozesse, wie beispielsweise für den Transport von Organellen entlang des Zytoskelettes oder für die Zellteilung [22]. Auch in dendritischen Spines, den Orten der Synapsenbildung mit anderen Neuronen, ist die Verbindung von Aktinfilamenten und Mikrotubuli über MAP2 bedeutungsvoll für die Ausbildung der dendritischen Dornen [22]. Folglich scheint MAP2 einen wichtigen Mediator für die synaptische Plastizität darzustellen [17], [22].

2.1.3 Synaptobrevin

Bei Synaptobrevin (Syb) oder auch Vesikel-assoziiertem Protein 2 (VAMP2) handelt es sich um ein kleines Eiweißmolekül, welches einen integralen Bestandteil der Membranen präsynaptischer Vesikel und das quantitativ am häufigsten exprimierte vesikuläre Protein darstellt.

Strukturell konnten drei verschiedene Domänen identifiziert werden [23]. Homologien zu anderen bereits bekannten Proteinen konnten nur für die prolinreiche N-terminale Region dokumentiert werden. Diese ähnelt einem Abschnitt von Synapsin, einem weiteren vesikulären Eiweiß, welches für die Interaktionen der Vesikel mit dem Zytoskelett verantwortlich ist [23]. Funktionell stellt Syb als vesicle(v)-SNARE (*SNARE*: soluble N-ethylmaleinimid-sensitive factor receptor) einen wichtigen Bestandteil der Exozytosemaschinerie dar. Die Exozytose der neurotransmitterbeladenen Vesikel wird vorrangig durch folgende drei sogenannte SNARE-Proteine ermöglicht, das vesikuläre Synaptobrevin und die in der neuronalen Plasmamembran befindlichen Proteine Syntaxin 1 (Syx1) und SNAP25 (auch target(t)-SNARE). Um die Exozytose zu ermöglichen, muss eine Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran stattfinden, wobei die gegenseitige Abstoßung der negativ geladenen Membranen durch Komplexbildung der SNARE-Proteine und einhergehende Strukturveränderungen überwunden wird.

Neben diesen wesentlichen Komponenten existiert noch eine Vielzahl an sogenannten SNARE-assoziierten Proteinen, welche die Neurotransmitterausschüttung präzise regulieren (siehe dazu auch Kapitel 2.1.4). Dazu gehört beispielsweise auch der N-Ethylmaleinimid-sensitive Faktor (NSF), auf welchem die Namensgebung des SNARE-Komplexes beruht [24]. Hinweise auf die wichtige Rolle zusätzlicher anderer Faktoren bei dem Prozess der Exozytose lieferte unter anderem die Untersuchung eines Synaptobrevin-Knockout Mausmodells. Das Fehlen von Synaptobrevin führte zu einer ausgeprägten Störung der Exozytose, wobei 10 % der Neurotransmitterfreisetzung davon jedoch unbeeinträchtigt blieben [25]. Nichtsdestoweniger hat Synaptobrevin einen essentiellen Anteil an physiologischer neuronaler Funktion, was durch die Analyse von Mäusen mit einer Nullmutation des Syb-Gens deutlich wird, welche neurologische Defekte und eine erhöhte Jungtiersterblichkeit aufwiesen [26].

2.1.4 Synaptophysin

Synaptophysin (Syp) ist das erste aus präsynaptischen Vesikelmembranen identifizierte und isolierte Protein [27], [28]. Es handelt sich um ein transmembranäres Glykoprotein, dessen Funktionsweise bisher noch nicht vollständig entschlüsselt ist. Einen maßgebenden Fortschritt in der Forschung um die Funktion von Syp war die Erkenntnis, dass Synapto-

physin und Synaptobrevin zu einem Komplex fusionieren können [29]. Diese Fusion kann durch weitere Moleküle, beispielsweise die Bindung von Cholesterol, erleichtert werden [30]. Durch die Konnexion der beiden Moleküle ist es für Synaptobrevin nicht möglich, eine Bindung mit SNAP25 und Syx1 einzugehen, um den SNARE-Komplex zu bilden, wodurch die neurotransmitterbeladenen Vesikel aufgrund elektrostatischer Abstoßung nicht mit der Plasmamembran fusionieren können und konsekutiv die Transmitterausschüttung verhindert wird. Der Studie von Hinz et al. zufolge könnte die Funktion dieser Komplexbildung sein, dass eine Reserve an Syb in der Zelle gespeichert wird, welche bei Bedarf bereitgestellt werden kann, um damit die Neurotransmitterausschüttung anzupassen und somit die Effizienz der synaptischen Übertragung zu erhöhen [31]. Dabei scheint das Protein für den Vorgang der Exozytose alleine nicht absolut relevant zu sein, was die Analyse eines Syp-Knockout Modelles impliziert. Dieser alleinige Knockout zeigte im Vergleich mit dem Wildtyp keine signifikanten phänotypischen Unterschiede [32], [33].

Darüber hinaus scheint die Menge an Syb/Syp-Komplex in wenig aktiven neuroendokrinen Zellen und insbesondere in embryonalen Neuronen gering zu sein und mit Heranreifen des Neurons an Quantität zuzunehmen, woraus eine Einflussnahme auf Anpassungs- und Umbauvorgänge des Neurons, also auf synaptische Plastizität, postuliert wurde [31].

2.2 Neurotransmitterrezeptoren

Die Kommunikation und Reizweiterleitung zwischen Nervenzellen ist ein komplexer Vorgang. Grob skizziert, führen Veränderungen der Membranpermeabilität für bestimmte Ionen durch Öffnung zugehöriger spezifischer Ionenkanäle zu einer konsekutiven Alteration des zellspezifischen Ruhemembranpotenzials, welches sich schließlich entlang der Zelle ausbreiten kann.

Bei den chemischen Synapsen, die den Hauptanteil an Verbindungen zwischen Neuronen darstellen, muss ein Spalt (synaptischer Spalt) zwischen den beteiligten Neuronen, genauer zwischen der sogenannten prä- und postsynaptischen Membran, überwunden werden. Um dies zu ermöglichen, bedarf es besonderer Prozesse, welche die Ausschüttung von Überträgerstoffen (Neurotransmittern) und die Reaktion passender Rezeptoren beinhalten. Es existiert eine Reihe an unterschiedlichen Transmittern, die prinzipiell entweder eher inhibitorisch oder exzitatorisch wirken können. Die Wirkung ist jedoch zusätzlich abhängig von der Art des vorliegenden Rezeptors an der postsynaptischen Membran. Grundsätzlich lassen sich Rezeptoren anhand ihrer entweder ionotropen oder metabotropen Wirkung unterscheiden. Zum einen gibt es große, ionotrope Rezeptoren mit mehreren Transmembrandomänen, welche selbst Ionenkanäle darstellen, die durch Bindung eines Liganden direkt in ihrer Funktion beeinflusst werden und in der Regel zu einer schnelleren Reaktion führen. Zum anderen finden sich eher kleinere, metabotrope Rezep-

torproteine, deren Aktivierung eine langsamere Signalkaskade initiiert, welche wiederum durch Beeinflussung von Kinasen mittels intrazellulärer Signalstoffe (second messengern) zur indirekten Öffnung eines Ionenkanals führen kann. Ein sogenanntes exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) kann im Allgemeinen durch veränderte Permeabilität für Kationen zur Depolarisation der postsynaptischen Membran führen, während analog dazu ein inhibitorisches postsynaptisches Potenzial (IPSP) mit verändertem Anionenfluss eine Hyperpolarisation der Postsynapse auslösen kann [34].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Rezeptorbindungsichten zweier ionotroper, exzitatorischer Glutamatrezeptoren und eines ionotropen, inhibitorischen Rezeptors analysiert. Aus diesem Grund folgt in den nachstehenden zwei Kapiteln ein kurzer Überblick über Aufbau und Funktionsweise dieser Strukturen.

2.2.1 Exzitatorische Neurotransmitterrezeptoren

Auch die Rezeptoren des wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat können sowohl in ionotrope, ligandengesteuerte Ionenkanäle als auch in metabotrope G-Protein-gekoppelte Rezeptoren unterteilt werden. Die ligandengesteuerten Ionenkanäle lassen sich weiterhin in drei Subtypen differenzieren, welche nach folgenden synthetischen rezeptoraktivierenden Agonisten benannt sind: α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionsäure (AMPA), Kainat und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA).

Aufgrund der Relevanz für diese Arbeit sollen vor allem kurz die ionotropen NMDA- und AMPA-Rezeptoren diskutiert werden.

Strukturell betrachtet handelt es sich bei den ionotropen Glutamatrezeptoren um tetramere Proteine, die aus vier Subeinheiten (GluR1-4) mit helicalen transmembranären Domänen zusammengesetzt sind. Unterschiede entstehen besonders durch Alterationen der Subeinheiten. Dabei hebt sich vornehmlich der NMDA-Rezeptor ab. Bei AMPA- und Kainat-Rezeptoren existiert eine Bindungsstelle allein für Glutamat. Gelangt Glutamat über den synaptischen Spalt an den Rezeptor, so führt diese Bindung direkt zu einer Rezeptoraktivierung mit nachfolgender Durchlässigkeit für die Kationen Natrium und Kalium. Die dadurch ausgelöste schnelle Änderung des Membranpotenzials stellt die großamplitudige, frühe Komponente des exzitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSP) dar.

NMDA-Rezeptoren hingegen besitzen einen komplizierteren Aufbau und unterscheiden sich sowohl in den zu ihrer Aktivierung notwendigen Gegebenheiten als auch in ihrer Kinetik und Ionenpermeabilität von AMPA- und Kainat-Rezeptoren. Um den Rezeptor in seiner Funktion als Ionenkanal zu aktivieren, bedarf es einerseits der Bindung von Glutamat sowie Glycin als Kofaktor [35] und andererseits eines zusätzlichen elektrischen Stimulus in Form einer Depolarisation der postsynaptischen Membran [36], [37]. An den meisten zentralen Synapsen liegt eine Koexpression von AMPA- und NMDA-Rezeptoren

vor, sodass es bei repetitiven Stimuli durch die schnelle Aktion der AMPA-Kanäle zu einer Depolarisation und somit zu einer Aktivierung auch der NMDA-Rezeptoren kommen kann [38]. Aufgrund der vergleichsweise langsamen Kinetik des Rezeptors tragen aktivierte NMDA-Rezeptoren zur späten Phase eines EPSPs bei [34].

Eine weitere Besonderheit der Rezeptoren ist, neben der Permeabilität für Natrium und Kalium, auch eine Leitfähigkeit für Calciumionen [39]. Calcium hat bei vielen intrazellulären Prozessen eine Schlüsselrolle inne, woraus eine Einflussnahme der Rezeptoren auf zelluläre Prozesse resultiert. Besonders hervorzuheben ist dabei die herausragende Rolle der NMDA-Rezeptoren bei der Langzeit-Potenzierung (LTP) als Grundlage einer Form synaptischer Plastizität in Neuronen [40] (siehe auch Kapitel 2.3.2.1). Es herrscht jedoch keine einheitliche Meinung darüber, wie diese Prozesse im Detail ablaufen. Während beispielsweise einerseits permanente [41] oder passagere [42] Aussprossung von Spines beschrieben wurde, konnten andererseits keine morphologischen Veränderungen dokumentiert werden und stattdessen wurde eine Neugewichtung bestehender Synapsen vermutet [43]. Eine Entgleisung dieser Prozesse, insbesondere eine Überaktivität des glutamatergen, exzitatorischen Systems mit übermäßiger Aktivität von NMDA-Rezeptoren und konsekutivem massivem Calciumeinstrom in die Zelle, kann zu schwerwiegenden neuronalen Schäden führen. Die Störung des Equilibriums der intrazellulären Calciumkonzentration und Entstehung toxischer, freier Radikale kann zu einem Untergang von Neuronen führen, was das pathologische Korrelat bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen darstellt [44].

2.2.2 Inhibitorische Neurotransmitterrezeptoren

Inhibitorische Synapsen sind gegenüber den exzitatorischen Verbindungen quantitativ deutlich in der Minderheit. Im zentralen Nervensystem existieren zwei inhibitorische Neurotransmitter, zum einen der weitaus häufigere hemmende Überträgerstoff γ -Aminobuttersäure (GABA) und zum anderen die Aminosäure Glycin. GABA selbst interagiert mit zwei Rezeptoren, welche sich in Analogie zu den exzitatorischen Glutamaterezeptoren in eine ionotrope (GABA_A-Rezeptor) und eine metabotrope (GABA_B-Rezeptor) Form unterteilen lassen [45].

Der ionotrope GABA_A-Rezeptor ist ein pentamerer Protein und bildet einen Chloridkanal aus. Es existieren acht Gruppen an Untereinheiten (α , β , γ , δ , ϵ , θ , π , ρ), welche sich weiterhin in 19 verschiedene Subtypen kategorisieren lassen [34]. Durch die hohe Anzahl an Untereinheiten ergibt sich eine Vielzahl an möglichen Varianten ionotroper GABA-Rezeptoren, die sich anhand ihrer Affinität zum Liganden oder anhand ihrer zusätzlichen Bindungsstellen unterscheiden [46]. Je nach Komposition entwickeln die Rezeptoren unterschiedliche Funktionen und Eigenschaften [47], [48] und nehmen damit Einfluss auf die synaptische Plastizität [49]. Normalerweise führt die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren zu einer Inhibition von Neuronen durch Hyperpolarisation, welche meist durch Chlo-

ridströme vermittelt ist und inhibitorische postsynaptische Potenziale (IPSPs) evozieren kann [50], [51]. Demgegenüber können GABA-Rezeptoren bei bestimmten Umgebungsbedingungen allerdings auch eine Depolarisation der Zielzelle durch Ausstrom der Anionen auslösen und so zu einem exzitatorischen Signal beitragen [34], [45], [52].

2.3 Hirnstrukturen

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Regionen des Gehirns hinsichtlich der Auswirkungen eines NECAB2-Knockouts untersucht. Im Vordergrund standen dabei Regionen, welche physiologisch ein hohes Vorkommen an NECAB2 aufweisen. Dies ist zum einen das Striatum [1] und zum anderen die Hippocampusformation [2]. Neben der wesentlichen Analyse dieser beiden Areale wurden zusätzlich einige kortikale Regionen, im Speziellen der primäre somatomotorische Kortex (M1) sowie der primäre (S1) und sekundäre somatosensorische Kortex (S2), hinsichtlich ihrer Rezeptorbindungsichten untersucht. Diese Gebiete kommunizieren durch verschiedene Neuronenprojektionen mit Hippocampus oder Striatum und stellen damit sogenannte *remote regions* dar.

In den nachstehenden Abschnitten sollen in Kürze die wichtigsten strukturellen und funktionellen Aspekte, insbesondere des Striatums und der Hippocampusformation, zusammengefasst werden.

2.3.1 Corpus Striatum

Das Corpus Striatum, oder auch nur Striatum genannt, ist eine subkortikal gelegene Struktur des Großhirnes, welche entwicklungsgeschichtlich sowohl im humanen Gehirn als auch in dem der Maus dem Telencephalon entstammt [53]. Unterschiede in der endgültigen Anatomie sind vorrangig den Besonderheiten anderer Hirnstrukturen, wie beispielsweise dem prominenten Neocortex im humanen Gehirn, geschuldet [54], [55]. Dabei kann man das Striatum nochmals aufteilen in den Nucleus caudatus und das Putamen. Das Striatum agiert als wesentliches Element der zentralen Bewegungsorganisation als Bestandteil der sogenannten Basalganglien, einer Gruppe von subkortikal gelegenen umschriebenen Gebieten grauer Substanz. Diese auch als Stammganglien bezeichneten Strukturen umfassen neben dem Striatum die Substantia nigra mit deren Aufteilung in Pars compacta (SNc) und Pars reticulosa (SNr), den Globus pallidus unterteilt in Pars externa und Pars interna sowie den Nucleus subthalamicus [55].

2.3.1.1 Zytoarchitektur und Projektionsbahnen

Mit einem prozentualen Anteil zwischen 90 % [55], [56] und 95 % [57] agieren die sogenannten Medium Spiny Neurons (MSN) als wichtigste Projektionsneuronen im humanen Striatum wie auch in dem des Nagers [54]. Wie so oft in der Historie der Anatomie geschehen, war auch hier die Deskription der äußeren Form ausschlaggebend für die Benennung der Neuronen. Dabei handelt es sich um Nervenzellen mit einem Zellkörper eines Durchmessers von circa 15 bis 18 μm , dem meist drei bis fünf primäre Dendriten entspringen, welche vor der ersten Verzweigung nur wenige Spines besitzen, während ihre Äste ab der 2. Ordnung dicht mit solchen Dornen besetzt sind. Die Dendriten bilden in ihrem Verlauf eine hohe Anzahl an Verzweigungen und der Gesamtdurchmesser der einzelnen Neuronen erreicht oftmals ein Ausmaß von etwa 200 bis 300 μm [57]. In Abbildung 1 ist ein unter dem Lichtmikroskop bei 40facher Vergrößerung aufgenommenes Exemplar eines typischen MSN optisch dargeboten. Aufgrund der dreidimensionalen Ausbreitung des Neurons entlang der z-Achse des Hirnschnittes sind nicht alle Dendriten gleichzeitig scharf einzustellen.

Die restlichen 5–10 % der striatalen Nervenzellen bestehen aus Interneuronen. Diese eher inhomogene Gruppe lässt sich weiterhin anhand der zugehörigen Neurotransmitter aufteilen [55], [57].

Funktionell ist das Striatum als Bestandteil der Basalganglien notwendig zur Abstimmung der Bewegungsausführung. Es erhält extrinsische afferente Signale aus der Substantia nigra und Input aus motorischen Thalamuskernen, welche wiederum Afferenzen aus der Peripherie und aus dem Kortex weiterleiten. Afferenzen aus der Großhirnrinde bilden exzitatorische glutamaterge Synapsen [58], wohingegen Projektionen aus der Substantia nigra über verschiedene Dopaminrezeptoren sowohl aktivierende als auch hemmende Einflüsse ausüben können [57]. Des Weiteren erreichen intrinsische Signale ausgehend von verschiedenen Interneuronen über GABAerge oder cholinerge Synapsen die MSN [34]. Nach der Meinung von Zilles ist das Striatum Komponente der sogenannten Basalganglienschleife, eines Schaltkreises zur Abstimmung kontinuierlich stattfindender Bewegungsplanung, der im Kortex seinen Ursprung nimmt und über die subkortikalen Kerngebiete letztendlich Projektionen zurück in den Frontallappen, insbesondere zum prämotorischen und supplementärmotorischen Kortex, sendet [53].

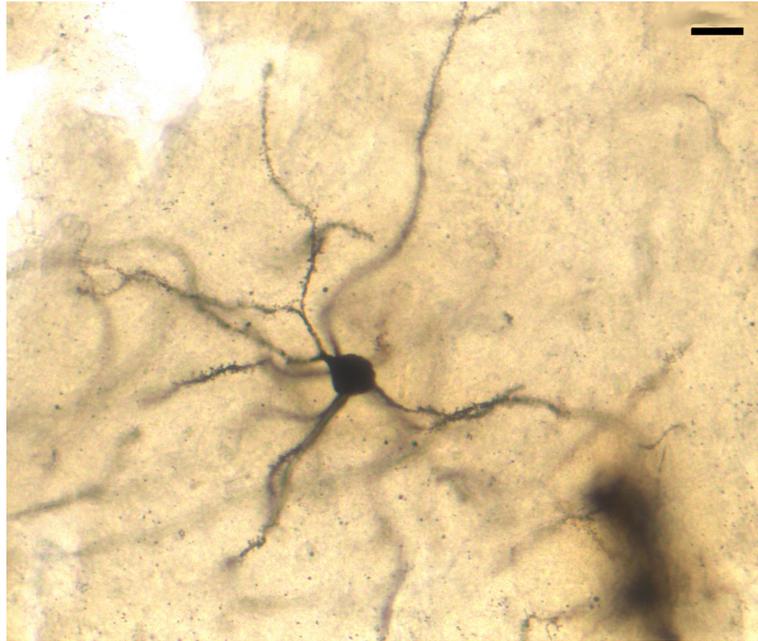


Abbildung 1: Beispielhafte lichtmikroskopische Darstellung eines Golgi-Cox-imprägnierten Medium Spiny Neurons des Putamen in 40facher Vergrößerung (Maßstab 20 μm)

Die Axone der MSN selbst projizieren über den inhibitorisch wirkenden Überträgerstoff γ -Aminobuttersäure (GABA) und unterschiedliche Kotransmitter wie Substanz P, Enkephalin und Dynorphin in den Globus pallidus und die Substantia nigra. Im Detail kann man die MSN wiederum anhand ihrer exprimierten Rezeptoren für Dopamin sowie ihrer Funktionsweise in der Bewegungsplanung in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Fraktion der MSN exprimiert den D1-Rezeptor, dessen Aktivierung eine Signalkaskade mit Projektionen über den Globus pallidus Pars interna, den retikulären Anteil der Substantia nigra und über motorische Thalamuskern bedingt, was schließlich zu einer exzitatorischen Wirkung auf prämotorische Areale und einer Mitwirkung an der Bewegungsvorbereitung führt [59]. Diese Verschaltung wird auch als direkter Weg bezeichnet. Die zweite Gruppe der MSN empfängt Signale über den D2-Rezeptor, was in den konsekutiven Projektionen über den externen Teil des Globus pallidus, den Ncl. subthalamicus, den Globus pallidus Pars interna und die motorischen Thalamuskern letztendlich zu einer Verminderung der kortikalen Bewegungsinitiation führt [57], [60]. Diese Vernetzung der Neuronen wird auch als indirekter Weg bezeichnet.

Der direkte und indirekte Weg sowie die von Zilles beschriebene Basalganglienschleife [53] veranschaulichen die Funktion der Basalganglien in simplifizierter Weise. Weiterführende Untersuchungen ergaben diverse zusätzliche neuronale Verbindungen, Feedback-Schleifen und Einflüsse, beispielsweise aus dem limbischen System oder dem Assoziationskortex, welche noch nicht vollständig erfasst und verstanden sind [61], [62], [63]. So scheinen die Neuronen des Striatums neben ihrer Einflussnahme auf die Bewegungsplanung außerdem eine Rolle bei komplexeren kognitiv-behavioralen Prozessen zu spielen [63].

2.3.2 Hippocampusformation

Bei der Hippocampusformation handelt es sich um eine besondere kortikale Struktur, die entwicklungsgeschichtlich dem sogenannten Allokortex angehört. Durch verschiedene ontogenetische Prozesse gelangte sie in ihre endgültige Position [53], [64] und bildet im humanen Gehirn die makroskopisch einprägsame Form, welche an das Erscheinungsbild eines Seepferdchens erinnert und damit Grundlage für die Namensgebung war [57], während der Hippocampus der Maus eher kommaförmig beschrieben wird [54].

Funktionell obliegt dem Hippocampus eine wichtige Aufgabe als Komponente des limbischen Systems, welches an einer Reihe von essentiellen Prozessen, darunter kognitives, verhaltensbezogenes, vegetatives und emotionales Geschehen, beteiligt ist. Neben dem Hippocampus gehören diesem System auch das Septum pellucidum, Corpus amygdaloideum und der Hypothalamus an [53]. Eine weitere wesentliche Funktion des hippocampalen Gefüges ist die Gedächtniskonsolidierung. Bei diesem Prozess werden langfristige, explizite, faktische Gedächtnisinhalte durch Überführung vom Kurz- ins Langzeitgedächtnis generiert. Der Hippocampus stellt die charakteristische Leitstruktur für das explizite Gedächtnis dar, während andere Gedächtniskategorien in separaten Gehirnregionen kultiviert werden [64]. Grundlegend für den Beginn umfangreicher Forschung auf diesem Gebiet war eine einprägsame Fallbeschreibung aus den fünfziger Jahren eines Patienten nach operativer bilateraler Entfernung der Hippocampi, welcher anschließend keine neuen Fakten mehr ins Langzeitgedächtnis überführen konnte, wohingegen andere Gedächtnisleistungen nicht von diesem Eingriff beeinträchtigt waren [65].

2.3.2.1 Zytoarchitektur und Projektionsbahnen

Die Hippocampusformation wird unterteilt in Gyrus dentatus (DG), Cornu ammonis (CA) und Subiculum (Sub) (Abbildung 2). Alle Bereiche sind entwicklungsgeschichtlich verwandt und besitzen in ihrer histologischen Struktur einen ähnlichen Aufbau. Die grundsätzliche Zytoarchitektur ist im humanen Gehirn und in dem der Maus gleichartig [54], [64]. Die Anordnung der beiden wesentlichen Neuronenpopulationen, zum einen der glutamatergen, exzitatorischen Pyramidenzellen des Cornu ammonis und zum anderen der ebenfalls erregenden Körnerzellen des Gyrus dentatus, welche zusammen etwa 90 % der Zellen ausmachen, führt zu einer groben Dreischichtung. Die Zellsomata der Neuronen gruppieren sich bandförmig, der Kontur eines 'C' folgend, und formen mit ihren Dendriten die zellarmen benachbarten Schichten. Die Unterteilung und Benennung des CA in vier Subregionen CA1–CA4 erfolgte nach Dichte und Morphologie der strukturgebenden Pyramidenzellen [66]. Grundsätzlich bilden im CA die basalen Dendriten der Pyramidenzellen das Stratum oriens aus, nach innen gefolgt vom Stratum pyramidale, welches die

Zellsomata enthält, dem sich wiederum das Stratum radiatum mit den apikalen Dendritenbäumen anschließt. Eine zusätzliche Differenzierung des Stratum radiatum in ein Stratum radiatum-lacunosum-moleculare sowie das Sichtbarmachen weiterer Schichten, wie des auf die CA3-Region begrenzten Stratum lucidum, werden durch Nachweis spezieller Proteine ermöglicht. Im Gyrus dentatus findet man eine Aufteilung in das dendritische Stratum moleculare und das zellreiche Stratum granulosum, welches die Somata der Körnerzellen enthält (Abb. 2) [64]. Die übrigen 10 % der hippocampalen Nervenzellen werden von GABAergen, inhibitorischen Interneuronen gebildet [64].

Die Hippocampusformation ist durch multiple Neuronenverbindungen mit anderen Hirnregionen vernetzt. Simplifiziert kann man dabei von jeweils einer hauptsächlich afferenten sowie einer dominierenden efferenten Projektionsbahn sprechen. Daneben existieren multiple Kollateralverbindungen der hippocampalen Neuronen untereinander sowie kommissurale Fasern zur Interaktion mit der kontralateralen Hippocampusregion. Aufgrund der ausgeprägteren Lateralisation des humanen Gehirns sind die Kommissurenfasern im Vergleich zum Nagergehirn in geringerem Umfang ausgebildet [54], [67]. Die meisten Afferenzen erreichen den Hippocampus, genauer die Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus, über glutamaterge Fasern des Tractus perforans, welcher hauptsächlich dem entorhinalen Kortex entstammt und sensorische Impulse aus dem gesamten Neokortex integriert und weiterleitet [53]. Bei den Verschaltungen des Tractus perforans bis hin zu den CA1-Neuronen kann man einen direkten und indirekten Weg unterscheiden, der speziesübergreifend nachgewiesen wurde [54]. Die direkte synaptische Verbindung befindet sich zwischen Axonen der Neuronen aus Schicht III des entorhinalen Kortex und den distalen Enden der apikalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen. Die indirekte Verbindung dagegen stellt eine unidirektionale, trisynaptische Verschaltung dar, beginnend mit Afferenzen aus Schicht II des entorhinalen Kortex über Körnerzellen des Gyrus dentatus (Moosfasern) und apikale Dendriten der CA3-Neuronen [68], welche schließlich über die topographisch organisierten sogenannten Schaffer-Kollateralen [69], [70] die Dendriten der Pyramidenzellen im CA1-Areal erreichen (siehe auch schematische Darstellung in Abb. 2). Beide Wege sind notwendig für die Ausbildung physiologischer Lern- und Gedächtnisvorgänge [34].

Weitere afferente Impulse erreichen den Gyrus dentatus aus dem Septum über die Fimbria hippocampi, aus dem Gyrus cinguli, aus den Corpora amygdaloidea und aus anterioren Thalamuskernen sowie in Form glutamaterger Kommissurenfasern vom kontralateralen HC [53], [54], [64], [71].

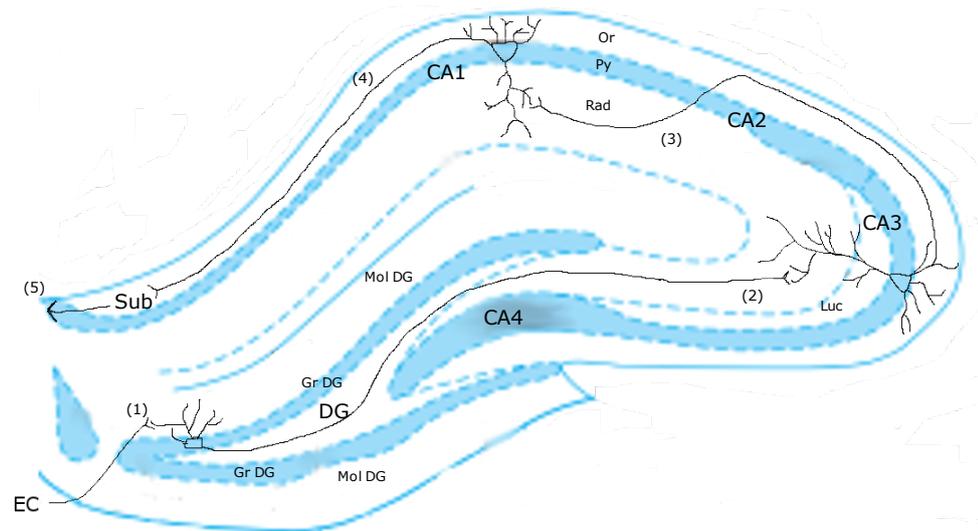


Abbildung 2: Schematische Repräsentation einer rechtshemisphärischen Hippocampusformation der Maus in der Frontalebene. Abgebildet sind die einzelnen Subregionen des Cornu ammonis CA1-4 mit der Dreischichtung in Stratum oriens (Or), pyramidale (Py), radiatum (Rad) und dem zusätzlichen, der CA3-Region vorbehaltenen Stratum lucidum (Luc) sowie der Gyrus dentatus (DG) mit seiner Schichteinteilung in Stratum granulosum (Gr) und moleculare (Mol). Des Weiteren ist eine simplifizierte Darstellung der unidirektionalen, trisynaptischen intrahippocampalen Verschaltung präsentiert: (1) Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex (EC) erreichen über den Tractus perforans die Körnerzellen des Gyrus dentatus, welche anschließend über Moosfasern (2) CA3-Neuronen innervieren, die wiederum über die sogenannten Schaffer-Kollateralen (3) eine Synapse mit den Pyramidenzellen der CA1-Region formieren. Diese geben schließlich Efferenzen (4) in Richtung Subiculum (Sub) ab, welches die hauptsächliche efferente Ausgangsstelle (5) des Hippocampus bildet. (Abbildung erstellt in Anlehnung an den stereotaktischen Atlas nach Paxinos und Watson [72] sowie zytoarchitektonische Beschreibungen nach Watson, Paxinos und Puelles [54]).

Nahezu alle Efferenzen des hippocampalen Neuronengefüges sind Bestandteil des Fornix, eines Bündels weißer Substanz, welches den Hippocampus mit dem ipsilateralen Corpus mammillare verbindet und im Verlauf Kollateralen an das Septum, Corpus amygdaloideum und den Hypothalamus abgibt [53], [64].

Neben den dominierenden Afferenzen sowie Efferenzen ist der Hippocampus in weitere übergeordnete neuronale Schaltkreise, wie beispielsweise den sogenannten Papez-Neuronenkreis, involviert. Dabei handelt es sich um eine mehrstufige, zirkuläre Verknüpfung, beginnend mit dem sogenannten Vicq-d'Azur-Bündel (Tractus mamillothalamicus), über verschiedene Areale des limbischen Systems hin und schließlich mit einer Verbindung zurück zu den Körnerzellen des Gyrus dentatus [53], [64].

Auch innerhalb des Hippocampus existieren mannigfaltige neuronale Verknüpfungen sowie regulatorische Feedback-Schleifen [55], [69]. Ein Beispiel für solche rekurrenten Kollateralen sind die Körnerzellen des DG, die nicht nur auf die CA3-Neuronen projizieren, sondern auch auf sogenannte Mooszellen in der Hilusregion, welche anschließend einerseits direkt reziprok und andererseits über Interneuronen Einfluss auf die Ursprungszelle nehmen [68].

Bei der Konsolidierung expliziter Gedächtnisinhalte scheint vor allem die Verbindung der CA3-Neuronen untereinander sowie mit den CA1-Neuronen über die Schaffer-Kollateralen eine herausragende Rolle zu spielen [40], [55]. Die Langzeitgedächtnisfunktion beruht auf dauerhaften, stabilen synaptischen Verbindungen zwischen den hippocampalen Neuronen, welche sich aufgrund der sogenannten Langzeit-Potentierung (LTP) etablieren. Bei der ausschlaggebenden späten Form der LTP bedarf es einer hochfrequenten und andauernden Stimulusfolge mit konsekutiver Aktivierung eines Signalweges, welcher über zwischengeschaltete Enzyme und die Modifikation von Transkriptionsfaktoren die *De-novo*-Synthese von Proteinen ermöglicht, welche beispielsweise zur Ausbildung neuer Synapsen benötigt werden. Eine wichtige Rolle im Prozess dieser Langzeit-Potenzierung spielen exzitatorische Glutamaterezeptoren, dabei insbesondere der NMDA-Rezeptor (siehe auch Kapitel 2.2.1). Um LTP auszulösen, bedarf es bei verschiedenen Arten von Nervenzellen jeweils unterschiedlicher Umstände. Bei den glutamatergen Pyramidenzellen im Hippocampus liegt zumeist eine Koexpression von NMDA- und AMPA-Rezeptoren [34] vor. So kann beispielsweise durch Modifikation der AMPA-Rezeptordichte eine Verstärkung exzitatorischer postsynaptischer Potentiale (EPSP) erreicht und LTP initiiert werden. Diese rezeptorabhängige Form synaptischer Plastizität stellt eine wichtige strukturelle Grundlage des Lernprozesses dar [55], [57].

2.3.3 Kortexareale

Die im Folgenden kurz umrissene strukturelle Ontogenese und grundsätzliche Zytoarchitektur sind im humanen Neokortex und in dem der Maus vergleichbar, während beispielsweise Unterschiede in Konnektivität oder Anzahl der Neuronen [73], [74] immer wieder diskutiert werden [54]. Die in der vorliegenden Arbeit analysierten Areale M1, S1 und S2 gehören dem Neo- oder Isokortex an, welcher den phylogenetisch jüngsten Teil des Gehirnes darstellt [53]. Die Bezeichnung Isokortex ist dabei von dem einigermaßen gleichförmigen histologischen Aufbau der Hirnrinde abgeleitet, einer groben Sechsschichtung mit jeweils regionalen zytoarchitektonischen Besonderheiten.

Bei diesen Schichten handelt es sich ausgehend von der Hirnoberfläche ins Hirninnere um: I Molekularzellschicht (Lamina molecularis), II äußere Körnerzellschicht (Lam. granularis externa), III äußere Pyramidenzellschicht (Lam. pyramidalis externa), IV innere Körnerzellschicht (Lam. granularis interna), V innere Pyramidenzellschicht (Lam. pyramidalis interna), VI multiforme Schicht (Lam. multiformis).

Dabei wird der hauptsächliche Anteil an kortikalen Neuronen von Pyramidenzellen gebildet (85 %). Die übrigen Neuronen der Hirnrinde bilden eine inhomogene Gruppe, die meist über GABAerge Synapsen als inhibitorische, intrakortikale Interneuronen agieren, und sind unter dem Begriff der Nicht-Pyramidenzellen zusammengefasst [64].

2.3.3.1 Primärer somatomotorischer Kortex

Der primäre somatomotorische Kortex (M1) repräsentiert zusammen mit dem prämotorischen, dem supplementärmotorischen und dem cingulär-motorischen Kortex die kortikale Steuerungseinheit des willkürlichen motorischen Systems. Bei M1 finden sich als histologische Charakteristik eine sogenannte agranuläre Rindenschichtung mit Fehlen der Lamina granularis interna (IV) sowie eine besonders ausgeprägte innere Pyramidenzellschicht (V), welche prägnante Pyramidenzellen, sogenannte Betz-Zellen, beinhaltet [53]. Diese Zytoarchitektur ist insofern eng mit der Funktionsweise verknüpft, als dass M1 den wichtigsten Ausgangspunkt für motorische Efferenzen in Richtung Hirnstamm und Rückenmark darstellt. Diese werden verkörpert durch die Axone der Betz-Zellen aus Lamina V und formen als Tractus corticospinalis und Tractus corticonuclearis den Hauptanteil der Pyramidenbahn, welche die größte existierende absteigende Bahn darstellt [64].

Als Endpunkt der Bewegungsplanung erreichen den primären Motorkortex Signale einerseits aus subkortikalen, ventralen Thalamuskernen, welche ihrerseits wiederum Signale aus der Peripherie, dem Kleinhirn und den Basalganglien entgegennehmen, und andererseits Zuflüsse aus anderen kortikalen Regionen, insbesondere dem supplementärmotorischen, dem prämotorischen und dem primären somatosensiblen Kortex. Die Entgegennahme und Integration von Afferenzen sowie deren Weiterverarbeitung und die Ausbildung efferenter Signale sind in M1 somatotop gegliedert, wobei Neuronen eigens zusammengehörige Gruppen bilden und sich dadurch verantwortlich zeigen für die Steuerung eines größeren motorischen Gefüges, beispielsweise eines Armes [75] oder Tasthaares [54]. Diese Somatotopie ist auch in den absteigenden Bahnen repräsentiert.

Der primäre somatomotorische Kortex ist somit als Endstation der zentralen Bewegungsplanung und Startpunkt der Bewegungsausführung vor allem für die willkürmotorische Steuerung der kontralateralen Körperhälfte zuständig, insbesondere für distale Muskelgruppen, welche feinmotorische Bewegungen ausführen können [53], [64].

2.3.3.2 Primärer und sekundärer somatosensorischer Kortex

Allen sensorischen Rindenfeldern gemeinsam ist ein besonderer histologischer Aufbau mit auffallend markanter Ausprägung der Lamina granularis interna (IV). Durch die Dendriten der vergleichsweise hohen Anzahl dort lokalisierter Körnerzellen kann die Hauptaufgabe der sensorischen Kortexareale, der Empfang und die Weiterverarbeitung von Informationen aus der Peripherie, bewältigt werden. Zusätzlich besteht eine vertikale Organisation durch Ausbildung von sogenannten Kolumnen, welche Zielgebiete umschriebener Afferenzen einer bestimmten Körperregion darstellen, wodurch eine somatotop Repräsentation in der Hirnrinde erreicht wird. Je umfassender ein peripheres Gebiet sensibel versorgt und je größer die räumliche Auflösung ist, desto größer ist auch die zugehörige Kolumne im

Kortex [76].

Der primäre somatosensorische Kortex (S1) ist das wesentliche Ziel von Projektionen, die den ventral-posterioren Thalamuskernen entstammen, welche selbst wiederum hauptsächlich Zufluss über die sensiblen Hinterstrangbahnen der jeweils kontralateralen Körperhälfte erhalten [64]. Neben der somatotopen Aufgliederung von S1 kann eine weitere Aufteilung in Subregionen anhand einer Differenzierung hinsichtlich der Submodalität des sensiblen Reizes (Berührung, Druck, Vibration, Propriozeption, Schmerz, Temperatur) unternommen werden [53], [55].

Dem primären somatosensorischen Kortex obliegt die Aufgabe, periphere Reize in erster Linie wahrzunehmen, um diese dann zur Weiterverarbeitung zu sekundären somatosensorischen Bereichen weiterzuleiten. Es besteht ein neuronales Netzwerk aus kortiko-kortikalen Assoziationsfasern zwischen S1 und sekundär sensorischen Rindengebieten sowie eine interne Vernetzung der Subregionen des primär somatosensorischen Kortex [55]. Zusätzlich werden efferente Fasern als Teil der Pyramidenbahn in Richtung sensibler Hirnnervenkerne, Rückenmark und Thalamus entsendet, wo sie modulatorisch auf eintreffende sensible Signale einwirken können [64]. Speziesübergreifend besteht zudem eine enge Kommunikation zwischen sensorischem und motorischem Kortex. Bei Nagetieren scheint dies vergleichsweise besonders ausgeprägt, sodass teilweise eine Überlappung der Kortexareale M1 und S1 beschrieben wurde [54], [77], [78].

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Analyse verschiedener Rezeptordichten zweier Subregionen des primären somatosensorischen Kortex, zum einen der *trunc region* und zum anderen des *barrel field*. Bei Letzterem handelt es sich um eine besondere Anordnung von Neuronen der Schicht IV bei Nagetieren, deren Gruppierung fassförmig erscheint und jeweils ein Tasthaar des Tiermaules repräsentiert [76].

Auch das sekundäre somatosensorische Kortexareal (S2) ist ein somatotop organisiertes Zielgebiet thalamokortikaler Bahnen. Im Gegensatz zu S1 empfängt der sekundär sensorische Kortex jedoch Signale sowohl aus der ipsi- als auch aus der kontralateralen Körperhälfte. Darüber hinaus erreichen S2 auch kortikale Zuflüsse, im Sinne des reziproken Informationsaustausches, insbesondere aus S1 und den sensorischen Rindengebieten der kontralateralen Hemisphäre sowie einem Teil des posterioren parietalen Kortex, einem sekundär sensorischen Rindengebiet. Die Funktion dieser Kortexfelder und von S2 besteht vorrangig in der Zuordnung und weiteren Deutung der in S1 bewusst detektierten Reize [64].

3 Material und Methoden

3.1 Materialien – tabellarische Auflistung

In den nachfolgenden Tabellen ist eine Auflistung der für die Durchführung der verschiedenen Methoden benötigten Chemikalien, Liganden und Kompetitoren, Antikörper und Detektionskits sowie der für die Gewebeaufbereitung verwendeten Geräte und Laborprodukte und der zur Analyse eingesetzten Softwareprodukte zu finden.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Firmensitz	Bestellnummer
Aqua B. Braun	Braun	Melsungen	0082479E
Ammoniak	Merck	Darmstadt	1.05432.100
Citronensäure	Roth	Karlsruhe	5110.1
Cytoseal	Thermo Fisher	Waltham MA, USA	8312.4
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt	1.063420.250
Essigsäure	Roth	Karlsruhe	3738.1
Glutamat	Roth	Karlsruhe	6052.1
Isopentan	Riedel-de-Haen	Schwerte	59070
Kaliumchlorid	Merck	Darmstadt	1.04936
Kaliumchromat	Merck	Darmstadt	1.04952.0250
Kaliumdichromat	Merck	Darmstadt	P744.3
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt	4873
Kaliumthiocyanat	Merck	Darmstadt	105125
Ethanol absolut	AppliChem	Darmstadt	A1613
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe	3957.1
Paraffin	Sakura Finetek	Staufen	4509
Super-Fix 1:6	Tetenal	Norderstedt	102762
Saccharose	Merck	Darmstadt	107687
Salzsäure 37%	Merck	Darmstadt	1.00317
3-Triethoxysilyl-Propylamin	Merck	Darmstadt	821619
Tris	Roth	Karlsruhe	4855.2
Triton X 100	Sigma-Aldrich	St. Louis MO, USA	T-8787
Quecksilber(1)chlorid	Merck	Darmstadt	1.04419.0050
Xylol	Merck	Darmstadt	808691
Wasserstoffperoxid	Merck	Darmstadt	107298

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Liganden (jeweils mit Tritium [^3H] markiert)

Rezeptor	Ligand	Spezifische Aktivität	Hersteller	Firmensitz	Bestellnummer
AMPA	AMPA	42,1 Ci/mmol	Perkin Elmer	Waltham MA, USA	NET-833
GABA _A	Muscimol	35,6 Ci/mmol	Perkin Elmer	Waltham MA, USA	NET-574
NMDA	MK-801	27,5 Ci/mmol	Perkin Elmer	Waltham MA, USA	NET-972

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Kompetitoren

Rezeptor	Kompetitor	Konzentration	Hersteller	Firmensitz	Bestellnummer
AMPA	Quisqualat	10mM/ml	Abcam	Cambridge, UK	ab146666
GABA _A	GABA	10mM/ml	Sigma-Aldrich	St. Louis MO, USA	A2129
NMDA	MK-801-Hydrogenmaleat	100µM/ml	Sigma-Aldrich	St. Louis MO, USA	M-107

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Firmensitz	Bestellnummer
MAP2	Synaptic Systems	Göttingen	M4403
Synaptobrevin	Synaptic Systems	Göttingen	104202
Synaptophysin	Synaptic Systems	Göttingen	101011

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Detektionskits

Kit	Hersteller	Firmensitz
DAB Labvision	Thermo Fisher	Waltham MA, USA
Vectastain Elite ABC PK-6101	Vector Laboratories	Burlingame CA, USA
Vectastain Elite ABC PK-6102	Vector Laboratories	Burlingame CA, USA

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Laborprodukte

Produkt	Hersteller	Firmensitz	Bestellnummer
Immersionsöl	Leica	Solms	11944399
Rundfilter-Papier	Roth	Karlsruhe	A7871
[^3H]-Microscales STD	GE Healthcare	Chicago IL, USA	PRPA 506 Batch 20
[^3H]-Hyperfilm	GE Healthcare	Chicago IL, USA	RPN 535B

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Firmensitz
Autostainer EnVisionFLEX	Dako	Glostrup, Dänemark
CoolSNAP Kamera	Roper Scientific	Ottobrunn/München
Kryostat HM560	Microm	Walldorf
Leica DM 6000B Mikroskop	Leica	Solms
PT Link	Dako	Glostrup, Dänemark
Vibratom Leica VT 1000S	Leica	Solms

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Software und Datenbanken

Software/Datenbank	Hersteller	Firmensitz
Analyse-it TM 2.22 für MS Excel	Analyse-it-Software Ltd.	Leeds AL, UK
MS Office Paket 2010	Microsoft	Redmond WA, USA
MCID TM Image Analysis 7.0	MCID	Linton, UK
NeuroLucida 8.0	MicroBrightField Inc.	Williston VT, USA
Neuroexplorer 8.0	MicroBrightField Inc.	Williston VT, USA
NCBI		Bethesda MD, USA

3.2 Pufferlösungen

Für die Durchführung der unterschiedlichen Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit Anwendung gefunden haben, war der Einsatz einiger Pufferlösungen notwendig. Eine Übersicht der Versuchsprotokolle zur Herstellung der verwendeten Pufferlösungen findet sich im Anhang unter **A** aufgelistet.

3.3 Knockout Tiere

Der Begriff der Knockout Tiere wird für Organismen verwendet, in deren Genom ein bestimmtes Gen ausgeschaltet wird. Mittels Einbringen eines rekombinanten inaktivierenden Genabschnittes in embryonale Stammzellen wird molekulargenetisch der gewünschte Knockout erzielt. Durch Injektion dieser Zellen in embryonale Blastozysten wird das veränderte Genom in die Keimbahn eingebracht und es entwickeln sich heterozygote Chimären, welche weiter verpaart werden können, um schließlich homozygote Knockout Tiere zu erhalten [34]. Dieses gezielte Ausschalten eines Gens ermöglicht es, seine Funktion *in vivo* zu untersuchen. Dabei werden stets die Resultate der Knockout Tiere mit denen einer

Wildtyp Kontrollgruppe auf Diskrepanzen hin überprüft.

Um ein besseres Verständnis zur Funktion des Proteins NECAB2 zu erhalten, wurde für die vorliegende Arbeit ein NECAB2-Knockout Mausmodell generiert und hinsichtlich einiger struktureller und funktioneller Aspekte untersucht. Die verwendeten gentechnisch veränderten Mäuse stammen von der Firma KOMP Repository mit Sitz in Davis, California, USA. Dort wurden nach Genotypisierungsprotokoll 5 heterozygote NECAB2-defiziente Tiere generiert. Dabei handelte es sich um 2 Weibchen und 3 Männchen. Die heterozygoten Männchen wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz mit weiblichen Wildtyp-C57Bl/6-Mäusen, einem für Forschungszwecke häufig benutzten Inzuchtstamm, verpaart. Nach anschließenden Untersuchungen des Erbgutes der Nachkommen mittels PCR wurden schließlich nur die heterozygoten Tiere weiter verpaart, wodurch es sich in der dritten Generation bei 25 % der Nachkommen um homozygot NECAB2-defiziente Tiere handelte. Diese Homozygoten wurden wiederum durch PCR bestätigt und selektiert, sodass im weiteren Verlauf jeweils nur noch homozygote NECAB2-defiziente (NECAB2^{-/-}) bzw. homozygote Wildtyp-Tiere (NECAB2^{+/+}) untereinander gekreuzt wurden.

Die Tiere wurden unter einem 12-Stunden-hell- und 12-Stunden-dunkel-Zyklus mit freiem Zugang zu Futter und Wasser aufgezogen.

Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich adulte männliche Tiere mit einem Alter von 12 Wochen verwendet.

Tabelle 9: Übersicht der Tierzahlen je Methode

Methode	NECAB2 +/+	NECAB2 -/-
Golgi-Cox-Imprägnierung	6	5
<i>In-vitro</i> Rezeptorautoradiographie	7	7
Immunhistochemie	10	10

3.4 Golgi-Cox-Imprägnierung

Die Methode nach Golgi-Cox bietet eine sehr gute Möglichkeit, die strukturelle Zytoarchitektur von Hirngewebe und die präzise Morphologie einzelner Neuronen darzustellen. Unter dem Namen *black reaction* wurde diese Methode bereits 1873 von Camillo Golgi erstmals beschrieben. Durch Neuerung und Modifikation entwickelte Cox daraus 1891 die Golgi-Cox-Methode. Seitdem wurden in vielen Studien weitere Möglichkeiten zur Modifikation dieser Methodik untersucht und unterschiedliche Variationen der Golgi-Cox-Imprägnierung entwickelt [79], [80], [81]. Der grundsätzliche Mechanismus dieser histologischen Methode liegt in einem Niederschlag von metallischem Quecksilber und komplexen

Quecksilberoxiden im neuronalen Zytosol, wodurch die Neuronen in ihrer Gesamtheit, inklusive Soma, Dendriten und Spines, sichtbar gemacht werden [82]. Eine Besonderheit der Golgi-Cox-Methode besteht darin, dass nur ein geringer Prozentsatz der Nervenzellen eines Präparates angefärbt wird. Diese Anzahl variiert je nach Autor zwischen <1 % und 5 % [80], [83], [84], wobei es zufällig und unvorhersehbar scheint, welches Neuron angefärbt wird und welches nicht [85]. Die übrigen Nervenzellen im Präparat verbleiben ungefärbt, sodass sich die Golgi-Cox-gefärbten Neuronen in ihrer vollständigen Morphologie vor weitestgehend transparentem Hintergrund gut kontrastieren [86].

3.4.1 Golgi-Cox-Lösung

Zur Herstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Golgi-Cox-Lösung benötigt man drei Teillösungen (A,B,C).

1. Lösung A: 37,5 g Kaliumdichromat gelöst in 750 ml Aqua bidest
2. Lösung B: 37,5 g Quecksilber(1)chlorid gelöst in 750 ml Aqua bidest
3. Lösung C: 30 g Kaliumchromat gelöst in 600 ml Aqua bidest

Die Lösungen A, B und C werden im Anschluss gemischt und zusätzlich mit 1500 ml Aqua bidest versetzt. Nach fünftägiger Inkubation im Dunkeln und anschließender Filtration ist die Lösung gebrauchsfertig.

3.4.2 Präparation und histologische Aufarbeitung der Gehirne

Für die Untersuchungen nach der Golgi-Cox-Methode wurden insgesamt 11 Tiere verwendet, aufgeteilt in sechs Wildtyp- (n=6) und fünf NECAB2-Knockout Mäuse (n=5).

Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von jeweils 1 ml Lösung aus 20 % Ketamin und 2,5 % Xylazin anästhesiert und sediert. Nach Überprüfung, ob die Zwischenzehenreflexe erloschen waren und somit eine ausreichende Narkosetiefe bestand, wurde der Abdominalraum eröffnet. Das Diaphragma wurde durchtrennt, um das Herz freizulegen und daraufhin die Tiere mit jeweils 30 ml Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) intrakardial zu perfundieren. Anschließend wurde das Gehirn entnommen und unter Lichtausschluss direkt in jeweils 20 ml auf 4 °C gekühlte Golgi-Cox-Lösung verbracht.

Der im Folgenden beschriebene Imprägnierungsprozess wurde nach der durch Gibb und Kolb modifizierten Golgi-Cox-Methode durchgeführt [79].

Die Inkubationszeit der Gehirne in der Golgi-Cox-Lösung betrug 14 Tage. Damit das Gewebe bei der weiteren Verarbeitung weniger brüchig war, wurden die Hirne daraufhin für mindestens zwei weitere Tage in 30%ige Saccharoselösung transferiert. Im Anschluss daran wurden am Vibratom 150 µm dicke koronare Schnitte gefertigt, welche in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) aufgefangen und auf einen mit TESPA (3-Triethoxysilyl-Propylamin) beschichteten Objektträger verbracht wurden. Bei allen Objektträgern mit anhaftenden Schnitten erfolgte eine Trocknung mit Filterpapier. Die weitere Bearbeitung fand in einer feuchten Kammer statt. Dort folgte auf eine 1-minütige Spülung mit Aqua bidest die Inkubation in 25%iger Ammoniaklösung für 30 Minuten unter Lichtausschluss. Nach wiederholter 1-minütiger Spülung mit Aqua bidest wurden die Schnitte zur Fixierung für die Dauer von weiteren 30 Minuten bei Dunkelheit in Super Fix 1:6 überführt. Anschließend knüpfte, nach erneuter Spülung mit Aqua für eine Minute, die sequentielle Entwässerung des Gewebes in Ethanollösungen aufsteigender Konzentration an. Die Präparate verblieben jeweils eine Minute in 50%igem, 70%igem und 95%igem Ethanol sowie zweimal für fünf Minuten in 100%igem Ethanol. Nachdem die Hirnschnitte anschließend dreimal für jeweils zehn Minuten in Xylol entfettet worden waren, konnten sie abschließend mit Cytoseal eingedeckt werden.

Um ein Nachdunkeln der Schnitte durch Licht zu verhindern, wurden die Objektträger bis zur morphologischen Analyse im Dunkeln aufbewahrt.

3.4.3 Identifikation und Selektion der Neuronen

Anhand des Atlas von Paxinos und Watson [87] wurden die Zielregionen mittels eines Lichtmikroskops in niedriger Vergrößerung lokalisiert. Die Identifikation der zu markierenden Neuronen erfolgte in hoher Vergrößerung nach deren spezifischer Morphologie. Die Medium Spiny Neurons (MSN) sind im Striatum an charakteristischen Dendritenbäumen mit vielen Spines und der Größe des Somas zu erkennen [88], [89], [90]. Kennzeichnend für hippocampale CA1-Pyramidenzellen sind die trianguläre Form des Somas und der lange apikale Dendrit, welcher in Richtung des Gyrus dentatus orientiert ist [91]. Die Auswahl der Neuronen für die weitere Auswertung erfolgte nach bereits etablierten Kriterien [92], [93], womit nur Nervenzellen in die Analyse aufgenommen wurden, welche folgende Bedingungen erfüllten:

1. Entlang der z-Achse soll der Zellkörper etwa im mittleren Drittel des Schnittes liegen, damit der gesamte Dendritenbaum erfasst werden kann.
2. Die Dendriten sollen nicht durch benachbarte Neuronen, Gliazellen, Blutgefäße oder sonstige Präzipitate überlagert sein.
3. Alle Verzweigungen sollen deutlich gefärbt sein und sich in einem Schnitt bis zum distalen Ende verfolgen lassen.

Zusätzliches Kriterium bei der Selektion der MSN war, dass die Neuronen auf Höhe der

vorderen Kommissur liegen müssen. Die zu markierenden Neuronen beider Zielregionen sollten zudem etwa gleichmäßig auf beide Hemisphären verteilt sein.

Zur Bestimmung der Dichte an Spines wurden sowohl für die MSN als auch für die CA1-Pyramidenzellen pro Neuron die dornenartigen Ausstülpungen zweier Dendritenabschnitte ausgezählt. Dabei fiel die Auswahl auf jeweils einen Dendriten dritter und vierter Ordnung, da diese Ordnungen bei beiden Neuronenpopulationen erwartungsgemäß anzutreffen sind und sich an Dendriten niedriger, insbesondere erster Ordnung häufig nur wenige Spines finden [94]. Die Analyse der dendritischen Spines musste an einem mindestens 10 μm langen Stück erfolgen.

3.4.4 Rekonstruktion und Auswertung

Die Markierung der Neuronen erfolgte verblindet unter Verwendung eines LeicaDM6000B-Mikroskopes, welches mit dem computergesteuerten Bildanalysesystem Neurolucida (Version 8.0) der Firma MBF Bioscience verbunden war. Dieses bietet mit seinen vielfältigen Möglichkeiten der dreidimensionalen Darstellung von gesamten Neuronen oder auch nur einzelnen Komponenten ein besonderes Instrument, um Nervenzellen morphologisch zu analysieren [95], [96]. In 40facher Vergrößerung erfolgten die Kennzeichnung des Zellkörpers an dessen größtem Durchmesser sowie die Markierung aller Dendriten. Die Markierung der Spines erfolgte unter dem Gebrauch von Immersionsöl in der 100fachen Vergrößerung. Dabei wurden die Spines an Dendritenabschnitten von mindestens 10 μm Länge an Dendriten dritter und vierter Ordnung ausgezählt.

Mithilfe der Begleitsoftware Neuroexplorer können die für jedes Neuron individuell erfassten morphologischen Daten unter verschiedenen Gesichtspunkten analysiert werden [96]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Anzahl und Länge der Dendriten, deren Knotenpunkte und die Anzahl der vorhandenen Äste verschiedener Ordnungen untersucht. Diese dendritischen Parameter wurden bei den CA1-Neuronen getrennt für apikale und basale Dendriten analysiert. Des Weiteren wurde anhand der ausgezählten Anzahl an Spines deren Dichte je Mikrometer (μm) berechnet. Um die Komplexität der einzelnen Neuronen zu untersuchen, wurde zusätzlich eine Analyse nach Sholl angewendet [97]. Dabei werden virtuelle konzentrische Ringe, auch Shollsphären genannt, in schrittweise ansteigendem Radius um das Zellsoma gelegt und auf jedem Level die Anzahl der Kreuzungspunkte mit den virtuellen Kreisen sowie die Länge, Anzahl und Ordnung der darin vorhandenen Dendritenabschnitte angezeigt. Dieses Vorgehen ist in Abbildung 3 am Beispiel eines Medium Spiny Neurons visualisiert.

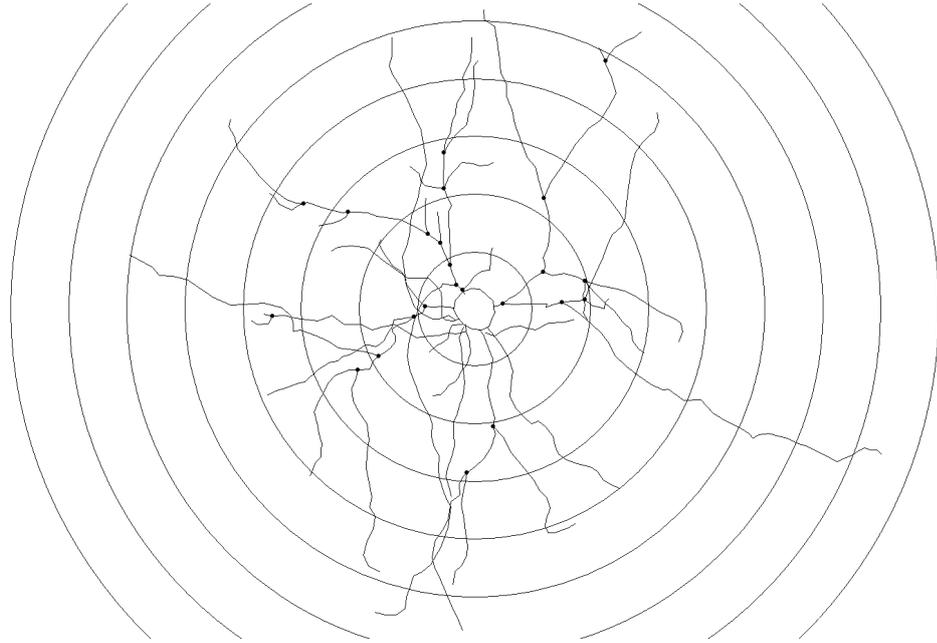


Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung der Methode nach Sholl zur Bestimmung neuronaler Zellkomplexität mithilfe virtueller, konzentrischer Kreise eines beliebigen, schrittweise ansteigenden Radius ausgehend vom Zellsoma. Hier demonstriert am Beispiel eines Medium Spiny Neurons. Radius der Shollsphären: 10 μm ausgehend vom Zellsoma.

3.5 *In-vitro* Rezeptorautoradiographie

Mithilfe der *In-vitro* Rezeptorautoradiographie besteht die Möglichkeit, quantitative Bindungsdichten spezifischer Liganden an ihren jeweiligen Neurotransmitterrezeptoren darzustellen. Dafür werden Hirnschnitte mit radioaktiv markierten Liganden des zu untersuchenden Rezeptors inkubiert und anschließend auf einem für diesen Liganden sensitiven Film exponiert. Als radioaktive Tracer wurden in diesem Falle ausschließlich mit dem Wasserstoffisotop Tritium (^3H)-markierte Liganden eingesetzt. Der photographische Film zeichnet nun den β -Zerfall der radioaktiven Isotope auf, sodass man ein Abbild der Verteilung der Radioaktivität im Gewebeschnitt in Graustufen, ein sogenanntes Autoradiogramm, gewinnt. Durch die Koexpression eines normierten ^3H -Plastikstandards mit bekannter Radioaktivität wird computergestützt eine Kalibrierungskurve erstellt. Durch Analyse der optischen Dichte in den Autoradiogrammen und Abgleich mit der standardisierten Kalibrierungskurve kann das Maß der Rezeptorbindungsdichten berechnet werden. Zu beachten ist, dass die verwendeten Liganden zwar hochaffin zu ihren jeweiligen Bindungsstellen am spezifischen Rezeptor sind, jedoch auch in geringerer Stärke an anderen Rezeptoren binden können [98]. Durch die Inkubation einzelner Gewebeschnitte mit einem Kompetitor (siehe Kapitel 3.5.2) und die Bestimmung der unspezifischen Bindung des Liganden im Gewebe wird dieser möglichen Verzerrung der Ergebnisse entgegengewirkt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Rezeptorbindungsdichten von spezifischen Ligan-

den der glutamatergen, exzitatorischen Neurotransmitterrezeptoren NMDA und AMPA sowie des inhibitorischen Rezeptors GABA_A untersucht.

3.5.1 Präparation und histologische Aufarbeitung der Gehirne

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gehirne von 14 adulten männlichen Mäusen im Alter von 12 Wochen verwendet, darunter jeweils sieben Wildtyp- und sieben NECAB2-Knockout Tiere (n=7).

Die Versuchstiere wurden in einer mit Isofluran gefüllten Kammer narkotisiert und im Anschluss dekapitiert. Die Gehirne wurden entnommen und zunächst für zehn Minuten in -20 °C kaltes Isopentan verbracht. Mit dem Kryostaten wurden bei -20 °C in koronarer Schnittführung Gehirnschnitte mit der Dicke von jeweils 20 µm auf der Höhe des Putamen und des dorsalen Hippocampus gefertigt. Diese Schnitte wurden auf mit TESPA beschichtete Objektträger aufgebracht und bei Raumtemperatur über zwei Stunden getrocknet. Zur Konservierung der Präparate erfolgte anschließend eine Vakuumierung.

3.5.2 Ablauf der radioaktiven Markierung

Bei den verwendeten radioaktiven Liganden handelt es sich um [³H]MK-801, [³H]AMPA und [³H]Muscimol, die sich bereits in früheren Studien zur Untersuchung von Bindungsdichten dieser Rezeptoren bewährt haben [98], [99], [100], [101], [102].

Der Ablauf der radioaktiven Markierung erfolgte in Anlehnung an die von Zilles et al. entwickelten Protokolle [103]. Grundsätzlich umfasst die Methode der Markierung eines Gewebes mit radioaktiven Liganden drei Schritte. Beim ersten Schritt handelt es sich um eine Vorinkubation des Gewebes in entsprechender Pufferlösung mit dem Ziel, endogene Liganden, Enzyme und Zelldebris zu entfernen. Anschließend folgt im zweiten Schritt die Hauptinkubation mit dem entsprechenden radioaktiv markierten Liganden unter bestimmten jeweils ligandenabhängigen Versuchsbedingungen. Durch gewisse Modifikationen dieser Versuchsmodalitäten, beispielsweise durch Änderung des pH-Wertes oder der Temperatur, kann ein bestmögliches Ergebnis in der Bindung des spezifischen Liganden an seinen Rezeptor erreicht werden. Daraufhin werden im dritten Schritt die Gewebeschnitte noch einer Waschung und Trocknung unterzogen. Neben der gewünschten Bindung des radioaktiven Liganden an seinen Rezeptor kommt es zusätzlich zur unspezifischen Bindung an andere Gewebekomponenten, was in der Analyse der Rezeptorbindungsichten zu falsch hohen Ergebnissen führen könnte. Um diesen Fehler zu umgehen, werden einzelne Gewebeschnitte neben der Inkubation mit dem radioaktiv markierten Liganden zusätzlich mit einem sogenannten Kompetitor behandelt. Dieser Stoff agiert dabei als hochaffiner

Agonist am gleichen Neurotransmitterrezeptor. Durch die vergleichsweise sehr hohe Affinität des Kompetitors zum Rezeptor kommt es zur Verdrängung des eigentlichen Liganden von diesem, sodass nur die unspezifische Bindung im restlichen Gewebe verbleibt. Durch Subtraktion der optischen Dichte dieses unspezifischen Bindungsmusters von der totalen Rezeptorbindung in den eigentlich markierten Schnitten resultiert die spezifische Bindung des zu analysierenden Liganden an seinen Rezeptor. Eine Übersicht der in der vorliegenden Arbeit angewandten Versuchsprotokolle ist in Tabelle 10 dargestellt. Die getrockneten radioaktiv markierten Schnitte wurden anschließend auf einem tritiumsensitiven Film für 12 ($[^3\text{H}]$ MK-801 und $[^3\text{H}]$ Muscimol) bzw. 15 Wochen ($[^3\text{H}]$ AMPA) zusammen mit einem $[^3\text{H}]$ -Plastikstandard mit bekannten radioaktiven Konzentrationen exponiert. Der Grad der Schwärzung der durch Emission von β -Teilchen entstandenen Autoradiogramme ist abhängig von der jeweiligen zugrundeliegenden Radioaktivitätskonzentration. Dieser Zusammenhang wird nachfolgend zur Quantifizierung der Rezeptordichten genutzt. In den Abbildungen 4 und 5 sind beispielhaft die entwickelten Filme für jeden in dieser Arbeit untersuchten Rezeptor sowohl im Putamen als auch im Hippocampus dargestellt.

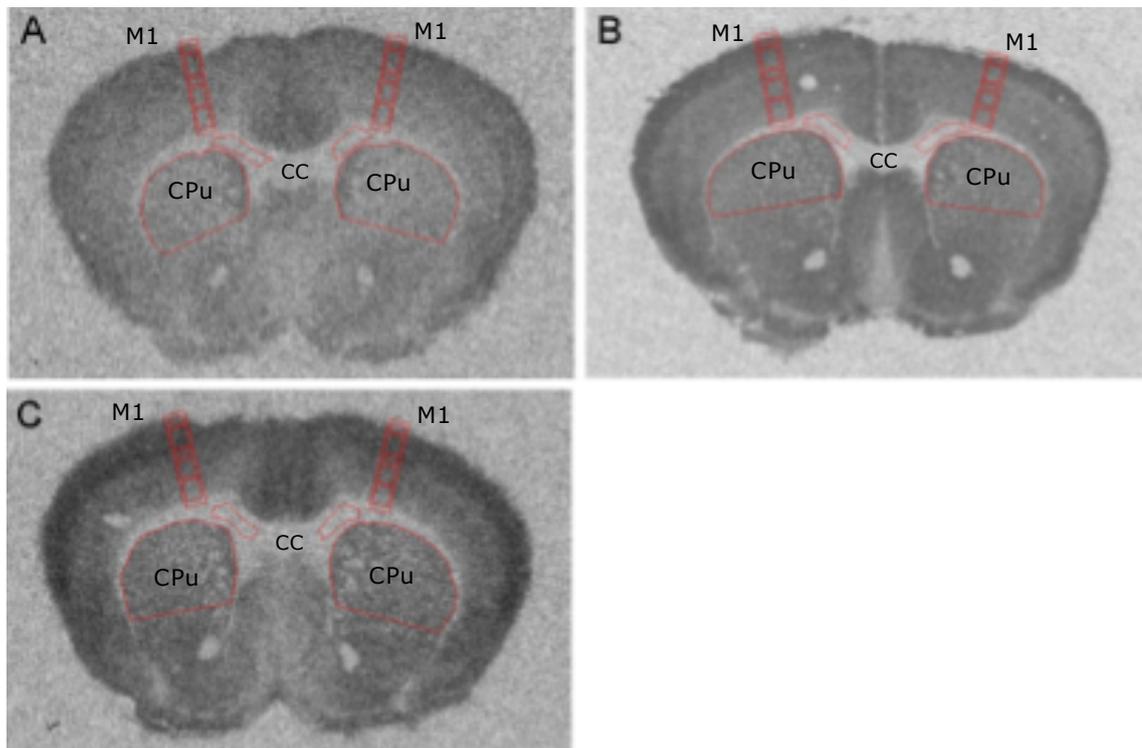


Abbildung 4: Repräsentative Autoradiogramme der Liganden $[^3\text{H}]$ MK-801 (A), $[^3\text{H}]$ AMPA (B) und $[^3\text{H}]$ Muscimol (C) auf Höhe des Putamen bei Knockout-Tieren. Rot markiert sind jeweils Messareale im oberen Teil des Putamen (CPu), im primären Motorcortex (M1) mit den Schichten I-VI (Schicht II und III zusammengefasst) und in Anteilen des Corpus callosum (CC).

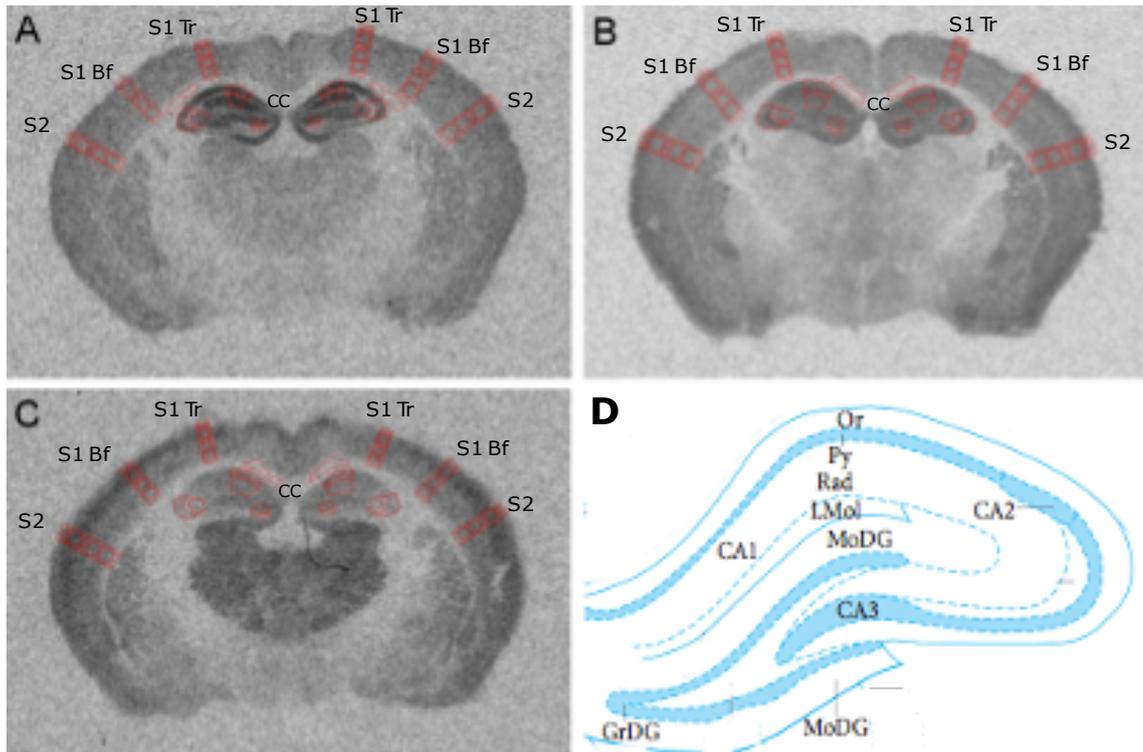


Abbildung 5: Repräsentative Autoradiogramme der Liganden $[^3\text{H}]$ MK-801 (A), $[^3\text{H}]$ AMPA (B) und $[^3\text{H}]$ Muscimol (C) auf Höhe des Hippocampus bei Wildtyp-Tieren.

Rot markiert sind jeweils Messareale der hippocampalen Regionen CA1 und CA3 mit genauer Schichtaufteilung in Stratum oriens (Or), Stratum pyramidale (Py) und Stratum radiatum (Rad) sowie der Gyrus dentatus (DG) mit Stratum moleculare (MolDG) und Stratum granulosum (GrDG), (vgl. Abb. D zur schematischen Übersicht; Abbildung erstellt in Anlehnung an den stereotaktischen Atlas nach Paxinos und Watson [72]). Weiterhin rot markiert sind die Messareale in den kortikalen Schichten I-VI (Schicht II und III zusammengefasst) der somatosensorischen Rindenregionen S1Tr, S1Bf sowie S2 und in Anteilen des Corpus callosum (CC).

3.5.3 Quantifizierung

Die Quantifizierung der Rezeptorbindungsichten erfolgte stets verblindet mit Hilfe des computergestützten Analysesystems MCID Image. Dafür wurden die Filme mit einer digitalen CoolSNAP-Kamera bei immer gleichen Lichtverhältnissen fotografiert und digitalisiert. Durch das Analysesystem MCID Image ist es möglich, manuell sowie mit Hilfe von Schablonen ausgewählte Regionen auf den Abbildungen der Autoradiogramme einzuzeichnen (vgl. Abb. 4 und 5). In der vorliegenden Arbeit wurden auf Striatumebene das Putamen und der primäre somatomotorische Kortex (M1) auf ihre Rezeptorbindungsichten hin untersucht. Zielregionen der Analysen auf Ebene des Hippocampus waren die hippocampalen Regionen CA1 und CA3 mit genauer Schichtaufteilung in Stratum oriens, Stratum pyramidale und Stratum radiatum sowie der Gyrus dentatus mit seinem Stratum moleculare und Stratum granulare. Auf dieser Schnittebene konnten zusätzlich der primäre somatosensorische Kortex (S1) mit seinen Subregionen *trunc region* (S1Tr)

und *barrel field* (S1Bf) sowie der sekundäre somatosensorische Kortex (S2) markiert werden. Bei allen untersuchten Rindenbereichen wurden die Schichten II und III aufgrund schlechter Differenzierbarkeit zusammengefasst markiert und analysiert. Zur Markierung der Kortexareale wurden vorgefertigte Schablonen verwendet, während die übrigen Zielregionen manuell markiert wurden. Die jeweiligen Regionen wurden mit Hilfe des Atlas von Paxinos und Franklin [87] identifiziert und gekennzeichnet. Diese Markierung der Zielregionen ist für die jeweiligen Liganden in Abbildung 4 auf Ebene des Striatums sowie in Abbildung 5 auf Höhe der Hippocampusformation exemplarisch dargestellt.

Aus den standardisierten Grauwerten des jeweils koexprimierten [³H]-Plastikstandards lässt sich eine nicht lineare Kalibrierungskurve erstellen, aus der sich die Korrelation eines bestimmten Grauwertes mit einem spezifischen Maß an Radioaktivität ableiten lässt. Das Computerprogramm misst automatisch die Grauwerte der markierten Zielregionen, aus welchen sich dann mittels der Kalibrierungskurve die zugehörige Radioaktivitätskonzentration und somit die spezifische Ligandenbindungsdichte berechnen lässt.

Zur besseren Veranschaulichung erfolgte nach Evaluation der spezifischen Ligandenbindungsdichten eine Umrechnung der Ergebnisse, sodass letztendlich die relative prozentuale Abweichung der Ligandenbindungsdichten der Knockout Tiere im Vergleich zur Wildtyp Gruppe dargestellt werden konnte.

Tabelle 10: Übersicht der eingesetzten Chemikalien, Liganden, notwendigen Versuchsbedingungen und Abläufe zur radioaktiven Markierung von Gewebeschnitten zur *In-vitro* Rezeptorautoradiographie der Neurotransmitterrezeptoren NMDA, AMPA und GABA_A in der vorliegenden Arbeit.

	NMDA	AMPA	GABA _A
Ligand	[³ H]-MK-801	[³ H]-AMPA	[³ H]-Muscimol
Präinkubation	50mM Tris-HCl 30mM Glutamat für 15 min bei 4°C pH 7,2	50mM Tris-Acetat 3x für 10 min bei 4°C pH 7,2	50mM Tris-Citrat 3x für 5 min bei 4°C pH 7,0
Hauptinkubation	5nM [³ H]-MK-801 50mM Tris-HCl 50µM Glutamat 50µM Spermidin 50µM Glycin für 60 min bei 22°C pH 7,2	10nM [³ H]-AMPA 50mM Tris-Acetat 100mM KSCN für 45 min bei 4°C pH 7,2	7,7nM [³ H]-Muscimol 50mM Tris-Citrat für 40 min bei 4°C pH 7,0
Kompetitor	100µM MK-801 50mM Tris-HCl 30µM Glutamat pH 7,2	5-10M Quisqualat 50mM Tris-Acetat pH 7,2	10mM GABA 50mM Tris-Citrat pH 7,0
Waschvorgang	2 x für 5 min in 50mM Tris-HCl pH 7,2 anschließend in Aqua dest. für 1 min bei 22°C	3 x für 4s in 50mM Tris-Acetat bei 4°C	3 x für 4s in 50mM Tris-Citrat bei 4°C pH 7,0

3.6 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ermöglicht durch verschiedene Färbe- und Markierungstechniken den Nachweis und das Sichtbarmachen bestimmter Proteine sowie deren semi-quantitative Detektion in unterschiedlichen Geweben. Grundlage dafür ist die Bindung spezifischer primärer Antikörper an das korrespondierende antigene Epitop. Um diese immunreaktive Bindung nachzuweisen und zu visualisieren, kann man innerhalb eines breiten Spektrums direkter und indirekter Nachweistechiken wählen, das von dem direkten Gebrauch eines bereits markierten Primärantikörpers bis hin zu komplexen, mehrschrittigen enzymatischen Reaktionen reicht. Die Markierung spezifischer Antigene mittels immunhistochemischer Methode deckt ein breites Anwendungsspektrum ab, welches von Forschungszwecken über klinische Diagnostik, insbesondere bei malignen Erkrankungen, bis hin zu zielgerichteter Therapie reicht [104], [105]. Ein großer Vorteil der Immunhistochemie gegenüber anderen Methoden zum Nachweis von Proteinen ist, dass die Zieleiweiße in ihrer genauen subzellulären Lokalisation dargestellt werden können. Durch Weiterentwicklungen dieser Technik, beispielsweise durch enzymatische Verstärkung des immunreaktiven Signals, können zudem auch sehr kleine Mengen an Antigen im Gewebe sichtbar gemacht werden [106].

In der vorliegenden Arbeit erfolgten die immunhistochemische Markierung und Analyse der neuronalen Proteine MAP2, Synaptobrevin und Synaptophysin innerhalb der Hippocampusformation von NECAB2-Knockout und Wildtyp Tieren.

Um die Bindung des Primärantikörpers an den antigenen Locus des jeweiligen Proteins sichtbar zu machen, wurde in dieser Arbeit die Avidin-Biotin-Komplex(ABC)-Methode verwendet. Dabei wird das Gewebe neben dem Primärantikörper zusätzlich mit einem biotinylierten sekundären Antikörper inkubiert und anschließend ein Reagenz, welches einen enzymatischen Komplex aus Avidin und Biotin enthält, zugefügt. Dieser Komplex bindet am Sekundärantikörper und sorgt nach Zugabe eines chromogenen Gemisches für die enzymatische Umsetzung der Komponenten zu einem stabilen, sichtbaren Farbstoff [106]. Bei dieser Methode ist zu beachten, dass die endogene Avidinbindung blockiert werden muss, um eine Verfälschung der Intensität der Immunreaktivität zu vermeiden [107]. Die optische Dichte des Farbstoffes kann schließlich computergestützt ermittelt werden und stellt ein semiquantitatives Maß für die vorhandene Menge des jeweiligen Proteins dar.

3.6.1 Präparation und histologische Aufarbeitung der Gehirne

Für die immunhistochemischen Untersuchungen der oben genannten Proteine wurden die Gehirne von jeweils 10 NECAB2-Knockout und 10 Wildtyp Tieren (n=10) mit dem Alter von 12 Wochen verwendet. Analog zur Gewebeprozessierung bei der *In-vitro* Rezeptor-

autoradiographie (Kapitel 3.5.1) wurden die Versuchstiere zuerst narkotisiert, bevor im Anschluss die Präparation des Abdominalraumes und die Perfusion mit PBS und anschließend mit 4%igem Paraformaldehyd vollzogen werden konnten. Nach Entnahme der Gehirne wurden mithilfe eines Mikrotoms Scheiben auf Höhe des Hippocampus gefertigt und in Paraffin eingebettet. Im Anschluss wurden daraus Schnitte der Dicke von 3-5 μm generiert und zur immunhistochemischen Markierung verwendet.

3.6.2 Ablauf der immunhistochemischen Markierung

Im ersten Arbeitsschritt wurden alle Schnitte automatisiert entparaffiniert. Die anschließende Weiterverarbeitung erfolgte bei Synaptobrevin und -physin manuell, während die Markierung von MAP2 automatisiert mittels des Autostainers von Dako vonstattenging. Die primären Antikörper wurden von der Firma Synaptic Systems erworben. Weiterhin fanden vorgefertigte Detektionskits Verwendung, welche die benötigten Reagenzien in standardisierter Zusammensetzung und Dosis zur Verfügung stellen.

Im Folgenden ist die Methodik zur immunhistochemischen Markierung von Synaptobrevin und Synaptophysin beschrieben. Bei beiden Proteinen bestehen identische Versuchsabläufe, welche sich nur bezüglich der verwendeten Reagenzien unterscheiden.

Vor der Anwendung des primären Antikörpers muss endogene Enzymaktivität, welche mit den enzymatischen Komponenten zum Nachweis des Antigens interferieren könnte, blockiert werden. Dies wird im ersten Schritt durch eine Inkubation mit 3%igem Wasserstoffperoxid für 30 Minuten erreicht. Anschließend erfolgt ein zweimaliger dreiminütiger Waschvorgang mit der Pufferlösung PBST. Danach wird mittels des Avidin/Biotin-Blocking-Kits endogenes Biotin blockiert, um die unerwünschte Bindung des ABC an gewebeeigenes Biotin zu verhindern. Nach der Inkubation der Schnitte für 20 Minuten in Normal Goat Serum (NGS) für Synaptobrevin und in Normal Horse Serum (NHS) für Synaptophysin erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut zweimal mit PBST für jeweils drei Minuten gewaschen. Danach folgte die Inkubation der Gewebeschnitte für 30 Minuten im jeweiligen Sekundärantikörpergemisch des vorgefertigten Vectastain Kits. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS für drei Minuten erfolgte anschließend die 30-minütige Inkubation mit dem ABC-Reagenz, welches ebenfalls vom jeweiligen Detektionskit bereitgestellt wird. Danach wurde erneut ein zweimaliger Waschvorgang in PBST für 3 Minuten durchgeführt. Anschließend erfolgte die Applikation der vorgefertigten chromogenen Lösung DAB Labvision für 30 Sekunden. Nach Spülung der Schnitte mit Aqua dest. und deren Trocknung folgte schließlich die Eindeckung mit Cytoseal.

Die Markierung von MAP2 in den Hirnschnitten erfolgte maschinell mithilfe eines Autostainers. Dabei ist der grundsätzliche Ablauf mit den wiederkehrenden Waschvorgängen

und zwischenliegenden Inkubationszeiten vergleichbar mit den Protokollen für Synaptobrevin und -physin.

In Abbildung 6 sind repräsentative Hippocampi mit den jeweiligen immunhistochemisch markierten Proteinen abgebildet.

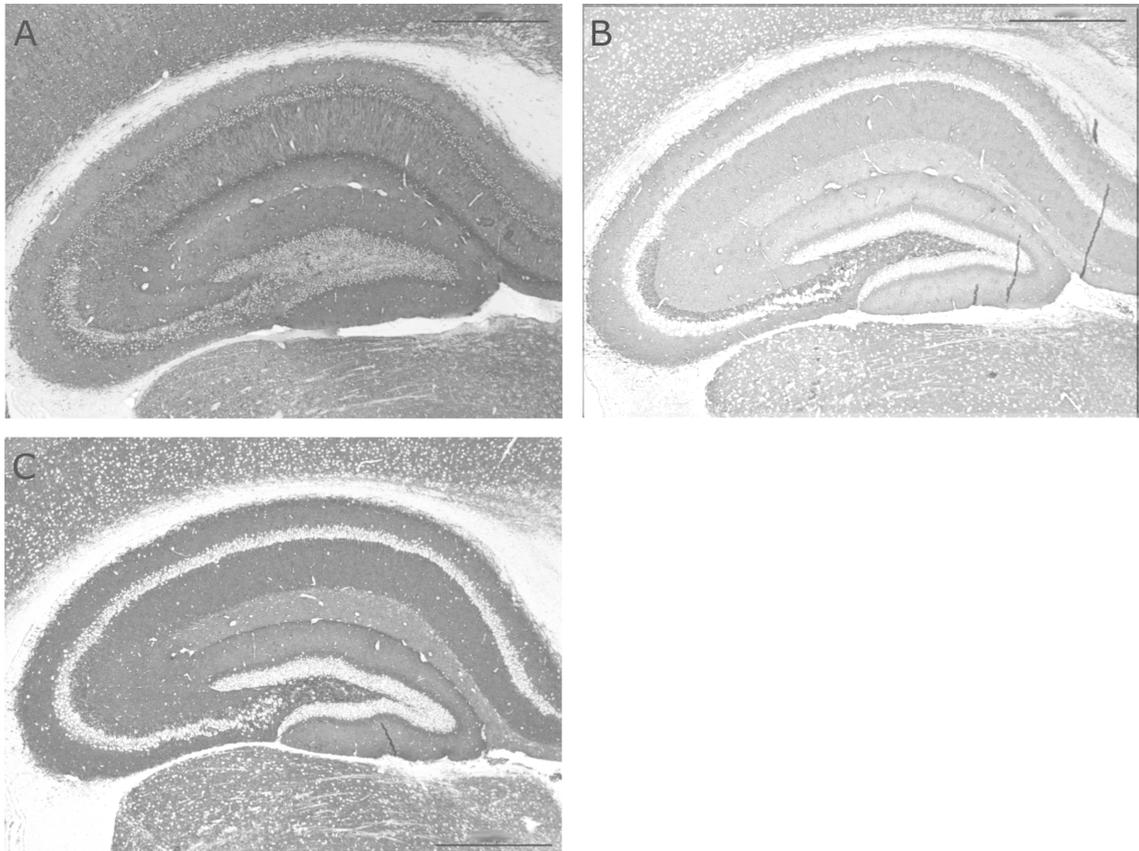


Abbildung 6: Repräsentative Darstellung immunhistochemisch markierter Hippocampi für MAP2 (A; WT), Synaptobrevin (B; WT) und Synaptophysin (C; KO) bei Wildtyp- und Knockout-Tieren (Maßstab 500 µm; WT: Wildtyp, KO: Knockout).

3.6.3 Semiquantitative Auswertung

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden bei äquivalenten Lichtverhältnissen mit einer CoolSNAP-Kamera aufgenommen und digitalisiert, sodass mit dem bereits in Kapitel 3.5.3 erwähnten computergestützten Analyseprogramm MCID eine Auswertung erfolgen konnte. Dabei wurde abermals in Anlehnung an den Atlas von Paxinos und Franklin [87] der Bereich des dorsalen Hippocampus mit den Zielregionen CA1, CA3 und Gyrus dentatus (DG) mit ihrer jeweiligen Schichtabfolge manuell eingezeichnet. Mithilfe des Computerprogrammes können die Grauwerte der Zielregionen automatisch bestimmt werden. Um unspezifische Bindungen im Gewebe herauszurechnen, wurde der Grauwert des Corpus callosum vom totalen Wert subtrahiert, wodurch man letztendlich die spezi-

fische optische Dichte (OD) der Immunreaktivität der markierten Proteine erhält. Diese Analyseergebnisse sind jedoch aufgrund einer fehlenden standardisierten Kalibrierung und definierten Bezugsgröße nur als semiquantitativ zu bezeichnen. Anschließend erfolgten in Analogie zur *In-vitro* Rezeptorautoradiographie (Kapitel 3.5.3) die Umrechnung und Darstellung der optischen Dichten der Knockout Gruppe als prozentuale Abweichung relativ zur Kontrollgruppe.

3.7 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mithilfe des Microsoft Excel zugehörigen Statistikmoduls Analyse-it (Analyse-it Software, Version 2.22, Ltd, Leeds, USA). Durch Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests wurden die Messwerte innerhalb der beiden experimentellen Gruppen Wildtyp- und NECAB2-Knockout Tiere auf Normalität untersucht. Bei resultierender Normalverteilung folgte zum Nachweis von Gruppenunterschieden der unabhängige *t*-Test, während bei nicht normalverteilten Werten der Mann-Whitney-Test angewendet wurde. Errechnet wurde außerdem jeweils die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM). Für alle Untersuchungen wurde ein Signifikanzniveau (α) von 5 % verwendet, sodass Unterschiede mit einem *p*-Wert ≤ 0.05 als statistisch signifikant angenommen werden.

4 Ergebnisse

Aufgrund der Fülle an Daten werden zur besseren Übersichtlichkeit im folgenden Text bei einigen Messungen nur die statistisch signifikanten Ergebnisse in numerischem Wert Erwähnung finden. Eine tabellarische Auflistung aller Resultate inklusive der errechneten statistischen Kennzahlen Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und p -Wert ist in der jeweils deklarierten Tabelle im Anhang unter **B** zu finden.

4.1 Morphologie Golgi-Cox-imprägnierter Neuronen

In der vorliegenden Arbeit wurden die nach Golgi-Cox imprägnierten Neuronen von 11 Tieren ausgewertet, aufgeteilt in Wildtyp (WT), ($n=6$) und NECAB2-Knockout Tiere (KO), ($n=5$). In die morphologische Analyse einbezogen wurden insgesamt 151 Medium Spiny Neurons, wovon eine Anzahl von 86 der Kontrollgruppe und 65 den NECAB2-defizienten Tieren zuzurechnen ist. Weiterhin wurde eine Gesamtzahl von 75 hippocampalen CA1-Neuronen untersucht, davon sind 47 Neuronen der Wildtyp- und 28 Neuronen der Knockout-Gruppe zugehörig.

In den nachfolgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der Golgi-Cox-Analyse dargestellt, welche die Verzweigungsstruktur und Komplexität mit den jeweiligen untergeordneten Parametern der Neuronen sowie die Dichte deren dendritischer Spines umfasste (siehe auch Anhang B, Tabellen 1–32).

4.1.1 Verzweigungsstruktur

Bei der Untersuchung der Verzweigungsstruktur der Nervenzellen wurden verschiedene dendritische Parameter bestimmt und anschließend die Gruppenunterschiede herausgearbeitet. Analysiert wurden für jedes Neuron die Anzahl an Dendriten, Verzweigungspunkten und Endungen sowie Dendritenlänge in μm . Sowohl Dendritenanzahl als auch -länge wurden überdies hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu einer bestimmten Astordnung geprüft.

4.1.1.1 Medium Spiny Neurons

Die Analyse sowohl der Anzahl an Endungen als auch an Verzweigungspunkten und der mittleren Dendritenlänge pro Gruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den

Gruppen (siehe dazu Abbildung 8 A, B, C; sowie Anhang B, Tabelle 1–3). Auch die Auswertung der mittleren Dendritenlänge in Abhängigkeit von der Astordnung zeigte keinen Unterschied zwischen den Wildtyp- und Knockout Tieren (Abb. 8 D; Anhang B, Tabelle 5). Dagegen stellte sich bei Betrachtung der Dendritenquantität eine signifikant reduzierte Anzahl (WT $6,0 \pm 0,17$ vs. KO $5,4 \pm 0,19$, $p=0,0169$) bei den NECAB2-defizienten Tieren gegenüber dem Wildtyp dar (Abb. 7 und 8 E; Anhang B, Tabelle 4). Die Betrachtung der Astanzahl pro Ordnung ergab jeweils eine signifikant geringere Anzahl an Dendriten erster (WT $6,0 \pm 0,17$ vs. KO $5,5 \pm 0,20$, $p=0,038$) und zweiter Ordnung (WT $9,0 \pm 0,26$ vs. KO $7,8 \pm 0,30$, $p=0,0126$) bei den NECAB2-Knockout Tieren, während bei den übrigen Ordnungen höheren Grades keine Unterschiede mehr nachweisbar waren (Abb. 8 F, Anhang B, Tabelle 6).

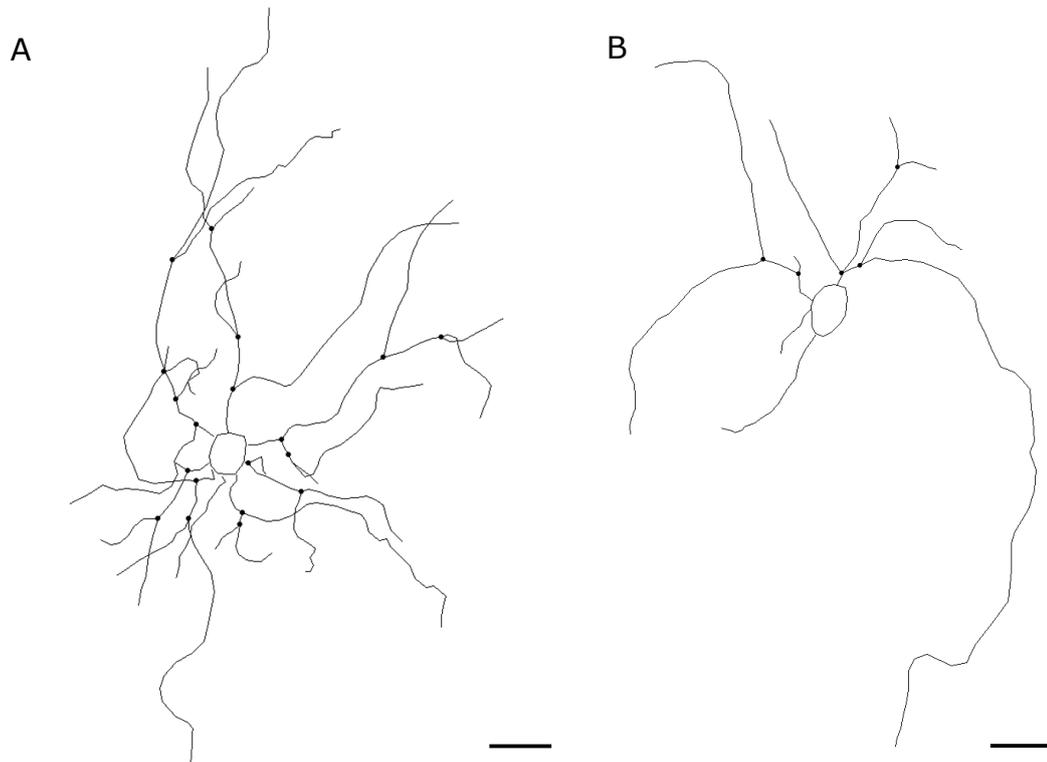


Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung einer Maximalausprägung des signifikanten Unterschiedes in der Dendritenanzahl zwischen Golgi-Cox imprägnierten Medium Spiny Neurons von (A) Wildtyp- (B) und NECAB2-Knockout Tieren; (Maßstab 20 µm).

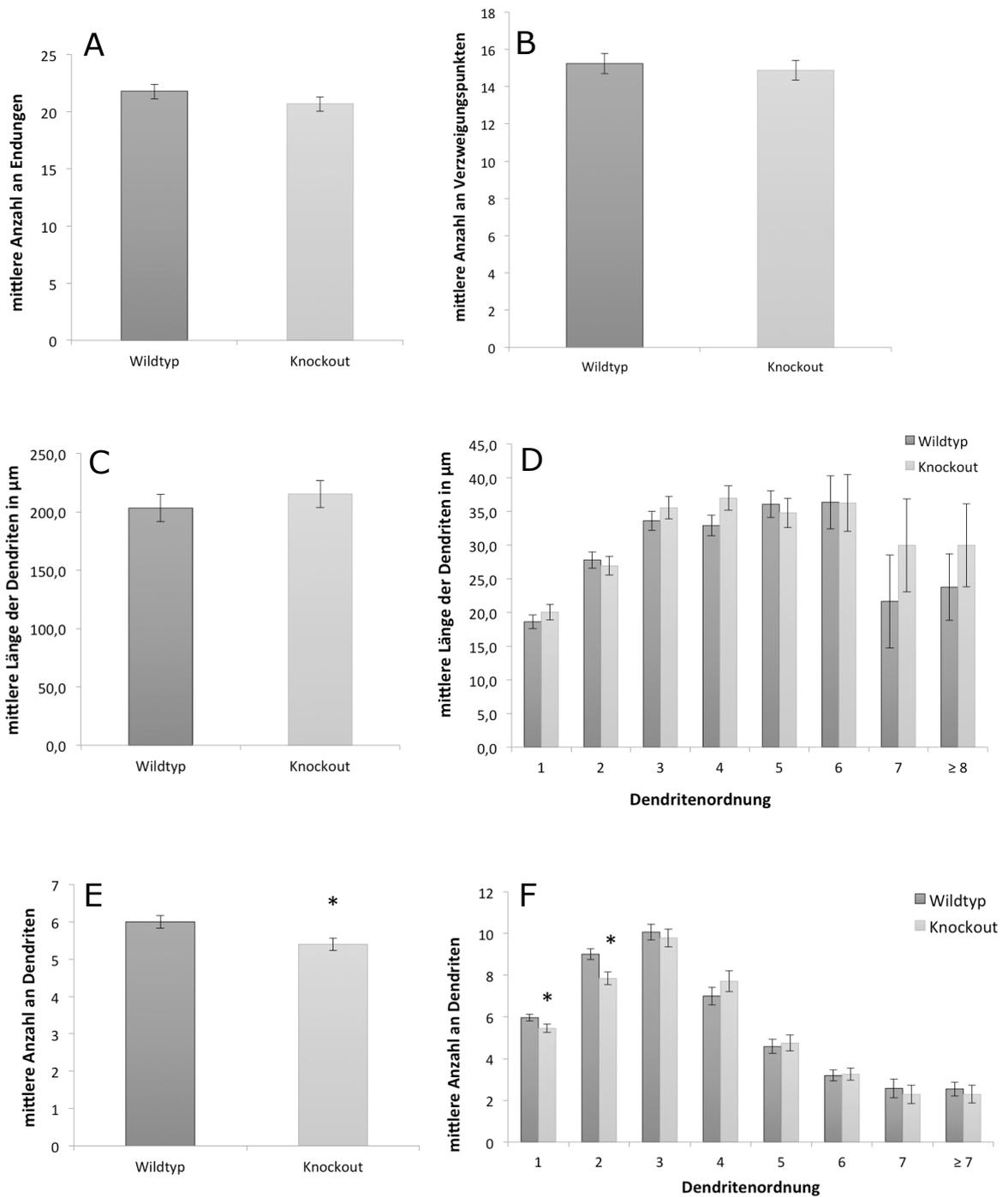


Abbildung 8: Analyse der Verzweigungsstruktur Golgi-Cox-imprägnierter Medium Spiny Neurons. (A), (B), (C) Bei der Anzahl der Endungen (A), Verzweigungspunkte (B) und der gemittelten Dendritenlänge (C) besteht kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout Tieren. (D) Auch bei Betrachtung der Dendritenlänge auf den Grad der Astordnung bezogen ergibt sich zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied. (E) Die Analyse der mittleren Anzahl an Dendriten pro Neuron zeigt eine signifikant geringere Anzahl an Dendriten ($p=0,0169$) bei den NECAB2-defizienten Tieren. (F) Die weitere Differenzierung der Dendritenanzahl bezogen auf ihre zugehörige Ordnung ergibt eine signifikante Reduktion der Anzahl der Dendriten 1. ($p=0,038$) sowie 2. Ordnung ($p=0,0126$). (* $p<0,05$; Darstellung der Werte \pm SEM).

4.1.1.2 CA1-Neuronen

Apikale Dendriten In der Anzahl der Endungen und Verzweigungspunkte sowie der mittleren Dendritenlänge pro Gruppe bestand zwischen Knockout und Wildtyp Tieren kein signifikanter Unterschied (Abb. 9 A, B, C; Anhang B, Tabelle 7–9). Die mittlere Dendritenlänge pro Ordnung zeigte einzig bei den Dendriten 10. Ordnung eine signifikante Reduktion ihrer Länge im NECAB2 Knockout (WT $34,58 \mu\text{m} \pm 2,32 \mu\text{m}$ vs. KO $27,18 \mu\text{m} \pm 3,33 \mu\text{m}$, $p=0,0151$), (Abb. 9 D; Anhang B, Tabelle 10). Die mittlere Dendritenanzahl pro Ordnung zeigte bei den NECAB2-Knockout Tieren eine niedrigere Anzahl an Dendriten mit der Ordnung 19 oder höher mit zum Signifikanzniveau von 5 % statistischem Unterschied (WT $2,8 \pm 0,22$ vs. KO $2,0 \pm 0,00$, $p=0,0171$), ersichtlich in Abbildung 9 E, (Anhang B, Tabelle 11).

Basale Dendriten Der Vergleich zwischen Knockout und Wildtyp Tieren hinsichtlich der Anzahl der Endungen und Verzweigungspunkte ihrer basalen Dendriten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, siehe dazu Abbildung 10 A, B, (Anhang B, Tabelle 12, 13). Die Betrachtung der mittleren Dendritenlänge pro Gruppe zeigte signifikant kürzere Dendriten im NECAB2 Knockout (WT $251,15 \mu\text{m} \pm 17,51 \mu\text{m}$ vs. KO $168,94 \mu\text{m} \pm 22,68 \mu\text{m}$, $p=0,0062$) (Abb. 10 C; Anhang B, Tabelle 14). Diese Verkürzung scheint jedoch einigermaßen ausgeglichen auf alle Astordnungen verteilt zu sein, da sich bei Zuordnung der Dendritenlänge zu ihrer Ordnung wiederum keine signifikanten Unterschiede feststellen ließen (Abb. 10 D; Anhang B, Tabelle 16). Umgekehrt zur Dendritenlänge verhielt es sich bei der Analyse der Dendritenquantität, wo sich bei dem NECAB2-Knockout im Vergleich zu den Wildtyp Tieren eine signifikant höhere Astanzahl (WT $4,2 \pm 0,28$ vs. KO $5,2 \pm 0,36$, $p=0,0174$) nachweisen ließ (Abb. 10 E; Anhang B, Tabelle 15). Die genauere quantitative Aufteilung der Dendritenzahl hinsichtlich ihrer Ordnung zeigte eine statistisch signifikante Erhöhung der Anzahl an Dendriten erster und zweiter Ordnung bei den Knockout Tiere (1. Ordnung: WT $4,2 \pm 0,29$ vs. KO $5,2 \pm 0,35$, $p=0,0174$; 2. Ordnung: WT $6,6 \pm 0,43$ vs. KO $7,8 \pm 0,60$, $p=0,0359$) (Abb. 10 F; Anhang B, Tabelle 17). Eine repräsentative Gegenüberstellung von CA1-Neuronen der Wildtyp- und Knockout Gruppe ist in Abbildung 11 gegeben.

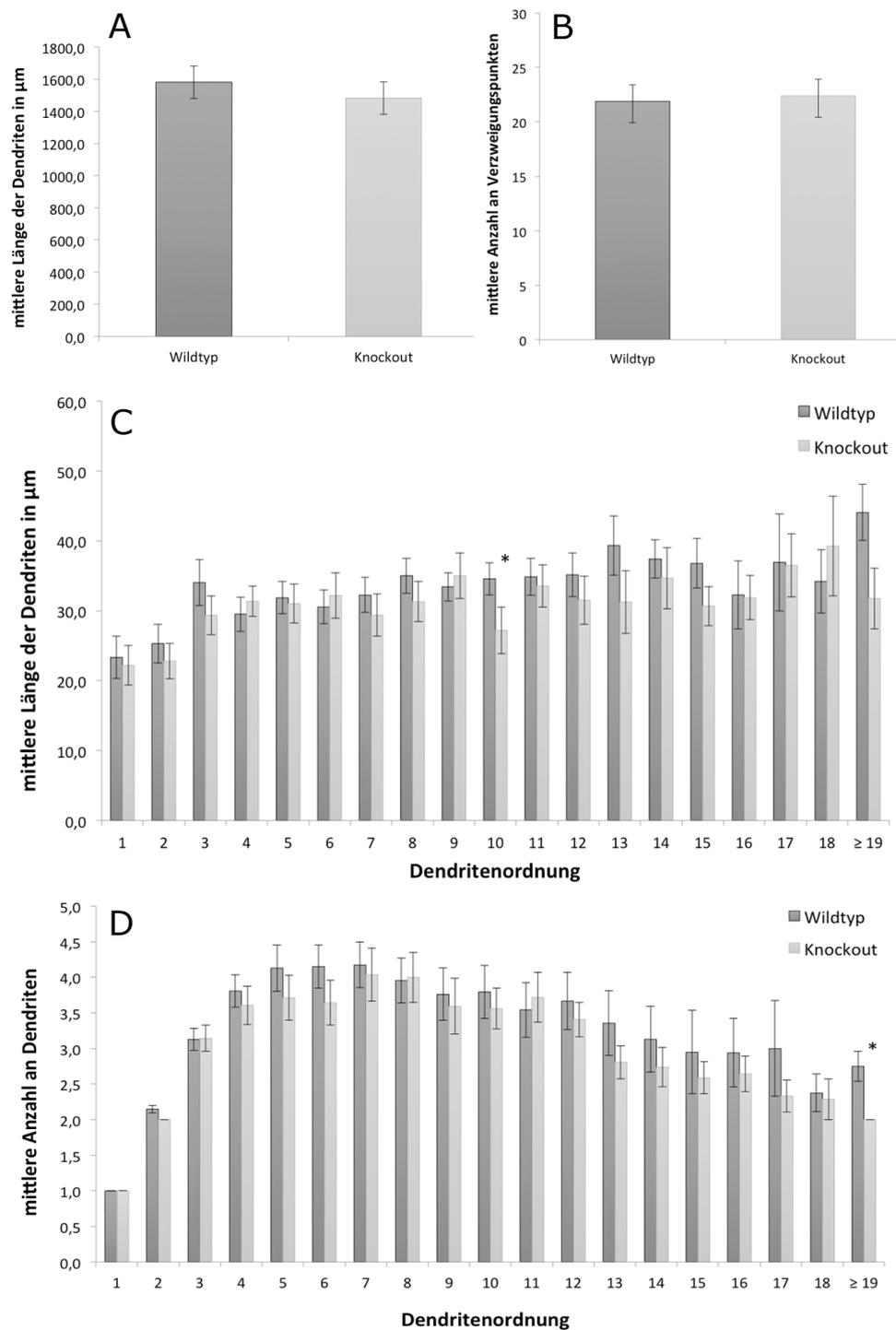


Abbildung 9: Analyse der Verzweigungsstruktur des apikalen Astbereiches Golgi-Cox-impregnierter CA1-Neuronen. (**A**), (**B**) Bei der Anzahl der gemittelten Dendritenlänge pro Neuron (**A**) sowie der Verzweigungspunkte (**B**) besteht zwischen Wildtyp und Knockout Tieren kein signifikanter Unterschied. (**C**) Die Betrachtung der mittleren Dendritenlänge ihrer jeweiligen Ordnung zugehörig zeigt einzig bei den Ästen 10. Ordnung eine signifikante Reduktion der Dendritenlänge ($p=0,0151$) bei den NECAB2-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp. (**D**) In der Betrachtung der Anzahl der Dendriten nach ihrer Ordnung aufgeteilt zeigt sich bei den NECAB2-Knockout Tieren eine statistisch signifikant niedrigere Anzahl an Dendriten der Ordnung 19 oder höher ($p=0,0171$). (* $p<0,05$; Darstellung der Werte \pm SEM).

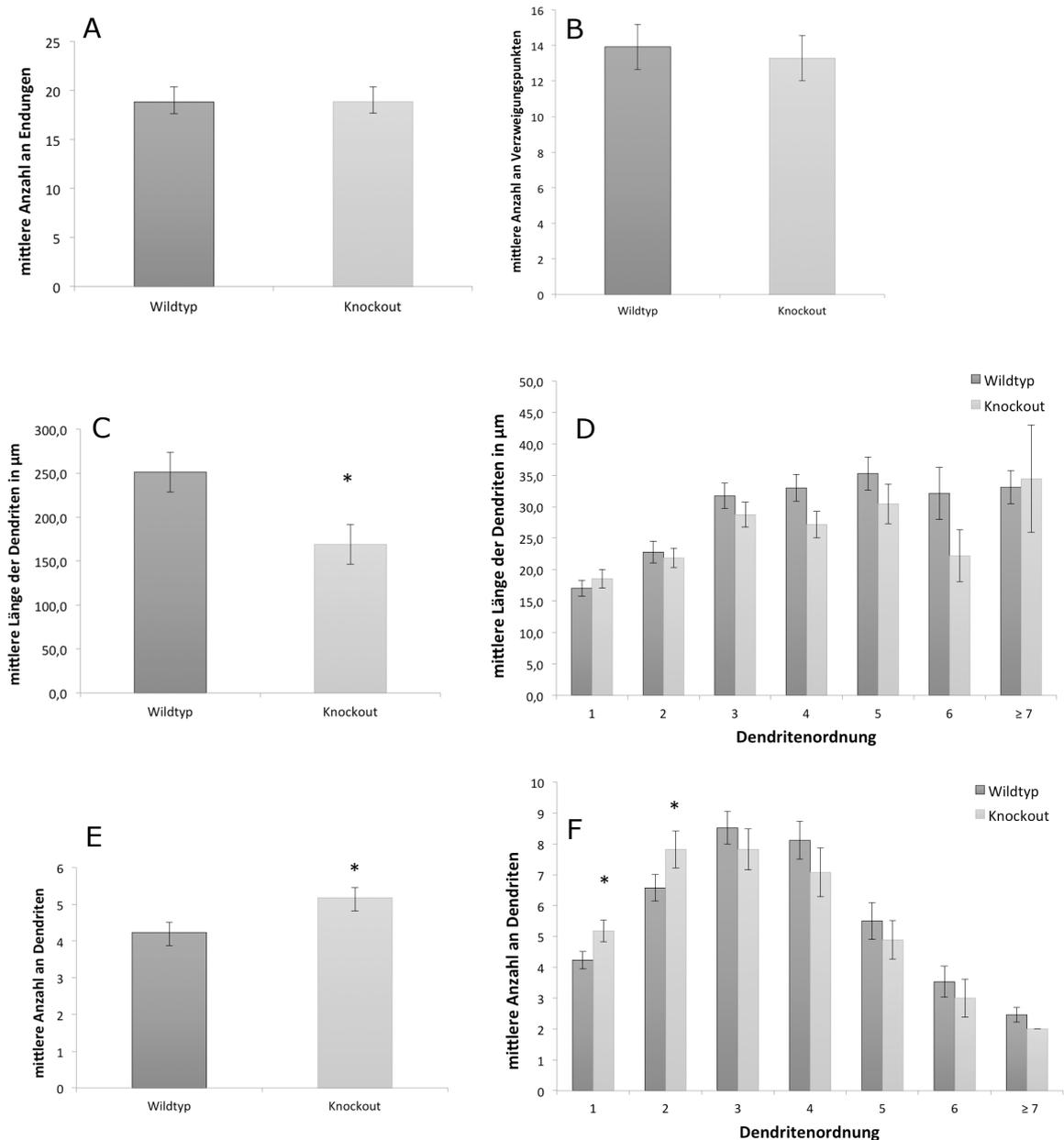


Abbildung 10: Analyse der Verzweigungsstruktur der basalen Dendriten Golgi-Cox-impregnierter CA1 Neuronen. (**A**), (**B**) Bei der Anzahl der Endungen (**A**) und der Anzahl der Verzweigungspunkte (**B**) besteht kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout Tieren. (**C**) Die Betrachtung der mittleren Dendritenlänge pro Neuron zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen mit einer Verkürzung der Dendriten ($p=0,0062$) bei den NECAB2-Knockout Tieren im Vergleich zu den Wildtyp Tieren. (**D**) Die Aufspaltung der Dendritenlänge zur jeweiligen Ordnung zeigt keinen signifikanten Unterschied. (**E**) Ein weiterer signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht bei der Analyse der gemittelten Anzahl der Dendriten. Dabei liegt eine signifikant höhere Astanzahl ($p=0,0174$) bei den NECAB2-Knockout Tiere vor. (**F**) Bei Betrachtung der Zugehörigkeit der Dendritenzahl zu ihrer Ordnung ergibt sich bei den NECAB2-defizienten Tieren eine statistisch signifikante erhöhte Gesamtzahl Dendriten 1. ($p=0,0174$) und 2. Ordnung ($p=0,0359$). (* $p<0,05$; Darstellung der Werte \pm SEM).

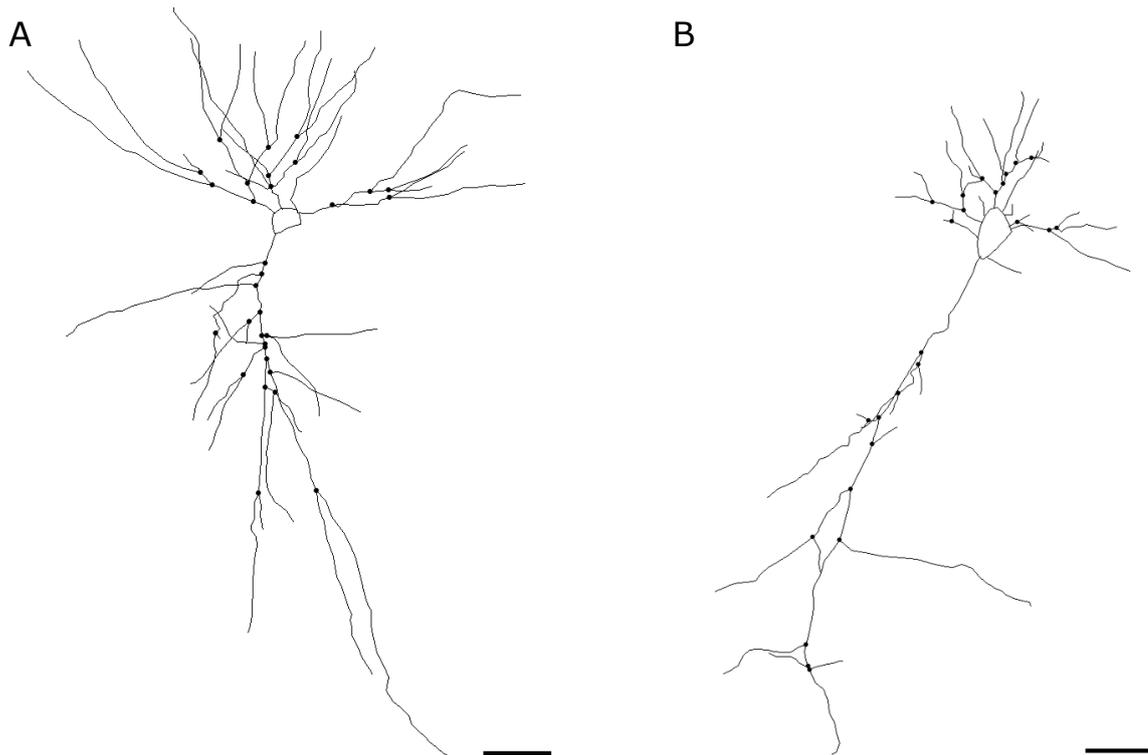


Abbildung 11: Repräsentative Gegenüberstellung Golgi-Cox-imprägnierter CA1-Neuronen. (A) Wildtyp, (B) NECAB2-Knockout; (Maßstab 50 μm).

4.1.2 Dichte dendritischer Spines

Zur Bestimmung der Dichte dendritischer Spines wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl bei den MSN als auch bei den CA1-Neuronen Dendriten 3. und 4. Ordnung gewählt, wobei der auszuzählende Dendritenabschnitt mindestens eine Länge von 10 μm aufwies. Die mittlere Länge der analysierten Abschnitte variierte geringfügig zwischen den experimentellen Gruppen (MSN: 3. Ordnung: WT $29,29 \pm 9,00 \mu\text{m}$ vs. KO $29,20 \pm 7,36 \mu\text{m}$; 4. Ordnung: WT $29,27 \pm 9,30 \mu\text{m}$ vs. KO $29,1 \pm 6,87 \mu\text{m}$; CA1*ap*: 3. Ordnung: WT $20,00 \pm 6,62 \mu\text{m}$ vs. KO $22,91 \pm 5,45 \mu\text{m}$; 4. Ordnung: WT $19,56 \pm 5,54 \mu\text{m}$ vs. KO $24,72 \pm 5,23 \mu\text{m}$; CA1*ba*: 3. Ordnung: WT $20,35 \pm 5,79 \mu\text{m}$ vs. KO $25,55 \pm 6,65 \mu\text{m}$; 4. Ordnung: WT $19,55 \pm 4,27 \mu\text{m}$ vs. KO $23,31 \pm 5,09 \mu\text{m}$). Nach Markierung und Auszählung der Spines erfolgte die Kalkulation der Dichte, angegeben in Anzahl der Spines pro μm . Eine exemplarische Darstellung von lichtmikroskopisch aufgenommenen Dendriten 3. Ordnung von Medium Spiny Neurons der Wildtyp(WT)- wie auch der NECAB2-defizienten (KO) Gruppe ist in Abbildung 12 optisch dargeboten.

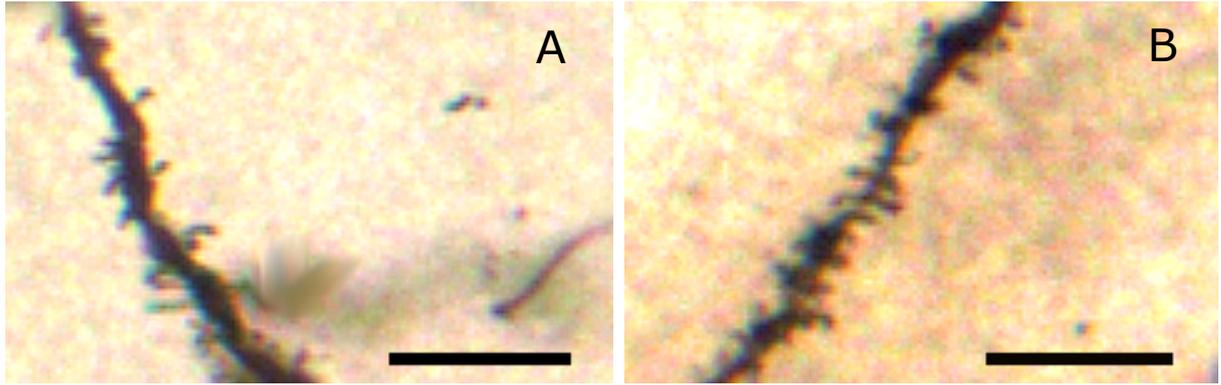


Abbildung 12: Repräsentative lichtmikroskopische Darstellung Golgi-Cox-imprägnierter Dendriten dritter Ordnung von Medium Spiny Neurons bei Wildtyp-(**A**) sowie bei NECAB2-Knockout Tieren (**B**). Es handelt sich um 100fache Vergrößerung zur besseren Sichtbarmachung der Spines (Maßstab 10 µm).

4.1.2.1 Medium Spiny Neurons

Insgesamt wurden 150 Dendriten 3. Ordnung (WT: $n=85$, KO: $n=65$) sowie 144 Dendriten 4. Ordnung (WT: $n=84$, KO: $n=60$) ausgezählt.

Es zeigte sich eine signifikant höhere Dichte der Spines bei NECAB2-defizienten Tieren, sowohl an Ästen 3. (WT $1,24 \pm 0,03$ vs. KO $1,47 \pm 0,04$, $p < 0,0001$) als auch 4. Ordnung (WT $1,22 \pm 0,03$ vs. KO $1,42 \pm 0,04$, $p < 0,0001$), (siehe Abbildung 13, Anhang B, Tabelle 18).

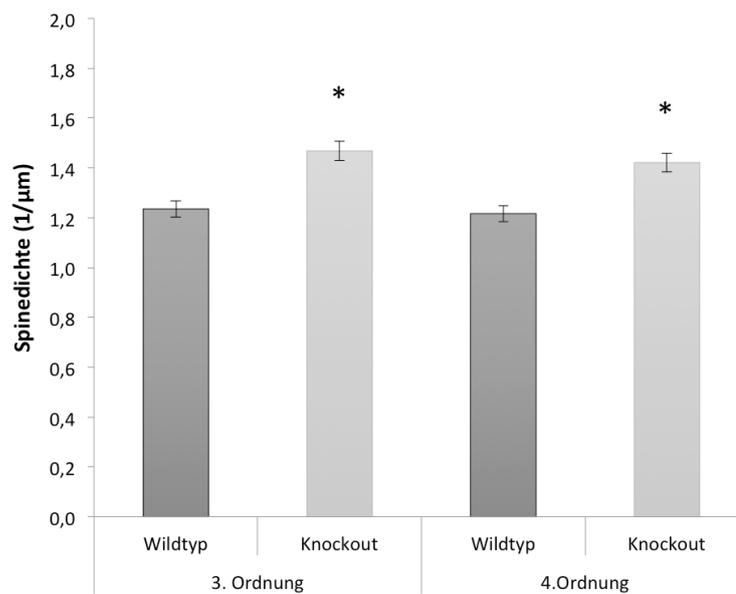


Abbildung 13: Die Analyse der Dichte an Spines bei den Medium Spiny Neurons zeigt eine signifikante Erhöhung beim NECAB2-Knockout im Vergleich zum Wildtyp sowohl an Dendriten 3. Ordnung ($p < 0,0001$) als auch an Dendriten 4. Ordnung ($p < 0,0001$). (* $p < 0,05$; Darstellung der Werte als mittlere Anzahl an Spines/µm ± SEM).

4.1.2.2 CA1-Neuronen

An den apikalen Astabschnitten der CA1-Neuronen wurden 70 Dendriten der 3. Ordnung (WT: $n=43$, KO: $n=27$) und 69 Dendriten der 4. Ordnung (WT: $n=41$, KO: $n=28$) auf ihre Anzahl an Spines hin untersucht. An den basalen Astabschnitten wurden 73 Dendriten 3. Ordnung (WT: $n=46$, KO: $n=27$) sowie 69 Dendriten 4. Ordnung (WT: $n=43$, KO: $n=26$) analysiert.

Die Ergebnisse der Spinedichte an den apikalen Dendriten der CA1-Neuronen zeigten keinen Unterschied zum Signifikanzniveau $\alpha=5\%$ zwischen NECAB2-Knockout und Wildtyp Tieren (Abbildung 14 A; Anhang B, Tabelle 19). Dahingegen fand sich an den basalen Dendriten eine signifikant höhere Dichte an Spines bei den NECAB2-defizienten Tieren an den beiden untersuchten Dendritenordnungen (3. Ordnung: WT $0,88 \pm 0,05$ vs. KO $1,00 \pm 0,06$, $p=0,0326$; 4. Ordnung: WT $0,95 \pm 0,05$ vs. KO $1,10 \pm 0,06$, $p=0,0242$), visualisiert in Abbildung 14 B, (Anhang B, Tabelle 20).

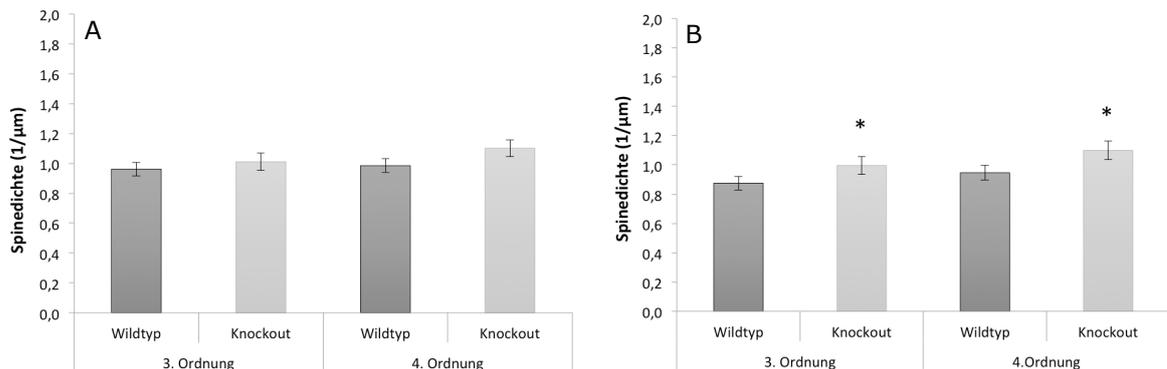


Abbildung 14: Darstellung der Spinedichte an CA1-Neuronen, für apikale (**A**) und basale (**B**) Äste getrennt betrachtet. (**A**) Die apikalen Bereiche der CA1-Neuronen zeigen in der Dichte der Spines keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen. (**B**) An den basalen Dendriten besteht bei den NECAB2-Knockout Tieren im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung der Spinedichte mit statistischer Signifikanz sowohl die Dendriten 3. Ordnung ($p=0,0326$) als auch die Dendriten 4. Ordnung ($p=0,0242$) betreffend.

(* $p<0,05$; Darstellung der Werte als mittlere Anzahl Spines/ $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$).

4.1.3 Sholl-Analyse

Zur Untersuchung der Komplexität von Neuronen hat sich die Analyse nach Sholl als etabliertes Verfahren erwiesen. Eine Beschreibung dieser Methode ist bereits in Kapitel 3.4.4 zu finden. In dieser Arbeit wurde bei den MSN ein schrittweise ansteigender Radius von 10 μm und bei den CA1-Neuronen von 20 μm für die virtuellen Sphären gewählt. Ausgewertet wurden jeweils die Anzahl an Knotenpunkten, die Dendritenlänge innerhalb zweier benachbarter konzentrischer Kreise sowie die Anzahl der Schnittpunkte von Dendritenästen mit den konzentrischen Sphären.

4.1.3.1 Medium Spiny Neurons

In der Anzahl der Knotenpunkte und Endungen zeigte sich bei den MSN kein statistisch relevanter Unterschied zwischen den Gruppen (Anhang B, Tabelle 21, 22). Dahingegen bestand bei den NECAB2-Knockout Tieren eine signifikant niedrigere Dendritenlänge innerhalb der konzentrischen Kreise 10 und 20 μm ausgehend vom Zellsoma (WT 111,67 $\mu\text{m} \pm 3,47 \mu\text{m}$ *vs.* KO 98,04 $\mu\text{m} \pm 3,99 \mu\text{m}$, $p=0,0128$), siehe Abbildung 15 A, (Anhang B, Tabelle 23). Des Weiteren zeigte sich bei den NECAB2-Knockout Tieren eine statistisch signifikante Reduktion der Anzahl der Schnittpunkte mit den Shollsphären bei einem Radius von 10 μm (WT 5,07 $\pm 0,17$ *vs.* KO 4,31 $\pm 0,20$, $p=0,0065$) und von 20 μm (WT 10,36 $\pm 0,31$ *vs.* KO 9,45 $\pm 0,36$, $p=0,046$) ausgehend vom Zellsoma, ebenfalls dargestellt in Abbildung 15 B, (Anhang B, Tabelle 24).

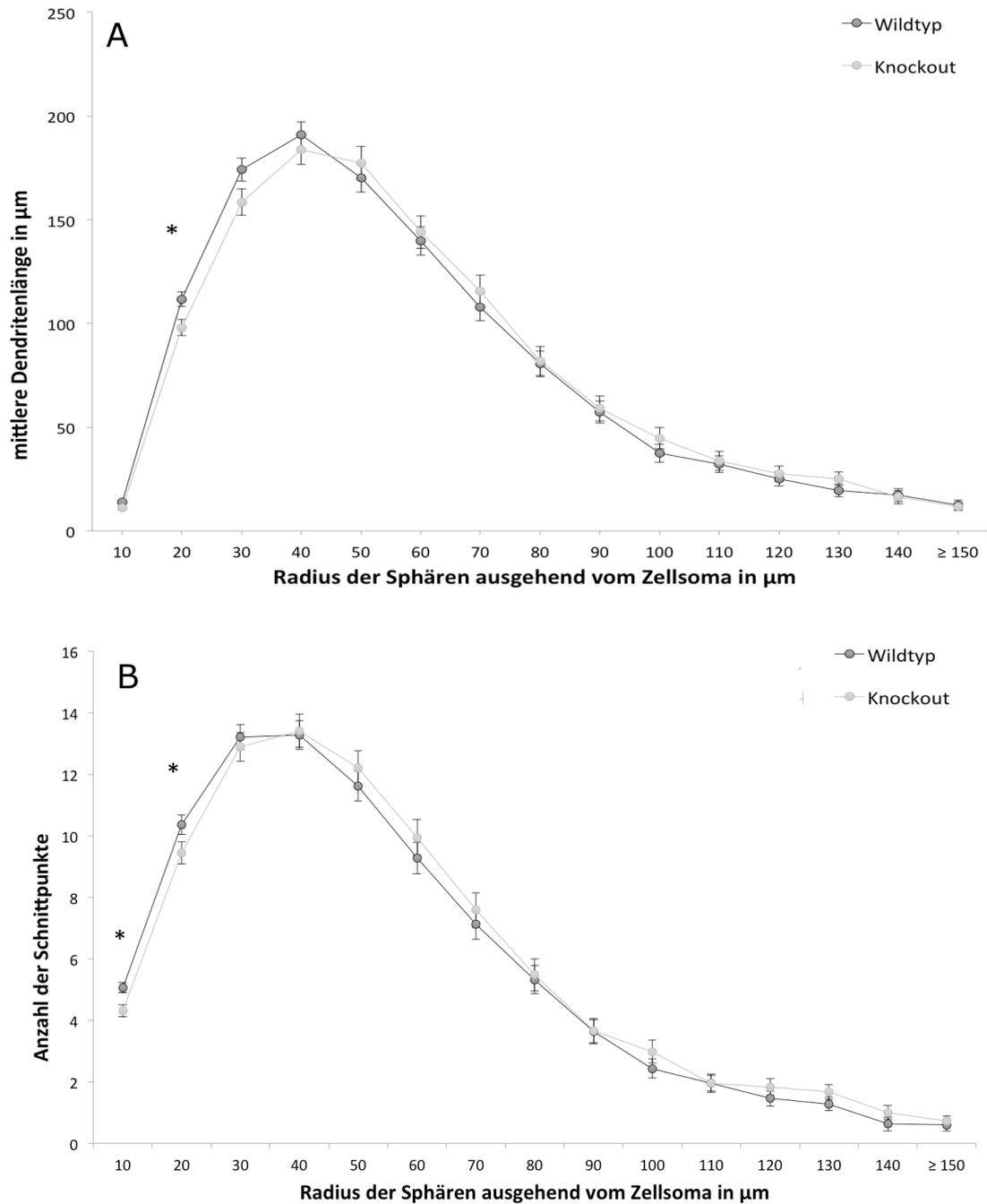


Abbildung 15: Vergleich der Dendritenlänge (**A**) sowie Anzahl der Schnittpunkte mit den Shollsphären (**B**) mittels Sholl-Analyse bei Medium Spiny Neurons. (**A**) Die Dendritenlänge der NECAB2-defizienten Tiere ist innerhalb des Radius von 20 μm ausgehend vom Zellsoma gegenüber dem Wildtyp signifikant reduziert ($p=0,0128$). (**B**) Weiterhin besteht eine statistisch signifikante Reduktion der Anzahl der Schnittpunkte mit den Shollsphären bei 10 μm ($p=0,0065$) und 20 μm ($p=0,046$) bei den NECAB2-Knockout im Vergleich zu den Wildtyp Tieren. (* $p<0,05$; Darstellung der Werte als mittlere Anzahl bzw. mittlere Dendritenlänge/ $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$).

4.1.3.2 CA1-Neuronen

Apikale Dendriten Die Analyse nach Sholl ergab bei den apikalen Dendriten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen in der Anzahl der Knotenpunkte, Endungen sowie der Anzahl von Schnittpunkten mit den Shollsphären (Anhang B, Tabelle 25, 26, 28). Nur innerhalb des konzentrischen Kreises mit dem Radius von 20 μm ausgehend vom Zellsoma war bei den NECAB2-Knockout Tieren eine signifikante Reduktion der Dendritenlänge (WT $17,68 \mu\text{m} \pm 1,34 \mu\text{m}$ vs. KO $13,54 \mu\text{m} \pm 1,24 \mu\text{m}$, $p=0,0131$) zu beobachten, siehe Abbildung 16, (Anhang B, Tabelle 27).

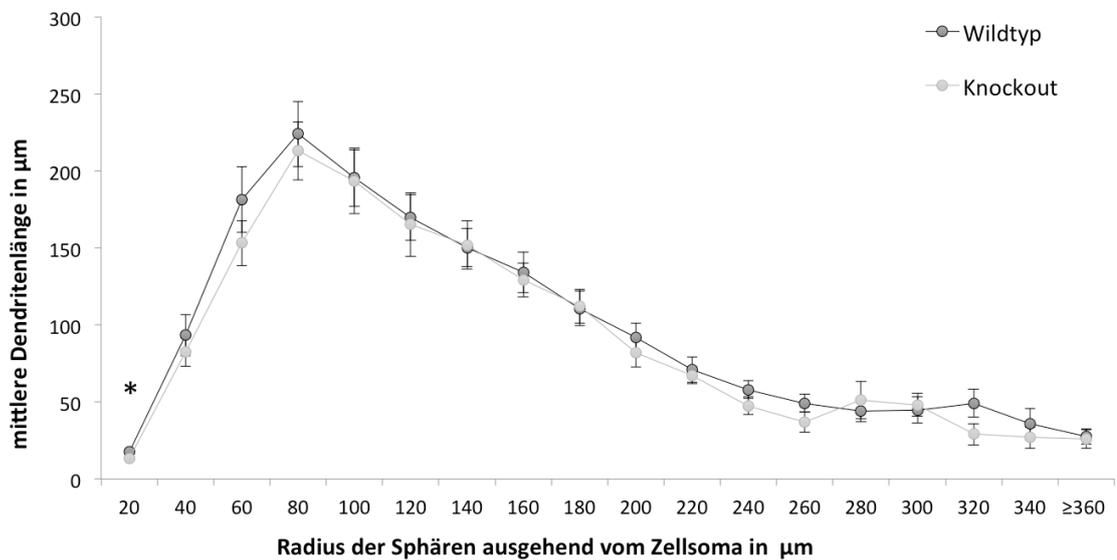


Abbildung 16: Vergleich der mittleren Dendritenlänge der apikalen Dendriten von CA1-Neuronen mittels Sholl-Analyse. Innerhalb des Radius von 20 μm ist bei den NECAB2-Knockout Tieren eine signifikante Verringerung der Dendritenlänge ($p=0,0131$) gegenüber der Wildtyp-Gruppe erkennbar.

(* $p < 0,05$; Darstellung der Werte als mittlere Dendritenlänge/ $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$).

Basale Dendriten Die Betrachtung der basalen Dendriten ergab in der Analyse nach Sholl keinen Unterschied in der Dendritenlänge und Anzahl der Endungen zwischen den Gruppen (Anhang B, Tabelle 29, 31). Allerdings zeigte sich bei den NECAB2-defizienten Tieren sowohl eine signifikante Reduktion der Knotenpunkte im Abstand von 120 μm ausgehend vom Zellsoma (WT $0,40 \pm 0,13$ vs. KO $0,00 \pm 0,20$, $p=0,0422$) (Abbildung 17 A; Anhang B, Tabelle 30) als auch eine Reduktion der Kreuzungspunkte mit den Shollsphären ab einem Radius von 140 μm ausgehend vom Zellsoma (WT $0,87 \pm 0,17$ vs. KO $0,13 \pm 0,13$, $p=0,0265$), veranschaulicht in Abbildung 17 B, (Anhang B, Tabelle 32).

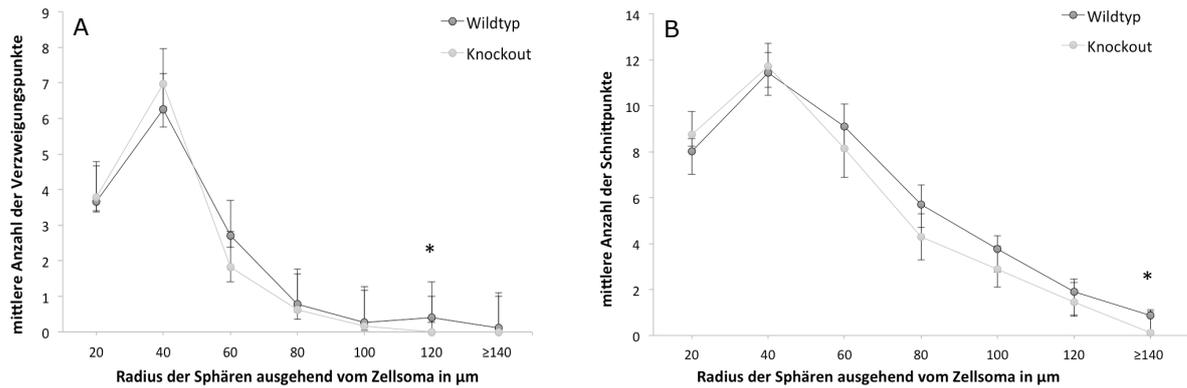


Abbildung 17: Vergleich der mittleren Anzahl der Verzweigungspunkte (**A**) sowie der Schnittpunkte mit den Shollsphären (**B**) der basalen Dendriten von CA1-Neuronen mittels Sholl-Analyse. (**A**) Es zeigt sich eine statistisch signifikante Reduktion der Anzahl der Verzweigungspunkte innerhalb der Shollsphäre mit dem Radius von 120 µm ($p=0,0422$) bei den NECAB2-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtyp Tieren. (**B**) Die Betrachtung der Anzahl an Schnittpunkten der basalen Dendriten mit den Shollsphären zeigt eine Reduktion zum Signifikanzniveau der NECAB2-Knockout Gruppe gegenüber dem Wildtyp ab einem Radius von 140 µm ausgehend vom Zellsoma ($p=0,0265$). (* $p<0,05$; Darstellung der Werte als mittlere Anzahl bzw. mittlere Dendritenlänge/µm ± SEM).

4.2 *In-vitro* Rezeptorautoradiographie

Um einen möglichen Einfluss des NECAB2-Knockouts auf die Funktion von Neurotransmitterrezeptoren durch potentielle Modulation von Bindungsdichten zu überprüfen, wurden mittels *In-vitro* Rezeptorautoradiographie spezifische Ligandenbindungsichten von NMDA-, AMPA- und GABA_A-Rezeptoren in verschiedenen Hirnregionen evaluiert. Für jeden der drei Rezeptoren wurden die Gehirne von jeweils 7 Wildtyp- und 7 NECAB2-defizienten Tieren ($n=7$) mit radioaktiv markierten spezifischen Liganden inkubiert (siehe Kapitel 3.5) und analysiert. Wie bereits in Kapitel 3.5.3 dargelegt, wurden die Ergebnisse zur besseren Darstellung so umgerechnet, dass die Ligandenbindungsichten der NECAB2-Knockout Tiere als relative Abweichung im Vergleich zur Gruppe der Wildtyp Tiere präsentiert werden können. Die tabellarische Auflistung der Ergebnisse findet sich im Anhang B in den Tabellen 33–47.

4.2.1 Caudoputamen (CPu)

Die Analyse der spezifischen Ligandenbindungsichten von [³H]MK-801, [³H]AMPA und [³H]Muscimol im Caudoputamen ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den NECAB2-Knockout und den Wildtyp Tieren. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle auf eine graphische Darstellung mittels eines Diagrammes verzichtet. Die Ergebnisse

finden sich in Anhang B, Tabelle 36.

4.2.2 Hippocampusformation (HC)

Die Ergebnisse der *In-vitro* Rezeptorautoradiographie im Bereich des Hippocampus für die spezifischen Ligandenbindungsichten der Rezeptoren NMDA, AMPA und GABA_A sind in Abbildung 18 graphisch dargestellt.

[³H]MK-801-Ligandenbindung Die Ligandenbindungsichte von [³H]MK-801 am NMDA-Rezeptor war im NECAB2-Knockout im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht, zum einen im Stratum radiatum der CA1-Region (KO: +12,23 % ± 2,70 %, p=0,0351) und zum anderen im Stratum moleculare des Gyrus dentatus (KO: +6,53 % ± 3,13 %, p=0,0482). Im Stratum oriens und Stratum pyramidale der CA1-Region, in allen untersuchten Schichten der CA3-Region sowie im Stratum granulosum des DG zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Anhang B, Tabelle 33).

[³H]AMPA-Ligandenbindung Der Vergleich der experimentellen Gruppen bezüglich der Ligandenbindungsichte am AMPA-Rezeptor zeigte in allen analysierten Subregionen und Schichten des Hippocampus keine signifikanten Unterschiede (Anhang B, Tabelle 34).

[³H]Muscimol-Ligandenbindung Nach der Analyse der [³H]Muscimol-Ligandenbindung am GABA_A-Rezeptor konnte eine statistisch signifikante Erhöhung dieser spezifischen Bindung bei den NECAB2-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp in allen Bereichen des CA1-Segments nachgewiesen werden (CA1 Or: KO: +15,54 % ± 5,35 %, p=0,035; CA1 Rad: KO: +12,33 % ± 2,48 %, p=0,0442; CA1 Pyr: KO: +15,32 % ± 3,39 %, p=0,0061). In den untersuchten Schichten der Subregionen CA3 und DG zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der [³H]Muscimol-Ligandenbindung zwischen den Gruppen (Anhang B, Tabelle 35).

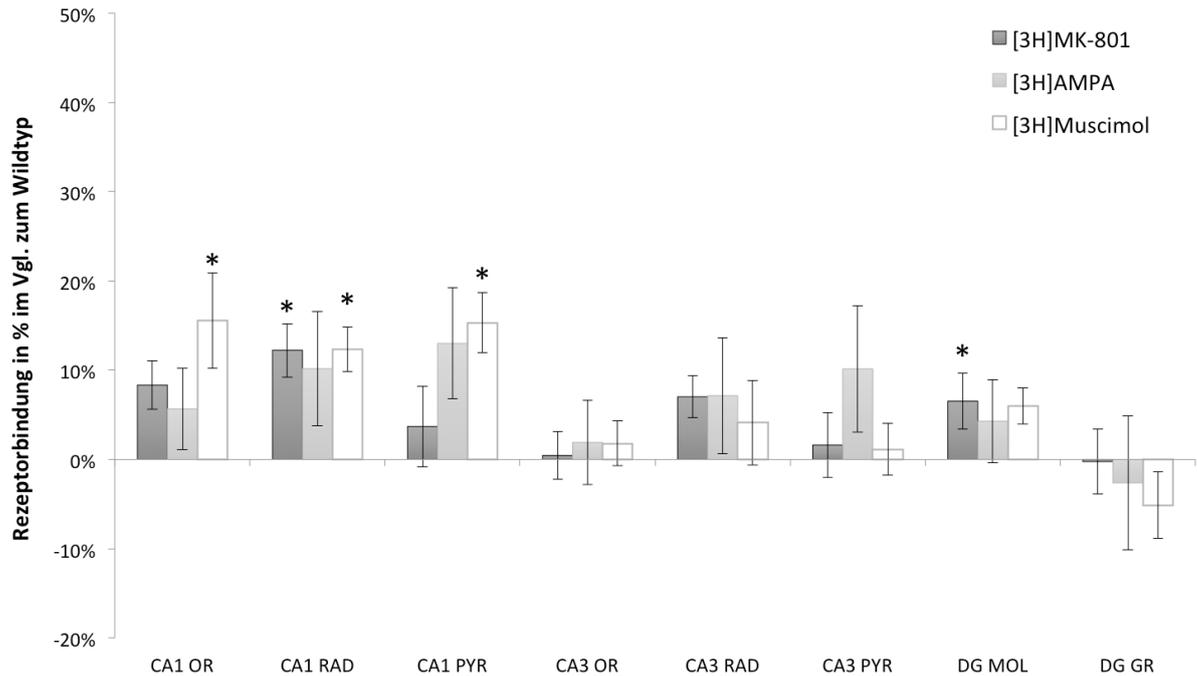


Abbildung 18: Effekt des NECAB2-Knockouts auf die Ligandenbindungsichte von [³H]MK-801, [³H]AMPA und [³H]Muscimol jeweils an NMDA-, AMPA- und GABA_A-Rezeptoren im Hippocampus. Es zeigte sich bei den Knockout Tieren im Vergleich zum Wildtyp eine statistisch signifikante Erhöhung der Rezeptorbindungsichte am NMDA-Rezeptor im Stratum radiatum des CA1-Sektors ($p=0,0351$) und im Stratum moleculare des Gyrus dentatus ($p=0,0482$). Weiterhin offenbarte die Analyse bei den NECAB2-defizienten Tieren in allen Schichten des CA1-Sektors eine statistisch signifikante Erhöhung der Bindungsichte am GABA_A-Rezeptor im Vergleich zu den Wildtyp Tieren (OR: $p=0,035$, RAD: $p=0,044$, PYR: $p=0,006$).

(* $p<0,05$; Darstellung der Werte in Prozent relativ zur Kontrollgruppe \pm SEM; OR: Stratum oriens; RAD: Stratum radiatum; PYR: Stratum pyramidale; DG: Gyrus dentatus; MOL: Stratum moleculare; GR: Stratum granulosum).

4.2.3 Primärer somatomotorischer Kortex (M1)

Eine graphische Darbietung der Ergebnisse der verschiedenen Ligandenbindungsichten im primären somatomotorischen Kortex bietet die Abbildung 19.

[³H]MK-801-Ligandenbindung In den kortikalen Schichten I sowie II/III konnte eine statistisch signifikant erhöhte Ligandenbindungsichte bei den Tieren der Knockout-Gruppe im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden (I: KO: $+28,26\% \pm 5,80\%$, $p=0,0007$; II/III: KO: $+12,54\% \pm 2,85\%$, $p=0,0197$), (Anhang B, Tabelle 37).

$[^3\text{H}]$ AMPA-Ligandenbindung Ein Unterschied in der Ligandenbindungsichte am AMPA-Rezeptor zum Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$ bei den NECAB2-Knockout Tieren im relativen Vergleich zur Ligandenbindungsichte der Wildtyp Tiere konnte einzig in Schicht VI nachgewiesen werden (KO: $+9,52\% \pm 4,79\%$, $p=0,0269$), (Anhang B, Tabelle 38).

$[^3\text{H}]$ Muscimol-Ligandenbindung Die Betrachtung der spezifischen Ligandenbindung am inhibitorischen GABA_A -Rezeptor zeigte einzig in Schicht IV mit einer Erhöhung der relativen Bindungsichte bei den NECAB2-Knockout einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen (KO: $+19,47\% \pm 4,99\%$, $p=0,0088$), (Anhang B, Tabelle 39).

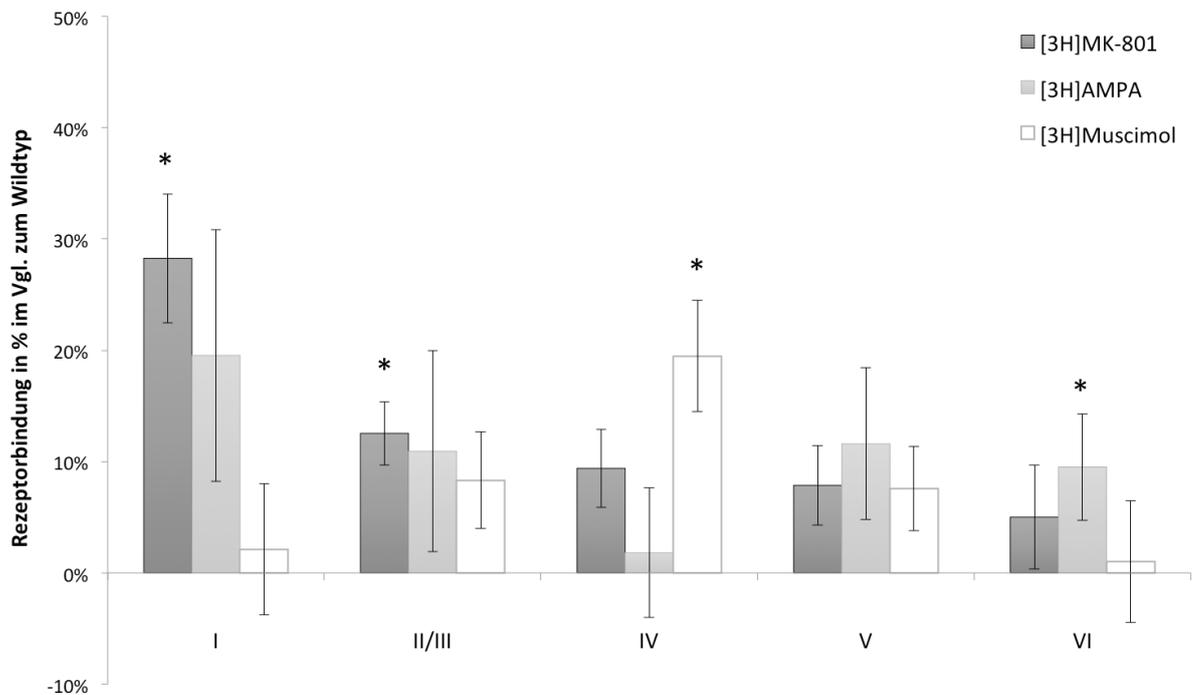


Abbildung 19: Effekt des NECAB2-Knockouts auf die Ligandenbindungsichten von [^3H]MK-801, [^3H]AMPA und [^3H]Muscimol jeweils an NMDA-, AMPA- und GABA_A -Rezeptoren im primär somatomotorischen Kortex (M1). Bei den NECAB2-Knockout Tieren zeigte sich eine Erhöhung der Ligandenbindungsichte mit statistischer Signifikanz am NMDA-Rezeptor in Schicht I ($p=0,0007$) und II/III ($p=0,0197$), am AMPA-Rezeptor in Schicht VI ($p=0,0269$) und am GABA_A -Rezeptor in Schicht IV ($p=0,0088$).

(* $p < 0,05$; Darstellung der Werte in Prozent relativ zur Kontrollgruppe \pm SEM).

4.2.4 Primärer somatosensorischer Kortex – *trunc region* (S1 Tr)

Der Vergleich der spezifischen Ligandenbindungsichten von [³H]MK-801, [³H]AMPA und [³H]Muscimol an NMDA-, AMPA- und GABA_A-Rezeptoren zwischen Knockout- und Wildtyp Gruppe ist in Abbildung 20 illustriert.

[³H]MK-801-Ligandenbindung Im Vergleich der Messwerte der Rezeptorbindungsichten der NECAB2-Knockout und Wildtyp Tiere wurde kein Unterschied zum Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ offenbar (Anhang B, Tabelle 40).

[³H]AMPA-Ligandenbindung Auch bezüglich der Bindungsichten am AMPA-Rezeptor zeigte sich innerhalb des Kortexareals S1 Tr zwischen NECAB2-Knockout und Wildtyp Gruppe kein statistisch signifikanter Unterschied (Anhang B, Tabelle 41).

[³H]Muscimol-Ligandenbindung Die Rezeptorbindungsichte der GABA_A-Rezeptoren zeigte in den Schichten II/III, IV und V eine statistisch signifikante Erhöhung der Ligandenbindungsichte bei den NECAB2-Knockout Tieren gegenüber der Gruppe des Wildtyps (II/III: KO +27,80 % \pm 5,01 %, $p=0,0281$; IV: KO +43,47 % \pm 9,48 %, $p=0,0053$; V: KO +19,04 % \pm 4,81 %, $p=0,0379$), (Anhang B, Tabelle 42).

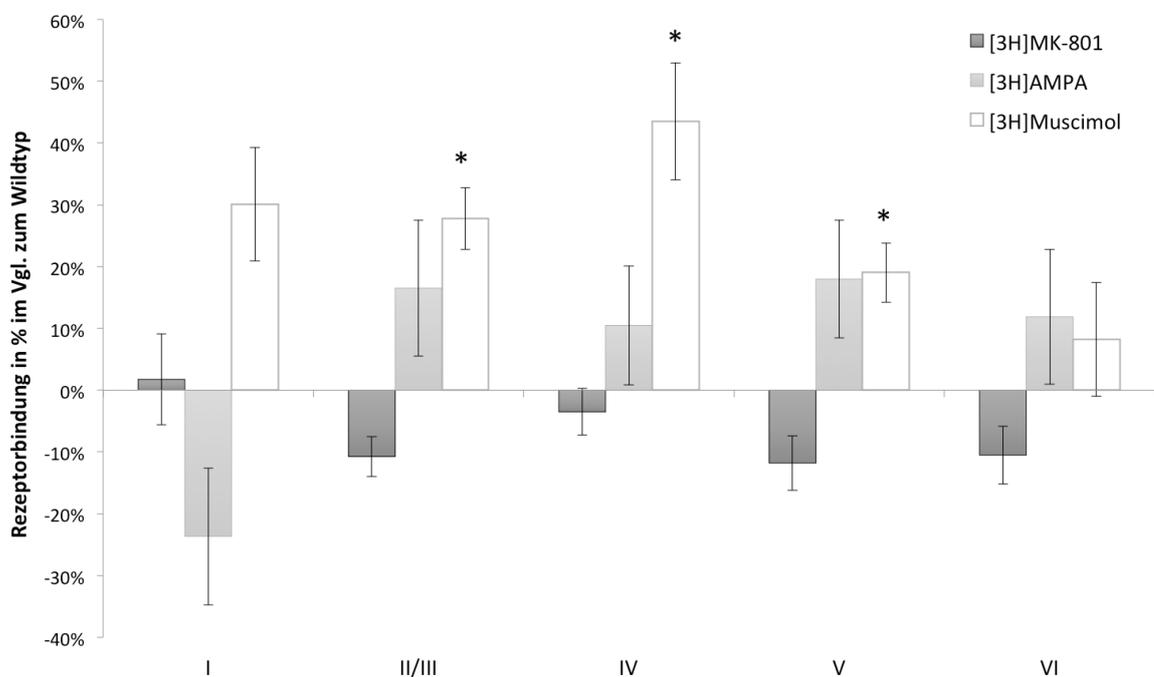


Abbildung 20: Effekt des NECAB2-Knockouts auf die Ligandenbindungsichte von [³H]MK-801, [³H]AMPA und [³H]Muscimol an NMDA-, AMPA- und GABA_A-Rezeptoren in der *trunc region* des primären somatosensorischen Kortex (S1). Einzig die Ligandenbindungsichte des GABA_A-Rezeptors zeigte bei den Tieren der Knockout Gruppe in den kortikalen Schichten II/III ($p=0,0281$), IV ($p=0,0053$) und V ($p=0,0379$) jeweils eine statistisch signifikant erhöhte Bindungsichte im Vergleich zu den Wildtyp Tieren.

(* $p < 0,05$; Darstellung der Werte in Prozent relativ zur Kontrollgruppe \pm SEM).

4.2.5 Primärer somatosensorischer Kortex – *barrel field* (S1Bf)

Die graphische Darbietung der Ergebnisse der *In-vitro* Rezeptorautordiographie im *barrel field* des primären somatosensorischen Kortex findet sich in Abbildung 21.

$[^3\text{H}]$ MK-801-Ligandenbindung In dieser Region resultierten keine zum Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$ relevanten Unterschiede im Vergleich der Rezeptorbindungsichten am NMDA-Rezeptor zwischen NECAB2-Knockout und Wildtyp Tieren (Anhang B, Tabelle 43).

$[^3\text{H}]$ AMPA-Ligandenbindung Der Vergleich der Ligandenbindungsichten ergab einzig in den Schichten II/III einen statistisch signifikanten Unterschied mit einer relativen Erhöhung von 17,69 % bei den Knockout Tieren (KO: +17,69 % \pm 6,89 %, $p=0,0293$), (Anhang B, Tabelle 44).

$[^3\text{H}]$ Muscimol-Ligandenbindung In allen kortikalen Schichten dieser Region konnte bezüglich der Ligandenbindungsichten am GABA_A -Rezeptor im Vergleich der Gruppen kein Unterschied zum Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$ nachgewiesen werden (Anhang B, Tabelle 45).

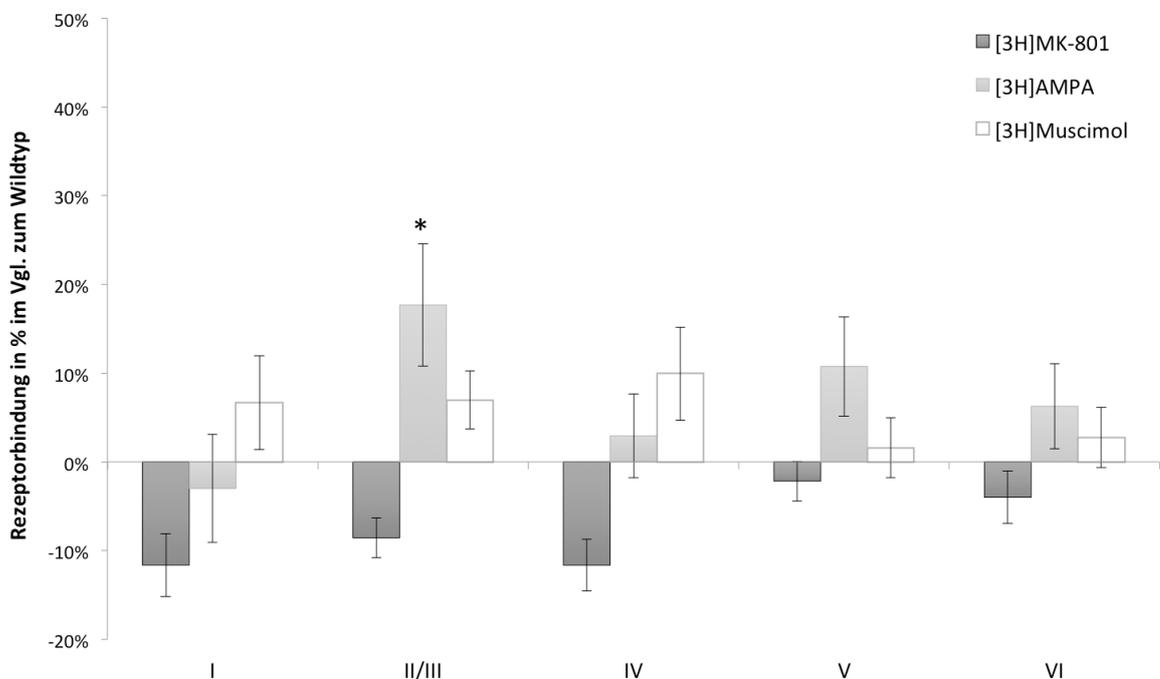


Abbildung 21: Effekt des NECAB2-Knockouts auf die Ligandenbindungsichten von $[^3\text{H}]$ MK-801, $[^3\text{H}]$ AMPA und $[^3\text{H}]$ Muscimol an NMDA-, AMPA- und GABA_A -Rezeptoren im *barrel field* des primären somatosensorischen Kortex (S1Bf). Bei dieser Analyse zeigte einzig die relative Erhöhung der Ligandenbindungsichte am AMPA-Rezeptor in Schicht II/III bei den NECAB2-defizienten Tieren ($p=0,0293$) einen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe.

(* $p<0,05$; Darstellung der Werte in Prozent relativ zur Kontrollgruppe \pm SEM).

4.2.6 Sekundärer somatosensorischer Kortex (S2)

Eine Veranschaulichung der Ergebnisse von Rezeptorbindungsdaten im sekundären somatosensorischen Kortex ist in Abbildung 22 dargestellt.

$[^3\text{H}]$ MK-801-Ligandenbindung Bezüglich der Ligandenbindungsichte am NMDA-Rezeptor zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen. In den Schichten II/III allerdings zeigte der Vergleich der Ligandenbindungsichten einen knapp an das Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$ reichenden Wert einhergehend mit einer Verminderung der Dichte von $4,81\%$ seitens der NECAB2-Knockout Tiere (KO: $-4,81\% \pm 3,01\%$, $p=0,053$), (Anhang B, Tabelle 46).

$[^3\text{H}]$ AMPA-Ligandenbindung Eine statistisch signifikante Erhöhung der Ligandenbindungsichte am AMPA-Rezeptor konnte bei den NECAB2-Knockout Tieren relativ zur Kontrollgruppe in Schicht VI, V und VI nachgewiesen werden (IV: KO: $+16,47\% \pm 6,06\%$, $p=0,0122$; V: KO: $+15,24\% \pm 5,85\%$, $p=0,0296$; VI: KO: $10,24\% \pm 4,73\%$, $p=0,0392$), (Anhang B, Tabelle 47).

$[^3\text{H}]$ Muscimol-Ligandenbindung Die Analyse der Rezeptorbindung von Muscimol am GABA_A -Rezeptor zeigte keinen Unterschied zum Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$ im Vergleich zwischen NECAB2-Knockout und Wildtyp Tieren (Anhang B, Tabelle 48).

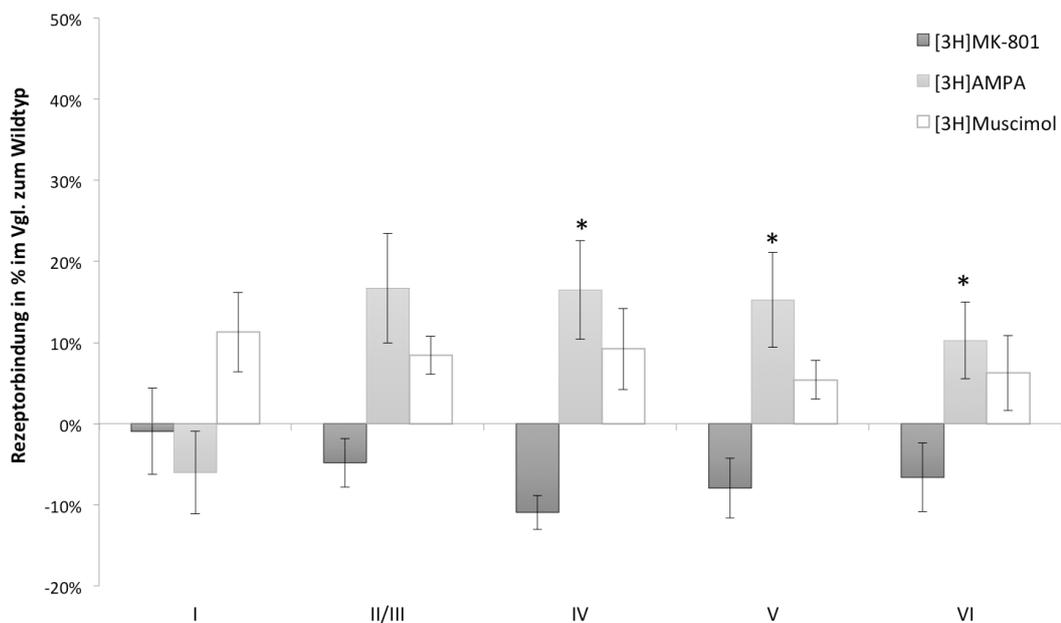


Abbildung 22: Effekt des NECAB2-Knockouts auf die Ligandenbindungsichten von [^3H]MK-801, [^3H]AMPA und [^3H]Muscimol an NMDA-, AMPA- und GABA_A -Rezeptoren im sekundären somatosensorischen Kortex (S2). Die Ligandenbindungsichte am AMPA-Rezeptor zeigte in den Schichten IV ($p=0,0122$), V ($p=0,0296$) und VI ($p=0,0392$) eine signifikante Erhöhung bei den Knockout- gegenüber den Wildtyp Tieren. (* $p<0,05$; Darstellung der Werte in Prozent relativ zur Kontrollgruppe \pm SEM).

4.3 Immunhistochemie

Immunhistochemische Auswertungen zum semiquantitativen Nachweis spezifischer Proteine wurden an jeweils 10 Tieren der Wildtyp- sowie 10 Tieren der Knockout-Gruppe (n=10) durchgeführt. Einzig bei der Auswertung der MAP2-markierten Schnitte standen aufgrund ausgeprägter Gewebedestruktion eines Präparates nur 9 NECAB2-defiziente Tiere zur Verfügung.

Zielstruktur der Auswertung war die Hippocampusformation beider Hemisphären mit den Subregionen CA1 und CA3 und den jeweiligen Schichten Stratum oriens, Stratum pyramidale und Stratum radiatum sowie der Gyrus dentatus mit Stratum moleculare und Stratum granulosum. Wie bei der *In-vitro* Rezeptorautoradiographie (siehe auch Kapitel 3.5.3) erfolgte eine Umrechnung der Ergebnisse, um letztendlich die prozentualen Abweichungen bei den Knockout Tiere relativ zur Kontrollgruppe darstellen zu können. Da die immunhistochemischen Färbungen ausschließlich auf dendritische Proteine ausgerichtet waren, sind im Folgenden auch lediglich die dendritischen Schichten ausgewertet worden, sodass auch in der gemeinsamen graphischen Veranschaulichung in Abbildung 23 auf die Darstellung des Stratum pyramidale der Subregionen des CA sowie des Stratum granulosum des Gyrus dentatus verzichtet wurde.

4.3.1 MAP2

Die semiquantitative Analyse von MAP2 ergab bei den Knockout Tieren einzig im Stratum radiatum der CA1-Region einen statistisch signifikanten Unterschied mit einer Erhöhung der Immunreaktivität von 22,89 % (KO: +22,89 % \pm 4,75 %, p=0,025) gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 23; Anhang B, Tabelle 49).

4.3.2 Synaptobrevin

Bei den Messungen der optischen Dichte von Synaptobrevin wurde eine statistisch signifikante Erhöhung der Immunreaktivität in den Knockout Tieren im Stratum radiatum der CA1-Region (KO: +21,56 % \pm 7,55 %, p=0,0451) und Stratum moleculare des Gyrus dentatus (KO: +27,64 % \pm 13,20 %, p=0,0228) gesehen (ebenfalls dargestellt in Abbildung 23). Weiterhin zeigte sich im Stratum oriens der CA1-Region eine knapp an das Signifikanzniveau von $\alpha=5$ % reichende Erhöhung der Immunreaktivität bei den NECAB2-Knockout Tieren im Vergleich zum Wildtyp (KO: +22,05 % \pm 6,90 %, p=0,0515), (Anhang B, Tabelle 50).

4.3.3 Synaptophysin

Die Analyse der Immunreaktivität von Synaptophysin zeigte eine statistisch signifikante Erhöhung zwischen 19,67 und 26,21 % in den Knockout Tieren relativ zur Kontrollgruppe im Stratum oriens und radiatum der CA1-Region sowie im Stratum moleculare des Gyrus dentatus (CA1 Or: KO: +19,67 % \pm 5,01 %, $p=0,0257$; CA1 Rad: KO: +21,44 % \pm 5,90 %, $p=0,0217$; DG Mol: KO: +26,21 % \pm 11,59 %, $p=0,0094$), ebenfalls optisch dargeboten in Abbildung 23, (Anhang B, Tabelle 51).

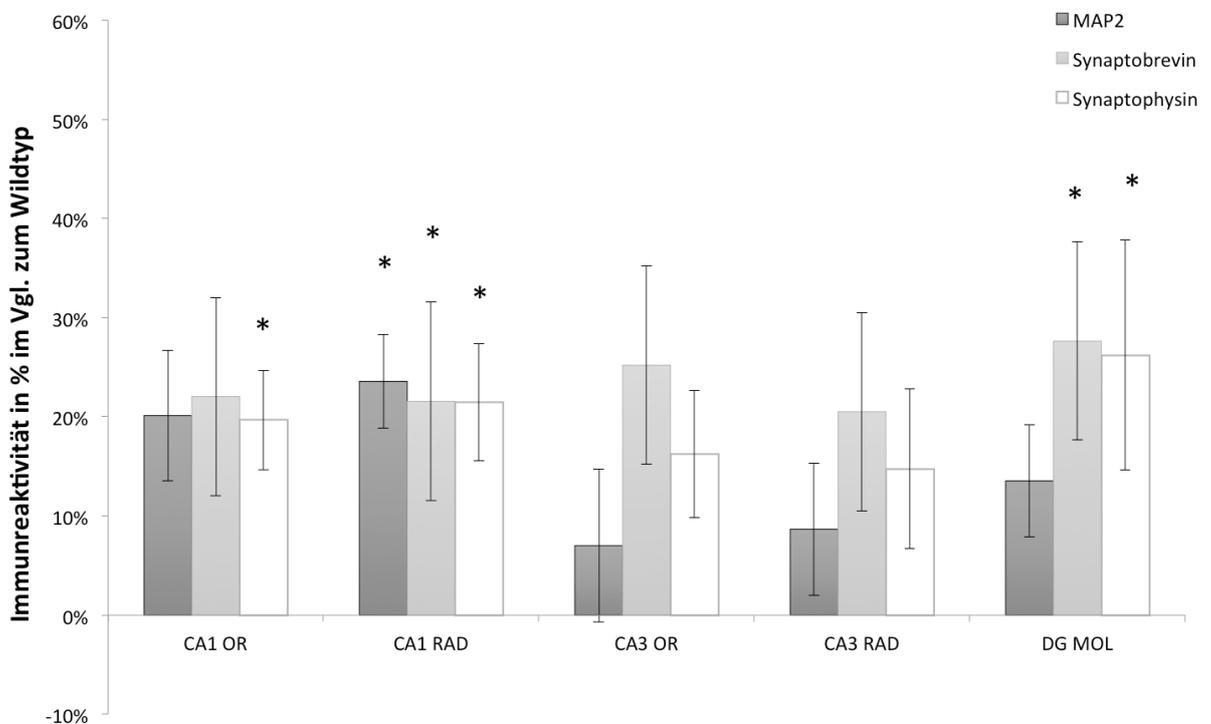


Abbildung 23: Darstellung der semiquantitativen densitometrischen Analyse der MAP2-, Synaptobrevin- und Synaptophysin-Immunreaktivität der dendritischen Schichten im Hippocampus. Die Analyse der Immunreaktivität von MAP2 zeigte bei den Knockout Tieren im Stratum radiatum der CA1-Region eine signifikante Erhöhung ($p=0,025$) gegenüber der Kontrollgruppe. Bezüglich der Immunreaktivität von Synaptobrevin wurde bei den NECAB2-defizienten Tieren eine signifikante Erhöhung im Stratum radiatum der CA1-Neuronen ($p=0,0451$) und im Stratum moleculare des Gyrus dentatus ($p=0,0228$) im Vergleich zum Wildtyp gesehen. Die Analyse der Immunreaktivität von Synaptophysin ergab eine signifikante Erhöhung bei den Knockout Tieren im Stratum oriens ($p=0,0257$) und Stratum radiatum ($p=0,0217$) der CA1-Neuronen sowie im Stratum moleculare des Gyrus dentatus ($p=0,0094$). (* $p<0,05$; Darstellung der Werte \pm SEM; OR: Stratum oriens; RAD: Stratum radiatum; DG: Gyrus dentatus; MOL: Stratum moleculare).

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden umfangreiche Analysen am Gehirn von NECAB2-Knockout Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp Tieren durchgeführt. Aufgrund der Fülle an Ergebnissen soll im Folgenden zur besseren Übersichtlichkeit zuerst eine Diskussion der Resultate der gesondert untersuchten, speziellen Hirnregionen erfolgen. Im Anschluss erfolgt die Zusammenfassung der Ergebnisse mit konsekutivem Fazit.

5.1 Hippocampusformation

5.1.1 Einfluss des NECAB2-Knockouts auf die neuronale Morphologie

5.1.1.1 Apikale Dendriten

Die apikalen Dendriten der CA1-Neuronen sind im Besonderen Zielregion von afferenten Fasern des Tractus perforans. Diese entstammen zum einen dem entorhinalen Kortex und enden vorrangig am distalen Abschnitt der apikalen Dendriten, zum anderen den CA3-Neuronen (Schaffer-Kollateralen), die vorrangig Synapsen an den proximalen und intermediären Dendritenabschnitten bilden [34], [53] (siehe auch Kapitel 2.3.2.1). Diese afferenten Signalwege sind beide von Bedeutung, um physiologische Lern- und Gedächtnisprozesse zu ermöglichen.

Die morphologische Analyse der apikalen Dendriten zeigte hinsichtlich aller untersuchten Aspekte zwischen den beiden Gruppen nur wenige signifikante Unterschiede. Bei den NECAB2-defizienten Tieren war die Dendritenanzahl ab der 19. Ordnung signifikant erniedrigt und die Dendriten der 10. Ordnung waren statistisch signifikant verkürzt. In der Sholl-Analyse konnte einzig eine statistisch signifikante Verkürzung der Dendritenlänge innerhalb des ersten konzentrischen Kreises mit dem Radius von 20 μm in der Gruppe der Knockout Tiere gezeigt werden. Die Tatsache, dass die NECAB2-defizienten Tiere signifikant weniger distale Dendriten der Ordnung 19 und höher aufweisen, könnte auf eine Beeinträchtigung der direkten Verbindung zwischen entorhinalem Kortex und CA1-Neuronen hindeuten. Auch die signifikante Verkürzung der Dendriten 10. Ordnung, welche sich im intermediären Abschnitt des apikalen Dendritenbaumes befinden, könnte auf eine Veränderung in der intrahippocampalen, trisynaptischen Vernetzung hinweisen. Die Analyse der Dichte dendritischer Spines zeigte keinen Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen. Die Evaluation der Spinedichte erfolgte jedoch nur an Dendriten

dritter und vierter Ordnung, da diese an allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Neuronen erwartungsgemäß ausgebildet und somit zu analysieren sind. Hinsichtlich anderer Parameter der Verzweigungsanalyse wiesen diese beiden Neuritenabschnitte ebenso keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf. In weiteren, zukünftigen Untersuchungen wäre zu klären, ob an den distaleren Dendritenabschnitten, die bei den Knockout Tieren in ihrer Länge verkürzt oder in ihrer Anzahl vermindert sind, auch Veränderungen in der Dichte der Spines vorzufinden sind, was die Hinweise auf funktionelle Alterationen, auch im Bezug auf Lern- und Gedächtnisprozesse, erhärten könnten.

5.1.1.2 Basale Dendriten

Bei der Analyse der neuronalen Morphologie der basalen Abschnitte hippocampaler Pyramidenzellen der CA1-Region fanden sich mehrere signifikante Veränderungen zwischen den experimentellen Gruppen. Die basalen Dendriten der Knockout Tiere wiesen im Vergleich zu den Wildtyp Tieren eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl an Dendriten auf, die jedoch in ihrer mittleren Länge und ihrer distalen Komplexität reduziert waren. Weiterhin konnte eine signifikant erhöhte Dichte an Spines in der Gruppe der NECAB2-defizienten Tiere gezeigt werden.

Eine Reduktion der Länge und Komplexität basaler Dendriten wurde bereits in verschiedenen Studien beobachtet und oft als strukturelles Korrelat für neurologisches Defizit ausgelegt. So kommt es beispielsweise durch den physiologischen Alterungsprozess [108], Applikation von Opiaten bei heranwachsenden Tieren [109] oder bei Verlust eines Wachstumsfaktors [110] zu gleichartigen morphologischen Alterationen. Bei Pyramidenzellen der CA1- und CA3-Region sowie Körnerzellen des Gyrus dentatus führte auch eine chronische Stressexposition zu einer Reduktion der Dendritenlänge und -komplexität. Das phänotypische Korrelat dieser strukturellen Veränderungen zeigte sich in einem schlechteren Abschneiden der gestressten Tiere bei Verhaltenstests [111]. Entgegengesetzt wirkte sich beispielsweise die chronische Applikation von Koffein auf hippocampale Pyramidenzellen bei Ratten aus. Die basalen Dendriten zeigten quantitativ mehr Verzweigungen sowie eine Erhöhung ihrer Dendritenlänge. Diese Tiere schnitten im Vergleich zu unbehandelten Tieren in kognitiven Tests mit besseren Ergebnissen ab, was auf die bessere Vernetzung und die damit einhergehende höhere synaptische Aktivität der Neuronen zurückgeführt wurde [112].

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin eine signifikante Zunahme der mittleren Anzahl an Dendriten der Knockout Gruppe gezeigt werden. Diese zusätzlichen Dendriten könnten im Rahmen eines Mechanismus zur Kompensation der fehlenden Dendritenlänge entstanden sein. Eine solche kompensatorische Reaktion wurde beispielsweise auch bei Hirnen im Alzheimer-Tiermodell beobachtet, wo die Aussprossung neuer Dendriten als

Ausgleich für einen Verlust an Neuronen gedeutet wurde [113]. Auch an Körnerzellen des Gyrus dentatus konnte in einer anderen Studie eine Vermehrung der Dendritenzahl gezeigt werden, nachdem zuvor ein Zelluntergang in dieser Region experimentell induziert worden war. Als Reaktion kam es zu einer strukturellen Reorganisation mit Neuaussprossung von Dendriten, mutmaßlich um die Funktionalität der Neuronen zu erhalten [114]. Ferner konnte in der vorliegenden Arbeit neben den Veränderungen in Dendritenlänge und -anzahl eine signifikant erhöhte Spinedichte bei den Knockout Tieren gezeigt werden. In Analogie zu anderen Studien [115], [116] wäre auch hier ein Kompensationsmechanismus plausibel, um mithilfe der vermehrten Dendriten und Spines als Orte synaptischer Kontakte [117] genügend rezeptive Fläche bereitzustellen. Auf die hiesigen Resultate übertragen wäre eine kompensatorische Zunahme der Spinedichte als Vermehrung der rezeptiven Fläche für afferenten Input bei zwar verkürzten, jedoch gleichzeitig in ihrer Anzahl erhöhten Dendriten nicht unbedingt notwendig. In zahlreichen Studien konnte eine höhere Spinedichte mit einer Verbesserung der neuronalen Vernetzung beobachtet werden, was zu der Annahme führte, dass eine erhöhte Anzahl an Spines mit einer erhöhten Anzahl an funktionsfähigen Synapsen gleichzusetzen ist [118]. Als ursächlich für diese Veränderung wurden unterschiedliche Einflüsse wie Lernvorgänge [118], die Applikation von Pharmazeutika wie dem Acetylcholinesterasehemmer Donepezil [119], die Verabreichung von Koffein [120], aber beispielsweise auch der Einfluss weiblicher Sexualhormone [121] beschrieben. Dass eine Vermehrung an Spines jedoch nicht automatisch mit einer höheren Quantität intakter Synapsen einhergeht, wird beispielsweise durch die Studie von Rao et al. [116] deutlich. Dort erfolgte die morphologische Analyse von hippocampalen CA3-Neuronen bei gestressten Ratten. Neben einer Atrophie von Dendriten zeigte sich zusätzlich die postulierte kompensatorische Zunahme der Spinedichte, die jedoch in Gedächtnistests nicht zu einem besseren Abschneiden der betroffenen Tiere führte. Die Autoren spekulierten, dass die Spines möglicherweise abnorme Synapsen ohne physiologische Funktion ausbildeten [116]. Auch Luo et al. konnten zeigen, dass eine deutliche Erhöhung der Dichte an Spines nicht immer mit einer verbesserten Funktion einhergeht, sondern teilweise unvollständig ausgebildete dendritische Dornen bedingt [122]. Zu beachten ist weiterhin, dass nach den Ergebnissen früherer Studien bezüglich der Funktionalität von Spines neben der Anzahl auch die Form eine wichtige Rolle spielt [123], [124], [125], [126], [127]. Beispielsweise konnte eine Einflussnahme der Spinemorphologie auf NMDA-Rezeptoren durch Alteration von deren Effektivität [123] oder durch Reorganisation des dreidimensionalen Gefüges [124], [125] gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Spines einzig unter dem Aspekt ihrer Quantität analysiert. Mögliche qualitative Veränderungen, die einen Einfluss auf ihre synaptische Funktion ausüben könnten, wurden nicht untersucht.

Unter der Annahme, dass die erhöhte Dichte an Spines mit funktionstüchtigen Synapsen korreliert, spräche dies für eine gesteigerte Konnektivität innerhalb des Hippocampus, was wiederum als strukturelles Korrelat verbesserter Lern- und Gedächtnisvorgänge angesehen wird [118]. Zur Überprüfung der funktionellen Konsequenzen der in der vorliegenden Stu-

die beschriebenen morphologischen Alterationen wäre eine Analyse der phänotypischen Auswirkungen des NECAB2-Knockouts, beispielsweise auf die Gedächtnisleistungen, ein logischer nächster Schritt.

5.1.2 Einfluss des NECAB2-Knockouts auf Neurotransmitterrezeptorbindungsichten im Hippocampus

Durch die In-vitro Rezeptorautoradiographie ist es möglich, Ligandenbindungsichten bestimmter Neurotransmitterrezeptoren zu analysieren. Begründet durch den technischen Ablauf dieser Methode (siehe auch Kapitel 3.5) sind einige Besonderheiten anzumerken, die hier vor der Interpretation der Ergebnisse kurz skizziert werden sollen. Nachteilig ist beispielsweise, dass die Verteilung der Rezeptoren innerhalb der analysierten Regionen aufgrund geringer örtlicher Trennschärfe nicht präzise zu bestimmen ist. So können die Rezeptoren nicht einer bestimmten Zelle oder Zellart zugeordnet werden und auch innerhalb eines Neurons bleibt die genaue subzelluläre Anordnung der Rezeptoren unklar. Diese kann je nach Lokalisation des Rezeptors, beispielsweise prä- oder postsynaptisch, einen unterschiedlichen Einfluss innerhalb des neuronalen Netzwerkes ausüben. Berücksichtigt werden muss bei der Interpretation der Ergebnisse auch die Auswahl des Liganden. Neurotransmitterrezeptoren sind typischerweise aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut. Durch die Rezeptorautoradiographie wird nur die Untereinheit des Zielrezeptors sichtbar gemacht, welche die spezifische Bindungsstelle für den gewählten Liganden trägt. Beispielhaft dafür ist die Vielzahl an möglichen Versionen des GABA_A-Rezeptors, die auf der möglichen Kombination von insgesamt 19 verschiedenen Untereinheiten beruht. In unterschiedlichen Hirnregionen wurden jeweils verschiedene Isoformen des Rezeptors lokalisiert [128]. Weiterhin variiert die Bindungsaffinität von Liganden je nach Subtyp des Rezeptors und kann außerdem durch den Einsatz von Kofaktoren modifiziert werden. So besitzen unterschiedliche Subtypen des NMDA-Rezeptors eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Liganden und Kofaktoren und z. T. auch eine unterschiedliche Kinetik [129]. In verschiedenen Hirnregionen konnten spezifische regionale Verteilungsmuster der Rezeptoren je nach Zusammensetzung ihrer Untereinheiten nachgewiesen werden [130], [131]. Trotz dieser Einschränkungen ist die RAR jedoch eine objektivierbare und sehr gut reproduzierbare, etablierte Methode zur Darstellung von Ligandenbindungsichten unterschiedlicher Neurotransmitterrezeptoren.

5.1.2.1 Exzitatorische Neurotransmission

Die Ausstattung mit exzitatorischen Neurotransmitterrezeptoren zur Ausbildung von LTP als eine Form synaptischer Plastizität stellt eine wichtige strukturelle Grundlage für Lernprozesse im Hippocampus dar [55], [57] (siehe auch Kapitel 2.3.2.1). Innerhalb der Hippocampusformation bedarf es dafür in den jeweiligen Subregionen unterschiedlicher Enzyme, Moleküle und Mechanismen [34], [132], [133], [134]. Allen gemeinsam ist jedoch, dass für die Induktion zur Langzeit-Potenzierung eine verstärkte Glutamatfreisetzung mit konsekutivem Einstrom von Calcium in das postsynaptische Kompartiment erforderlich ist [40]. Von besonderer Relevanz hierfür scheinen die Schaffer-Kollateralen mit ihren NMDA-Rezeptoren zu sein [40], [55]. Die Wichtigkeit dieser Verschaltung wird in Studien deutlich, die durch Verminderung der NMDA-Rezeptorwirkung eine kaum messbare Ausbildung von LTP dokumentierten, was sich phänotypisch in einer Beeinträchtigung des räumlichen Lernens äußerte [135], [136]. Neben der essentiellen Aufgabe der NMDA-Rezeptoren ist die Ausbildung von LTP an den Schaffer-Kollateralen jedoch zusätzlich abhängig von einer Koexpression von AMPA-Rezeptoren [137] mit wechselseitiger positiver Verstärkung [138]. AMPA-Rezeptoren sind in ihrer Funktion als direkt agierende Kationenkanäle verantwortlich für die schnelle Änderung des postsynaptischen Membranpotenzials und damit ausschlaggebend für die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren [36] und die Modulation der synaptischen Stärke [139]. Die Ausbildung und Aufrechterhaltung von LTP werden dabei maßgeblich bestimmt durch die Anzahl an postsynaptischen AMPA-Rezeptoren an der Zelloberfläche [137], [140], welche durch Neusynthese oder Rezeptor-Trafficking bedarfsgerecht bereitgestellt werden können [139], [141], [142].

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden diese beiden Rezeptoren hinsichtlich ihrer Ligandenbindungsichte analysiert. Besonders interessant ist im Hippocampus dabei die CA1-Region, welche zum einen durch Synapsenbildung mit den Schaffer-Kollateralen essentiell in der Gedächtniskonsolidierung ist und zum anderen gleichzeitig ein Areal mit physiologischem Vorkommen von NECAB2 darstellt [2].

In der vorliegenden Arbeit resultierte nach Analyse der Ligandenbindungsichten der AMPA-Rezeptoren in keiner hippocampalen Region ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Knockout- und Wildtyp Tieren.

Die Ligandenbindungsichte von MK-801 an NMDA-Rezeptoren zeigte in den Knockout im Vergleich zu den Wildtyp Tiere eine signifikante Erhöhung im Stratum radiatum der CA1-Region sowie im Stratum moleculare des Gyrus dentatus. Einhergehend mit einer erhöhten Dichte an NMDA-Rezeptoren im Hippocampus wurde in früheren Studien ein besseres Abschneiden in Gedächtnistests beobachtet [143]. Gegenläufige Ergebnisse konnten bei einer Verminderung von NMDA-Rezeptoren, beispielsweise durch THC-Applikation bei heranwachsenden Ratten, dokumentiert werden [144]. Die signifikant vermehrte Ligandenbindungsichte an NMDA-Rezeptoren bei den NECAB2-Knockout Tieren könnte somit auf eine verbesserte intrahippocampale synaptische Transmission und auch Funkti-

on hindeuten. Zu beachten ist jedoch, dass neben der Anzahl der Rezeptoren auch deren Zusammensetzung ausschlaggebend für ihre Funktion ist [145]. Manche Untereinheiten sind von größerer Bedeutung für die Ausbildung synaptischer Plastizität und somit auch für Lern- und Gedächtnisleistungen [134], [142], [143], [146], [147]. Die zweite Region, in der die NECAB2-defizienten Tiere eine Erhöhung der Ligandenbindungsichte an NMDA-Rezeptoren aufwiesen, war das Stratum moleculare des Gyrus dentatus. Diese Schicht beinhaltet die Dendriten der Körnerzellen, welche den Großteil der für den Hippocampus bestimmten Afferenzen empfangen. Auch in dieser Region scheinen NMDA-Rezeptoren bei länger anhaltenden strukturellen Veränderungen wie beispielsweise im Rahmen von Lernprozessen von Wichtigkeit zu sein [148]. So zeigte eine Studie, in der durch Knockout ein Verlust von NMDA-Rezeptoren an den Körnerzellen generiert wurde, eine Beeinträchtigung des Erkennens von Zusammenhängen [149]. Auf die vorliegende Arbeit übertragen könnte die Vermehrung der Ligandenbindungsichte in dieser Region darauf hindeuten, dass durch das Fehlen von NECAB2 eine verbesserte synaptische Konnektivität mit einer konsekutiv verbesserten Funktion entstanden sein könnte. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die Körnerzellen im Gyrus dentatus aufgrund ihrer Lokalisation zusätzlich eine wichtige Integrations- und Filterfunktion innehaben, um die große Menge an afferenten Signalen vor Weitergabe an die nachfolgenden hippocampalen Zellen zu verarbeiten. Kommt es nun zu einer einseitigen Erhöhung der exzitatorischen Aktivität über NMDA-Rezeptoren, kann diese Filterfunktion gestört werden und aufgrund des im Wesentlichen unidirektionalen Informationsflusses folglich die gesamte hippocampale Funktion beeinträchtigt sein [150]. Weiterhin gilt anzumerken, dass in früheren Studien eine erhöhte Dichte an NMDA-Rezeptoren im Gyrus dentatus mit pathologischen Prozessen in Zusammenhang gebracht wurde. So führten wiederholte epileptische Anfälle zu einer erhöhten NMDA-Aktivität im Gyrus dentatus, was wiederum eine strukturelle Veränderung bedingte und selbst epileptogen wirken konnte [150], [151].

Insgesamt beeinflusst die NECAB2-Defizienz im Hippocampus offensichtlich die exzitatorische Neurotransmitterrezeptorbindungsichte, wobei die Veränderungen hinsichtlich der NMDA-Rezeptoren eindeutig im Vordergrund stehen.

Dass ein Überangebot an exzitatorischen Aminosäuren mit konsekutiver Übererregung exzitatorischer Rezeptoren den Untergang von Nervenzellen bedingen kann, wurde mit dem Begriff der Exzitotoxizität beschrieben [152]. Dieser Prozess spielt sowohl bei akuten pathologischen Ereignissen wie Hypoglykämie [153], Ischämie [154] oder Epilepsie [155] als auch bei chronischen Erkrankungen wie Morbus Parkinson [156] oder Alzheimer eine Rolle [145], [157]. Durch starke Glutamatfreisetzung mit konsekutiver überhöhter Aktivierung von NMDA-Rezeptoren kommt es zu einem massiven Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, zu der übermäßigen Bildung von H^+ - und Superoxidionen und schlussendlich zu neuronalem Zelluntergang [155], [158], [159], [160], [161], [162], [163].

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen signifikant erhöhten NMDA-Rezeptorbindungsichten deuten auf eine signifikante Vermehrung NMDA-vermittelter exzitatorischer

Signalübertragung in den NECAB2-defizienten Tieren hin. Dies könnte einerseits ein Hinweis auf eine effizientere und intensivere synaptische Aktivität sein oder aber andererseits auf eine erhöhte Exzitation mit der Gefahr glutamatinduzierter Exzitotoxizität hindeuten. In früheren Studien wurde bereits eine calciumabhängige Interaktion von NECAB2 mit Rezeptorproteinen beschrieben – zum einen mit dem mGlu₅-Rezeptor und zum anderen mit dem Adenosin-Rezeptor Typ 2A (A_{2A}R), wobei die Interaktion jeweils zu einer Potenzierung des nachfolgenden Signalweges führte [1], [2]. Beide Rezeptoren sind im Hippocampus exprimiert und scheinen u. a. durch Verstärkung der NMDA-Rezeptorfunktion und Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zur Induktion von LTP beizutragen [164], [165], [166], [167], [168], [169]. Bei hohen Konzentrationen an intrazellulärem Calcium kommt es jedoch in beiden Fällen zur Dissoziation von NECAB2 und dem Rezeptorprotein und folglich zu einer Abnahme der konsekutiven Exzitation [1], [2]. Diesen Studien zufolge unterstützt NECAB2 rezeptorvermittelt und calciumabhängig in einem bestimmten Rahmen die Exzitation und die Induktion von LTP im Hippocampus. Gleichzeitig besteht durch die Dissoziation von den Rezeptoren bei zu hohen Calciumkonzentrationen auch eine modulatorische und neuroprotektive Wirkung durch Verhinderung übermäßiger Exzitation. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit einer signifikant erhöhten Ligandenbindungsdichte an NMDA-Rezeptoren in den NECAB2 Knockout Tieren deuten darauf hin, dass NECAB2 modulatorisch auf die exzitatorische Signalübertragung v. a. mittels NMDA-Rezeptoren einwirkt und möglicherweise auch protektiv gegenüber einer Hyperexzitation fungiert. Ob der NECAB2 Knockout letztlich protektiv wirkt, sollte in Folgeprojekten mittels experimenteller Modelle zu exzitatorischen Werten untersucht werden.

5.1.2.2 Inhibitorische Neurotransmission

Die GABAerge Signaltransduktion über den ionotropen GABA_A-Rezeptor spielt als wesentliches inhibitorisches Übertragungssystem eine essentielle Rolle in der Regulation neuronaler Aktivitätslevel und synaptischer Plastizität [34], [47]. Die Funktionsweise und Wirkung dieses Übertragungssystems in seiner Gesamtheit ist komplex (siehe auch Kapitel 2.2.2). Im Hippocampus wird die inhibitorische Neurotransmission vor allem von GABAergen Interneuronen übernommen, wobei insbesondere die sogenannten Korbzellen als wichtige Akteure zu nennen sind [170], [171]. Im Gyrus dentatus konnte physiologisch die stärkste Expression der inhibitorischen Rezeptoren demonstriert werden [171]. Deren Funktion stellt einen wichtigen Bestandteil der Gedächtnisprozessierung dar, indem sie hauptsächlich durch inhibitorische Modulationen und Beeinflussung von hippocampalem LTP eine Gewichtung bestimmter synaptischer Übertragungsorte bewirken [172], [173], [174]. Die funktionellen Folgen einer Veränderung in der Transmission von GABA_A-Rezeptoren sind divergenter Natur und sehr vielschichtig. Einerseits zeigte eine

Hemmung oder der Verlust dieser inhibitorischen Rezeptoren im Hippocampus in einer Vielzahl von Studien ein verbessertes Abschneiden dieser Tiere in Gedächtnistests [49], [175], [176], [177], [178], wohingegen die Applikation von GABA-Rezeptoragonisten *vice versa* zu schlechteren Gedächtnisleistungen führte [179]. Andererseits konnten in verschiedenen Studien epileptische Ereignisse beobachtet werden, was nach Modifikation dieser Rezeptoren auf den Verlust deren dämpfender Wirkung zurückgeführt wurde [48], [180], [181]. Im Zusammenspiel mit Veränderungen auch der exzitatorischen Neurotransmission sind Alterationen der inhibitorischen GABA-Signaltransduktion an vielen akuten wie auch chronischen pathologischen Prozessen beteiligt, wie beispielsweise der zerebralen Ischämie [182], [183], der Epilepsie [48], [181], der Schizophrenie [184] oder bei Angststörungen [185], [186]. In weiteren Studien wurde insbesondere die Dysbalance der Transmittersysteme als strukturelle Grundlage eines hippocampalen Lerndefizites innerhalb der Hippocampusformation identifiziert. Eine Verstärkung der Inhibition und die gleichzeitige Verminderung der Exzitation werden dabei für schlechteres Abschneiden in Gedächtnistestungen verantwortlich gemacht. Eine derartig veränderte Konstellation der Transmittersysteme konnte beispielsweise nach chronischer THC-Applikation dokumentiert werden [187].

In der vorliegenden Arbeit wurden auch die Ligandenbindungsichten von GABA_A-Rezeptoren im Hippocampus analysiert. Dabei zeigte sich bei den NECAB2-defizienten Tieren eine signifikante Erhöhung der GABA_A-Ligandenbindungsichte in allen drei Schichten der CA1-Region. Da unter physiologischen Umständen in der CA1-Region NECAB2 stark exprimiert wird, modifiziert NECAB2 offenbar die Ligandenbindungsichte von GABA_A-Rezeptoren. Eine Erklärungsmöglichkeit ist eine direkte Einflussnahme als regulatorischer Faktor auf die Expression der Rezeptoren bzw. deren Menge an der Zelloberfläche. So konnten in verschiedenen Studien bereits einige Moleküle identifiziert werden, die durch Einflussnahme auf Rezeptortrafficking die Expression der inhibitorischen GABA_A-Rezeptoren an der Oberfläche vermittelten [180], [188], [189], [190]. In Anlehnung daran könnte auch NECAB2 eine solche Funktion innehaben. Ein anderer Erklärungsansatz für die Erhöhung der Ligandenbindungsichte am GABA_A-Rezeptor ist ein möglicher reaktiver Effekt auf die ebenfalls erhöhte Ligandenbindungsichte am NMDA-Rezeptor. Diese Vermutung wird unterstützt durch Ergebnisse einer Studie, in der eine pränatale Kokain-Applikation zu einer Vermehrung von GABAergen Potenzialen im hippocampalen CA1-Segment führte, was als Kompensation für vermehrte Exzitation diskutiert wurde [191]. Für diesen Mechanismus spricht auch, dass exzitatorische neuronale Aktivität ein wichtiger Reiz ist, um konsekutiv inhibitorische Synapsen auszubilden [192], [193].

Bezüglich der signifikanten Erhöhung der GABA_A-Rezeptorbindungsichten im gesamten CA1-Segment bei den Knockout-Tieren wäre eine phänotypische Untersuchung der Tiere bezüglich ihrer hippocampalen Gedächtnisleistungen sehr aufschlussreich, um dadurch mehr Klarheit über die mögliche Konsequenz dieser biochemischen Alterationen zu erlangen. Auf der anderen Seite wären wiederum experimentelle Stressmodelle mit Exzitotoxizität interessant, um den potentiellen neuroprotektiven Effekt einer NECAB2-Defizienz

zu überprüfen, da eine erhöhte Inhibition in zahlreichen Modellen als neuroprotektiver Mechanismus beschrieben wurde.

5.1.3 Einfluss des NECAB2-Knockouts auf die neuronale Proteinexpression im Hippocampus

5.1.3.1 MAP2

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) ist in den dendritischen Fortsätzen und Spines von Neuronen lokalisiert und spielt durch die Beeinflussung von verschiedenen Zytoskelettfilamenten eine wichtige regulatorische Rolle im Prozess der synaptischen und neuronalen Plastizität (siehe auch Kapitel 2.1.2).

Die immunhistochemische Markierung von MAP2 als dendritischem Marker wurde bereits in verschiedenen Studien genutzt. Beispielsweise konnten durch die Markierung von MAP2 die Progression und das Ausmaß von neuronalen Zellschäden nach zerebraler Ischämie untersucht werden [194], [195]. Auch nach Initiierung von Neuronenuntergang im Hippocampus durch übermäßige externe Applikation von exzitatorischen Aminosäuren konnte eine Abnahme der Immunreaktivität von MAP2 beobachtet werden [196]. Eine Verminderung von MAP2 weist somit auf eine Destruktion und Beeinträchtigung von Nervenzellen hin. Demgegenüber ist eine positive Korrelation zwischen höherer Immunreaktivität von MAP2 und einer komplexeren neuronalen Verzweigungsstruktur [197] und der Neuaussprossung von dendritischen Fortsätzen beobachtet worden [21], [198]. Diese Vorgänge wurden auch infolge eines neuronalen Schadens beschrieben und als Versuch der strukturellen Regeneration durch vermehrte dendritische Plastizität interpretiert [199], [200]. In der hier vorliegenden Arbeit resultierte bei den NECAB2-Knockout Tieren eine statistisch signifikante Erhöhung der Immunreaktivität von MAP2 gegenüber der Kontrollgruppe im Stratum radiatum der CA1-Region. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die dendritische Integrität durch den NECAB2-Knockout nicht beeinträchtigt ist, sondern, entsprechend den oben diskutierten Forschungsergebnissen, eine Vermehrung an dendritischem Material, einhergehend mit vermehrter dendritischer Plastizität und Komplexität in dieser Region, vermutet werden kann.

5.1.3.2 Synaptobrevin

Synaptobrevin oder auch VAMP2 ermöglicht als integraler Bestandteil der Membranen präsynaptischer Vesikel die Fusion der neurotransmitterbeladenen Transportvesikel mit der Plasmamembran und agiert als wichtiges Element der Exozytosemaschinerie (siehe

auch Kapitel 2.1.3). Durch seine Lokalisation kann es als präsynaptisches Markerprotein verwendet werden und Abweichungen können auf eine synaptische Modifikation hinweisen. Als Konsequenz eines verminderten Levels an Synaptobrevin konnten eine verminderte synaptische Transmission und eine damit einhergehende reduzierte synaptische Funktion beobachtet werden [201]. In einer anderen Studie konnte im Gegenzug durch Zunahme der Dichte des Synaptobrevin/Synaptophysin-Komplexes eine konsekutive Verstärkung der glutamatergen Signaltransduktion im Hippocampus beobachtet werden. Dies war vergesellschaftet mit einer Verbesserung des räumlichen und assoziativen Lernens gegenüber Tieren der Kontrollgruppe [202].

In der vorliegenden Arbeit konnte eine statistisch signifikante Erhöhung der Immunreaktivität von Synaptobrevin im Stratum radiatum der CA1-Region und im Stratum moleculare des Gyrus dentatus der Knockout Tiere gezeigt werden. Als Maß für verstärkte Expression lässt diese erhöhte Immunreaktivität eine vermehrte synaptische Aktivität in diesen Regionen und damit in Anlehnung an andere Studien [202] eine Verbesserung der Lern- und Gedächtnisleistung vermuten. Wie bei den anderen untersuchten Parametern sind weiterführende Studien mit einer Korrelation des funktionellen Phänotyps erforderlich.

5.1.3.3 Synaptophysin

Synaptophysin reguliert als präsynaptisches Protein durch Komplexbildung mit Synaptobrevin dessen Freisetzung und spielt damit eine modulatorische Rolle in der Exozytose von Neurotransmittern (siehe auch Kapitel 2.1.4). In Analogie zu Synaptobrevin kann auch Synaptophysin als präsynaptischer Marker verwendet werden, der auf mögliche Veränderungen in der synaptischen Morphologie hinweist.

Auch wenn Synaptophysin keine ausschlaggebende Funktion im Prozess der Exozytose innehat [32], [33], geht eine Erhöhung des Synaptobrevin-Synaptophysin-Komplexes im Hippocampus mit einer verbesserten Funktion der Neuronen einher [202]. In einer anderen Studie konnte ein erhöhtes Niveau neuronaler Funktion einhergehend mit einer Erhöhung von Synaptophysin beobachtet werden. In einem Mausmodell mit fehlendem Na^+/H^+ -Austauscher (Nhe5), der vermutlich ein negativer Regulator für die Aussprossung neuer Spines ist, wiesen die Tiere neben einem erhöhten Vorkommen von Synaptophysin auch eine erhöhte Dichte an Spines und bessere Ergebnisse in Lern- und Gedächtnistestungen gegenüber der Kontrollgruppe auf [203]. Des Weiteren besteht die Vermutung, dass Synaptophysin in Kombination mit Synaptogyrin, einem weiteren präsynaptischen Protein, durch eine Beeinflussung der Transmitterausschüttung direkt auf den Prozess der Langzeit-Potenzierung einwirkt [204].

Die Analysen der vorliegenden Arbeit ergaben eine Erhöhung der semiquantitativen Immunreaktivität von Synaptophysin in den Knockout Tieren mit statistischer Signifikanz

im Bereich des Stratum oriens sowie des Stratum radiatum der CA1-Region und im Stratum moleculare des Gyrus dentatus. Bis auf das Stratum oriens der CA1-Region korrelieren diese Resultate mit einer Erhöhung der Immunreaktivität von Synaptobrevin in den gleichen Regionen und weisen damit auf mehr präsynaptisches Material und eine erhöhte synaptische Aktivität mit möglicherweise einhergehender verbesserter hippocampaler Leistung hin [202].

5.2 Putamen

5.2.1 Einfluss des NECAB2-Knockouts auf die neuronale Morphologie

Bei der Analyse der neuronalen Morphologie der MSN zeigten sich bei den Knockout Tieren eine signifikant geringere mittlere Gesamtanzahl an Dendriten sowie eine signifikant geringere Anzahl an Dendriten erster und zweiter Ordnung, wobei in diesem Bereich zusätzlich eine statistisch relevante geringere Komplexität in ihrer Struktur nachgewiesen wurde. Weiterhin ergab die Analyse der Spines eine signifikante Erhöhung der Dichte dendritischer Spines sowohl an den Ästen dritter als auch vierter Ordnung in den Knockout Tieren. Bei einer somit im Mittel signifikant verringerten Anzahl von Dendriten in der Knockout Gruppe, die sich jedoch nicht hinsichtlich ihrer mittleren Länge, Anzahl an Verzweigungspunkten und Endungen von den dendritischen Ästen der Wildtyp Tieren unterschieden, könnte man vermuten, dass die einzelnen Dendriten kompensatorisch komplexer aufgebaut sind. Diese These lässt sich durch die Ergebnisse der Sholl-Analyse jedoch nicht bestätigen.

Die signifikante Erhöhung der Spinedichte bei den Knockout Tieren könnte auf einen Kompensationsmechanismus hindeuten [115], [116], [117]. Gegen diese Annahme sprechen jedoch die übrigen Resultate der Verzweigungsstruktur, da sich die Dendriten beider Gruppen bezüglich ihrer mittleren Länge und Komplexität nicht unterschieden und somit die Notwendigkeit einer Vermehrung der rezeptiven Fläche nicht erforderlich scheint. Auch im Falle der MSN erfolgte in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die quantitative Bestimmung der Spines, sodass in Analogie zu den Veränderungen der Hippocampusformation über die Funktion der dendritischen Dornen mittels der vorliegenden Daten keine weiterführende Aussage getroffen werden kann.

Falls die vermehrten Spines physiologisch funktionstüchtige Synapsen ausbilden würden, könnte eine Änderung der neurologischen Funktion auftreten. Aufgrund der Aufteilung der MSN in zwei Typen, die in der Bewegungsausführung jeweils eine diametrale Funktion ausüben (siehe Kapitel 2.3.1.1), lässt sich anhand der hier erhobenen Daten kein Rückschluss auf die Charakteristik möglicher Alteration ziehen. Weiterhin lässt sich nicht

ableiten, ob beispielsweise ein bestimmter Subtyp der MSN besonders häufig durch die Golgi-Cox-Methode imprägniert und deshalb vergleichsweise oft ausgewertet wurde. Um das Neuron seiner entsprechenden Subgruppe zuzuordnen, müsste beispielsweise die Art des exprimierten Dopaminrezeptors am gleichen Schnittpräparat nachgewiesen werden.

5.2.2 Einfluss des NECAB2-Knockouts auf die Neurotransmitterrezeptorbindungsichten im Putamen

Im Vergleich zwischen Knockout- und Wildtyp Tieren konnte bezüglich der Rezeptorbindungsichten von NMDA-, AMPA- und GABA_A-Rezeptoren im Putamen als Region mit physiologisch hoher Präsenz an NECAB2 kein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden. Folglich scheint die wesentliche erregende und hemmende Signaltransduktion mittels dieser hier untersuchten Neurotransmitterrezeptoren innerhalb des Netzwerkes der MSN trotz NECAB2-Knockout nicht ausgeprägt alteriert zu sein. Eine Störung in der Balance dieser wichtigen Rezeptoren geht häufig mit gravierenden Beeinträchtigungen einher, wie es beispielsweise bei Patienten mit Morbus Huntington zu beobachten ist [205], [206]. Auch wenn das Fehlen von NECAB2 im Striatum nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit keine Konsequenz für die Ligandenbindungsichten der drei untersuchten Rezeptoren hat, ist zu beachten, dass die MSN eine ganze Reihe weiterer Neurotransmitterrezeptoren besitzen, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden. Dabei ist die Beeinträchtigung einiger dieser Rezeptoren zum Teil mit schwerwiegenden neurodegenerativen Erkrankungen vergesellschaftet, so beispielsweise die Veränderung von Dopaminrezeptoren beim Morbus Parkinson [60]. In Anlehnung an bereits publizierte Studien mit dem Nachweis einer Interaktion zwischen NECAB2, dem Adenosinrezeptor Typ 2A (A_{2A}R) und dem metabotropen Glutamatrezeptor Typ 5 (mGluR₅) [1], [2] wäre eine Analyse von deren Bindungsichten sicherlich interessant. Insbesondere gilt dies deshalb, da beide Rezeptoren eine Rolle in der synaptischen Plastizität des Striatums spielen [207] und beispielsweise postsynaptisch in dendritischen Spines [12], [208] die Neurotransmitterausschüttung modulieren [209] oder durch Beeinflussung von NMDA-Rezeptoren zu einer veränderten Calciumpermeabilität und konsekutiven Änderung neuronaler Funktion führen [210], [211]. Auch die Möglichkeit einer Auswirkung des Knockouts erst auf die nachfolgenden Projektionsgebiete der MSN ist in Anlehnung an eine Studie von Kupersmith et al. zu diskutieren. Darin zeigten sich bei Analyse der Rezeptorbindungsichten von GABA_A nach kortikaler Deafferentation im Putamen keine Veränderungen, wohingegen in den Zielgebieten der ausgehenden Efferenzen Alterationen in deren Rezeptorbindungsichten gemessen werden konnten [212].

5.3 Kortex

5.3.1 Einfluss des NECAB2-Knockouts auf die Neurotransmitterrezeptorbindungsichten im Kortex

Analysiert wurden der primäre somatomotorische sowie der primäre und sekundäre somatosensorische Kortex. Diese Rindenregionen stehen entweder direkt oder indirekt mit Regionen mit physiologisch hohem Vorkommen von NECAB2 in Verbindung (siehe auch Kapitel 2.3). In M1, welcher einen Großteil der Afferenzen der MSN generiert, zeigte sich bei den Tieren der Knockout-Gruppe eine signifikante Erhöhung der Ligandenbindungsichte sowohl der exzitatorischen AMPA- (Schicht IV) und NMDA- (I, II/III) als auch der inhibitorischen GABA_A- (IV) Rezeptoren in verschiedenen Kortexschichten. Die signifikante Erhöhung der Ligandenbindungsichte der NMDA-Rezeptoren in den äußeren Kortexschichten, welche insbesondere Signale von kortiko-kortikalen Assoziationsfasern empfangen [213], deutet auf eine erhöhte Anzahl exzitatorischer Synapsen und Afferenzen hin, womit eine verstärkte intrakortikale Informationsübertragung einhergehen könnte.

In S1 wurden zwei Subregionen untersucht, zum einen die *trunc region* und zum anderen das *barrel field*. Innerhalb der *trunc region* zeigte die Ligandenbindungsichte des inhibitorischen GABA_A-Rezeptors bei den Knockout Tieren in den Schichten II/III, IV und V eine statistisch signifikante Erhöhung. Im *barrel field* fanden sich, außer einer statistisch signifikanten Erhöhung der AMPA-Ligandenbindungsichte in Schicht II/III, keine weiteren Unterschiede. Dies könnte in Analogie zu einer früheren Studie durch Zunahme erregender Signalübertragung auf erhöhte Aktivität und Plastizität bei den Knockout-Tieren hinweisen [214].

In S2 resultierten einzig hinsichtlich des AMPA-Rezeptors statistische Unterschiede mit einer signifikanten Erhöhung der Ligandenbindungsichte bei den Knockout Tieren in den Schichten IV, V und VI. Innerhalb der sensorischen Rindenareale ist auffallend, dass sich die Bindungsdichten am NMDA-Rezeptor im Vergleich der Knockout und Wildtyp Tiere nicht unterschieden, die AMPA-Rezeptoren hingegen punktuell eine statistisch signifikante Erhöhung der Ligandenbindung bei den Knockout Tieren aufwiesen. Bei den NECAB2-defizienten Tieren scheint eine Veränderung des Gleichgewichtes in der Signaltransduktion zu bestehen, wobei die Exzitation nun mutmaßlich vermehrt über die schnell wirkenden AMPA-Kanäle anstatt über NMDA-Rezeptoren vermittelt wird.

Eine Diskussion über die weiterführenden Konsequenzen der veränderten kortikalen Ligandenbindungsichten würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Die Frage, ob sich eine NECAB2-Defizienz auch auf Hirnregionen auswirkt, die physiologisch kein hohes Vorkommen an diesem Protein aufweisen, kann jedoch eindeutig mit Ja beantwortet werden.

6 Zusammenfassung

Bei NECAB2 handelt es sich um ein neuronales Protein, dessen physiologische Funktion bisher noch weitgehend unverstanden ist. NECAB2 wird ausschließlich im ZNS exprimiert. Die Regionen mit dem größten Vorkommen sind die Hippocampusformation [2], das Striatum [1] und das Rückenmark [3]. Subzellulär ist dieses neuronale Protein sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert. In früheren Studien konnte die Struktur von NECAB2 entschlüsselt werden, die aus drei unterschiedlichen Domänen besteht, welche z. T. mit Bindungsstellen für Calciumionen ausgestattet sind [4]. Weiterhin wurde bereits eine Interaktion mit dem A_{2A} - [1] und dem $mGlu_5$ -Rezeptor [2] beschrieben. In beiden Fällen kommt es calciumabhängig zu einer Verstärkung der Rezeptorfunktion durch NECAB2. Herrschen jedoch zu hohe intrazelluläre Calciumkonzentrationen, führt dies zu einer Dissoziation des Proteins von den Rezeptoren und damit zu einer Limitierung ihrer Funktion. Anhand der bisherigen Studienergebnisse wurden verschiedene Vermutungen über die Wirkung von NECAB2 geäußert. Es wird eine Funktion als Transkriptionsfaktor [6], als Modulator von Rezeptorfunktionen [1], [2] sowie als Einflussfaktor im Prozess der Exozytose [5] diskutiert.

Um bezüglich der Proteinfunktion von NECAB2 mehr Klarheit zu erlangen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Untersuchungen am NECAB2-Knockout Mausmodell durchgeführt. Es erfolgte eine Analyse der Rezeptorbindungsichten von NMDA-AMPA- und $GABA_A$ -Rezeptoren mittels der *In-vitro* Rezeptorautoradiographie in der Hippocampusformation und im Putamen sowie zusätzlich in einigen Kortexarealen, welche sogenannte *remote regions* darstellen. Weiterhin wurden die Neuronen der hippocampalen CA1-Region und des Putamen in ihrer Struktur dargestellt und anhand verschiedener morphologischer Gesichtspunkte untersucht. Mithilfe immunhistochemischer Untersuchungen wurde die Hippocampusformation des Weiteren hinsichtlich der Expressionsdichte der präsynaptischen Proteine Synaptobrevin und Synbaptophysin sowie des dendritischen Proteins MAP2 analysiert.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zeigten bei den NECAB2-Knockout Tieren einige signifikante Unterschiede im Vergleich zur Wildtyp Gruppe. Die Analyse der Rezeptorbindungsichten ergab im Hippocampus und im Kortex multiple Veränderungen. Dabei waren sowohl inhibitorische $GABA_A$ -Rezeptoren als auch exzitatorische Rezeptoren, dabei insbesondere NMDA-Rezeptoren, betroffen. Die Rezeptorbindungsichten im Putamen hingegen zeigten sich unbeeinflusst vom Knockout. Des Weiteren wirkt NECAB2 auf die dendritische Plastizität und neuronale Morphologie ein. Sowohl bei den CA1-Neuronen als auch den MSN zeigten sich verschiedene morphologische Alterationen, wobei eine erhöhte Dichte an Spines in beiden Regionen beobachtet werden konnte. Auch die Expression der oben genannten synaptischen Proteine war im Hippocampus der NECAB2-Knockout Tiere verändert und zeigte in verschiedenen Subregionen

eine signifikante Erhöhung ihrer Dichte.

Diese multiplen Veränderungen und Ergebnisse weisen auf eine komplexe, vielschichtige Funktion und Wirkungsweise von NECAB2 mit Einflussnahme auf verschiedene neuronale Prozesse hin, was sich ohne Korrelation mit entsprechenden funktionellen Tests zunächst nur schwer einordnen lässt.

Die eingangs formulierten Fragen zu den Folgen eines NECAB2-Knockouts lassen sich damit jedoch folgendermaßen beantworten:

1. Beeinflusst NECAB2 die dendritische Plastizität und die strukturelle Morphologie von Neuronen im Striatum und Hippocampus?

Die Analyse Golgi-Cox-impregnierter Hirnschnitte konnte eine Einflussnahme von NECAB2 auf die strukturelle Morphologie von Neuronen nachweisen. Bei den NECAB2-defizienten Tieren zeigte sich im Stratum oriens der CA1-Region eine signifikante Verkürzung der dort lokalisierten basalen Dendriten mit einhergehender Verminderung ihrer Komplexität. Im Striatum konnte eine signifikant verminderte Anzahl an Dendriten insgesamt sowie von Dendriten erster und zweiter Ordnung mit ebenfalls einhergehender Verminderung ihrer Komplexität in diesen Abschnitten gezeigt werden. Weiterhin konnte in den NECAB2-Knockout im Vergleich zu den Wildtyp Tieren eine erhöhte Dichte dendritischer Spines an den in der vorliegenden Arbeit analysierten Ordnungen dritten und vierten Grades sowohl an den basalen Dendritenbäumen hippocampaler CA1-Neuronen als auch an den MSN des Striatum gezeigt werden.

2. Hat der NECAB2-Knockout Einfluss auf die Bindungsdichten von Neurotransmitterrezeptoren im Hippocampus und Striatum sowie möglicherweise konsekutiv in den kortikalen Regionen einiger somatomotorischer und somatosensorischer Rindengebiete?

Mittels *In-vitro* Rezeptorautoradiographie wurden jeweils die Bindungsdichten von N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-, α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure (AMPA)-, und γ -Aminobuttersäure(GABA_A)-Rezeptoren analysiert und Unterschiede zwischen NECAB2-defizienten und Wildtyp Tieren nachgewiesen. Im Hippocampus zeigte sich in den NECAB2-Knockout Tieren einerseits eine Erhöhung der exzitatorischen Neurotransmission mittels NMDA-Rezeptoren im Stratum radiatum der CA1-Region und im Stratum moleculare des Gyrus dentatus sowie andererseits eine erhöhte Ligandenbindungsdichte am inhibitorischen GABA_A-Rezeptor in allen Schichten der CA1-Region. Im Striatum ergab sich zwischen den NECAB2-defizienten und den Wildtyp Tieren kein Unterschied der Ligandenbindungsdichten dieser drei Rezeptoren, während hingegen in den als *remote regions* analysierten Kortexarealen multiple, verschiedenartige Alterationen dieser Bindungsdichten gezeigt werden konnten.

3. Beeinflusst NECAB2 die Expression der neuronalen Proteine Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2), Synaptobrevin und Synaptophysin und bedingt damit Änderungen in der synaptischen Plastizität und dendritischen Dynamik im Hippocampus?

Durch immunhistochemische Markierung konnten obige Proteine im Hippocampus semiquantitativ analysiert werden. In den NECAB2-defizienten Tieren zeigte sich ein vermehrter Nachweis von Synaptophysin im Stratum oriens und Stratum radiatum der CA1-Region sowie im Stratum moleculare des Gyrus dentatus. Weiterhin konnte eine erhöhte Quantität von Synaptobrevin im Stratum radiatum der CA1-Region und im Stratum moleculare des Gyrus dentatus sowie von MAP2 im Stratum radiatum der CA1-Region im Vergleich zu den Wildtyp Tieren nachgewiesen werden. Die vermehrte Expression der präsynaptischen Proteine Synaptobrevin und -physin sowie des dendritischen Proteins MAP2 impliziert eine erhöhte synaptische Aktivität und Plastizität in diesen Regionen.

Den vorliegenden Daten nach spielt das Protein NECAB2 insbesondere eine Rolle im Prozess der neuronalen Signaltransduktion an der Synapse. Durch Modulation von Rezeptorbindungsichten, neuronaler Morphologie und Expression von Proteinen scheint es in diesem Geschehen simultan mehrere Elemente zu beeinflussen. Der genaue Mechanismus und die Konsequenz dieser Einflussnahme bleiben bisher ungeklärt, sodass die hiesigen Resultate neben den gewonnenen Erkenntnissen auch eine ganze Reihe weiterer Fragen bezüglich der Funktionsweise von NECAB2 aufwerfen und damit Ansätze für zukünftige Forschungsanstrengungen auf diesem Gebiet liefern.

Literatur

- [1] L. Canela, R. Lujan, C. Lluís, J. Burgueno, J. Mallol, E. I. Canela, R. Franco, F. Ciruela: The neuronal Ca(2+) -binding protein 2 (NECAB2) interacts with the adenosine A(2A) receptor and modulates the cell surface expression and function of the receptor., *Molecular and cellular neurosciences* **36** (2007) 1–12.
- [2] L. Canela, V. Fernandez-Duenas, C. Albergaria, M. Watanabe, C. Lluís, J. Mallol, E. I. Canela, R. Franco, R. Lujan, F. Ciruela: The association of metabotropic glutamate receptor type 5 with the neuronal Ca2+-binding protein 2 modulates receptor function., *Journal of neurochemistry* **111** (2009) 555–67.
- [3] B. Zimmermann, F. Girard, Z. Meszar, M. R. Celio: Expression of the calcium binding proteins Necab-1,-2 and -3 in the adult mouse hippocampus and dentate gyrus., *Brain research* **1528** (2013) 1–7.
- [4] S. Sugita, A. Ho, T. C. Sudhof: NECABs: a family of neuronal Ca(2+)-binding proteins with an unusual domain structure and a restricted expression pattern., *Neuroscience* **112** (2002) 51–63.
- [5] M. D. Zhang, G. Tortoriello, B. Hsueh, R. Tomer, L. Ye, N. Mitsios, L. Borgius, G. Grant, O. Kiehn, M. Watanabe, M. Uhlén, J. Mulder, K. Deisseroth, T. Harkany, T. G. M. Hökfelt: Neuronal calcium-binding proteins 1/2 localize to dorsal root ganglia and excitatory spinal neurons and are regulated by nerve injury., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111** (2014) E1149–E1158.
- [6] G. Bernier, W. Vukovich, L. Neidhardt, B. G. Herrmann, P. Gruss: Isolation and characterization of a downstream target of Pax6 in the mammalian retinal primordium., *Development (Cambridge, England)* **128** (2001) 3987–94.
- [7] M. D. Zhang, S. Barde, E. Szodorai, A. Josephson, N. Mitsios, M. Watanabe, J. Attems, G. Lubec, G. G. Kovács, M. Uhlén, J. Mulder, T. Harkany, T. Hökfelt: Comparative anatomical distribution of neuronal calcium-binding protein (NECAB) 1 and -2 in rodent and human spinal cord., *Brain structure & function* **221** (2016) 3803–3823.
- [8] N. C. Kretsinger RH: Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description., *J Biol Chem.* **248(9)** (1973) 3313–26.
- [9] A. Lewit-Bentley, S. Réty: EF-hand calcium-binding proteins., *Current opinion in structural biology* **10** (2000) 637–643.
- [10] M. Soloviev, F. Ciruela, W. Y. Chan, R. A. McIlhinney: Molecular characterisation of two structurally distinct groups of human homers, generated by extensive alternative splicing., *Journal of molecular biology* **295** (2000) 1185–1200.
- [11] M. A. Adams, Z. Jia: Structural and biochemical evidence for an enzymatic quinone redox cycle in Escherichia coli: identification of a novel quinol monooxygenase., *The Journal of biological chemistry* **280** (2005) 8358–8363.

- [12] P. Svenningsson, C. Le Moine, B. Kull, R. Sunahara, B. Bloch, B. B. Fredholm: Cellular expression of adenosine A_{2A} receptor messenger RNA in the rat central nervous system with special reference to dopamine innervated areas., *Neuroscience* **80** (1997) 1171–1185.
- [13] R. B. Maccioni, V. Cambiazo: Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly., *Physiological reviews* **75** (1995) 835–864.
- [14] R. P. Tucker: The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review., *Brain research. Brain research reviews* **15** (1990) 101–120.
- [15] A. Caceres, G. Banker, O. Steward, L. Binder, M. Payne: MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture., *Brain research* **315** (1984) 314–318.
- [16] M. Morales, E. Fifkova: Distribution of MAP2 in dendritic spines and its colocalization with actin. An immunogold electron-microscope study., *Cell and tissue research* **256** (1989) 447–456.
- [17] T. J. Itoh, S. Hisanaga, T. Hosoi, T. Kishimoto, H. Hotani: Phosphorylation states of microtubule-associated protein 2 (MAP2) determine the regulatory role of MAP2 in microtubule dynamics., *Biochemistry* **36** (1997) 12574–12582.
- [18] A. Murthy, M. Flavin: Microtubule assembly using the microtubule-associated protein MAP-2 prepared in defined states of phosphorylation with protein kinase and phosphatase., *European Journal of Biochemistry* **137** (1983) 37–46.
- [19] S. Halpain, P. Greengard: Activation of NMDA receptors induces rapid dephosphorylation of the cytoskeletal protein MAP2., *Neuron* **5** (1990) 237–246.
- [20] A. T. Sim: The regulation and function of protein phosphatases in the brain., *Molecular neurobiology* **5** (1991) 229–246.
- [21] A. Caceres, J. Mautino, K. S. Kosik: Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation, *Neuron* **9** (1992) 607–618.
- [22] R. Mohan, A. John: Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules., *IUBMB life* **67** (2015) 395–403.
- [23] W. S. Trimble, D. M. Cowan, R. H. Scheller: VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85** (1988) 4538–4542.
- [24] T. Söllner, S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, J. E. Rothman: SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion., *Nature* **362** (1993) 318–324.
- [25] S. Schoch, F. Deák, A. Königstorfer, M. Mozhayeva, Y. Sara, T. C. Südhof, E. T. Kavalali: SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice., *Science (New York, N. Y.)* **294** (2001) 1117–1122.
- [26] A. M. Nystuen, J. K. Schwendinger, A. J. Sachs, N. B. Yang, A. W. and Haider: A null mutation in VAMP1/synaptobrevin is associated with neurological defects and prewean mortality in the lethal-wasting mouse mutant., *Neurogenetics* **8** (2007) 1–10.

- [27] B. Wiedenmann, W. W. Franke: Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles., *Cell* **41** (1985) 1017–1028.
- [28] R. Jahn, W. Schiebler, C. Ouimet, P. Greengard: A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82** (1985) 4137–4141.
- [29] N. Calakos, R. H. Scheller: Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle., *The Journal of biological chemistry* **269** (1994) 24534–24537.
- [30] D. Mitter, C. Reisinger, B. Hinz, S. Hollmann, S. V. Yelamanchili, S. Treiber-Held, T. G. Ohm, A. Herrmann, G. Ahnert-Hilger: The synaptophysin/synaptobrevin interaction critically depends on the cholesterol content., *Journal of neurochemistry* **84** (2003) 35–42.
- [31] B. Hinz, A. Becher, D. Mitter, U. Schulze, K. and Heinemann, A. Draguhn, G. Ahnert-Hilger: Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain., *European journal of cell biology* **80** (2001) 615–619.
- [32] L. G. Eshkind, R. E. Leube: Mice lacking synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles., *Cell and tissue research* **282** (1995) 423–433.
- [33] H. T. McMahon, V. Y. Bolshakov, R. Janz, R. E. Hammer, S. A. Siegelbaum, T. C. Südhof: Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93** (1996) 4760–4764.
- [34] E. Kandel, J. Schwartz, T. Jessell, S. Siegelbaum, A. Hudspeth: Principles of Neural Science, McGraw Hill Medical, 2012, 5th edition.
- [35] J. W. Johnson, P. Ascher: Glycin potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons, *Nature* **325** (1987) 529–531.
- [36] L. Nowak, P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbet, A. Prochiantz: Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones., *Nature* **307** (1984) 462–465.
- [37] M. L. Mayer, G. L. Westbrook, P. B. Guthrie: Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones., *Nature* **309** (1984) 261–263.
- [38] J. M. Bekkers, C. F. Stevens: NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus., *Nature* **341** (1989) 230–233.
- [39] A. B. MacDermott, M. L. Mayer, G. L. Westbrook, S. J. Smith, J. L. Barker: NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones., *Nature* **321** (1986) 519–522.
- [40] M. A. Lynch: Long-term potentiation and memory., *Physiological reviews* **84** (2004) 87–136.

- [41] F. Engert, T. Bonhoeffer: Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity., *Nature* **399** (1999) 66–70.
- [42] C. Lang, A. Barco, L. Zablow, E. Kandel, S. Siegelbaum, S. Zakharenko: Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (2004) 16665–16670.
- [43] K. E. Sorra, K. M. Harris: Stability in synapse number and size at 2 hr after long-term potentiation in hippocampal area CA1., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18** (1998) 658–671.
- [44] X. Dong, Y. Wang, Z. Qin: Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases., *Acta pharmacologica Sinica* **30** (2009) 379–387.
- [45] J. Bormann: Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes., *Trends in neurosciences* **11** (1988) 112–116.
- [46] D. B. Pritchett, H. Sontheimer, B. D. Shivers, S. Ymer, H. Kettenmann, P. R. Schofield, P. H. Seeburg: Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology., *Nature* **338** (1989) 582–585.
- [47] W. Kilb: Development of the GABAergic system from birth to adolescence., *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **18** (2012) 613–630.
- [48] Z. Peng, C. S. Huang, B. M. Stell, I. Mody, C. R. Houser: Altered expression of the delta subunit of the GABAA receptor in a mouse model of temporal lobe epilepsy., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24** (2004) 8629–8639.
- [49] M. Farrant, Z. Nusser: Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors., *Nature reviews. Neuroscience* **6** (2005) 215–229.
- [50] R. A. Alger, B. E. ans Nicoll: GABA-mediated biphasic inhibitory responses in hippocampus, *Nature* **281** (1979) 315–317.
- [51] N. A. Lambert, A. M. Borroni, L. M. Grover, T. J. Teyler: Hyperpolarizing and depolarizing GABAA receptor-mediated dendritic inhibition in area CA1 of the rat hippocampus., *Journal of neurophysiology* **66** (1991) 1538–1548.
- [52] A. T. Gullledge, G. J. Stuart: Excitatory actions of GABA in the cortex., *Neuron* **37** (2003) 299–309.
- [53] G. Zilles, Karl und Rehkämper: Funktionelle Neuroanatomie, Springer, 1998.
- [54] e. a. Charles Watson: The Mouse Nervous System, Elsevier Science & Technology,., 2011, proQuest Ebook Central, <https://ebookcentral.proquest.com/lib/umainz/detail.action?docID=787248>.
- [55] M. J. Aminoff, R. B. Daroff (Eds.): Encyclopedia of Neurological Sciences, Elsevier Science Inc., 2003.

- [56] A. Reiner, L. Medina, C. Veenman: Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates., *Brain Res Brain Res Rev.* **28(3)** (1998) 235–85.
- [57] M. D. Binder, N. Hirokawa, U. Windhorst (Eds.): Encyclopedia of Neuroscience, volume 2281, Springer Verlag, 2009.
- [58] S. T. Kitai, J. D. Kocsis, J. Wood: Origin and characteristics of the cortico-caudate afferents: an anatomical and electrophysiological study, *Brain Research* **118** (1976) 137–141.
- [59] G. Chevalier, J. Deniau: Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions., *Brain Research* **334** (1985) 215–226.
- [60] C. R. Gerfen, T. M. Engber, L. C. Mahan, Z. Susel, T. N. Chase, F. J. Monsma, D. R. Sibley: D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons., *Science (New York, N. Y.)* **250** (1990) 1429–1432.
- [61] A. C. Kreitzer, R. C. Malenka: Striatal plasticity and basal ganglia circuit function., *Neuron* **60** (2008) 543–554.
- [62] T. Wichmann, M. R. DeLong: Functional and pathophysiological models of the basal ganglia., *Current opinion in neurobiology* **6** (1996) 751–758.
- [63] G. E. Alexander, M. R. DeLong, P. L. Strick: Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex., *Annual review of neuroscience* **9** (1986) 357–381.
- [64] M. Trepel: Neuroanatomie, Elsevier GmbH, 2012.
- [65] W. B. Scoville, B. Milner: Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957., *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* **12** (2000) 103–113.
- [66] R. Lorente de Nó: Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the Ammonic system., *Journal for Psychology and Neurology* **46** (1934) 113–177.
- [67] I. D. Amara, R. Insausti, C. WM: The commissural connections of the monkey hippocampal formation., *J Comp Neurol.* **224(3)** (1984) 307–36.
- [68] D. G. Amaral, H. E. Scharfman, P. Lavenex: The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies)., *Progress in brain research* **163** (2007) 3–22.
- [69] P. Somogyi, T. Klausberger: Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus., *The Journal of physiology* **562** (2005) 9–26.
- [70] N. Ishizuka, J. Weber, D. G. Amaral: Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat., *The Journal of comparative neurology* **295** (1990) 580–623.
- [71] T. Blackstad: Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination., *The Journal of Comparative Neurology* **105** (1956) 417–537.

- [72] G. Paxinos, C. Watson: The Rat Brain in Stereotactic Coordinates, Elsevier Inc., 2007.
- [73] S. Herculano-Houzel: The Human Brain in Numbers: A Linearly Scaled-up Primate Brain, *Front Hum Neurosci.* .
- [74] H. Kennedy, C. Dehay: Cortical specification of mice and men., *Cereb Cortex.* (1993) 171–86.
- [75] J. N. Sanes, J. P. Donoghue: Plasticity and primary motor cortex., *Annual review of neuroscience* **23** (2000) 393–415.
- [76] F. L. Rice, H. Van der Loos: Development of the barrels and barrel field in the somatosensory cortex of the mouse., *The Journal of comparative neurology* **171** (1977) 545–560.
- [77] J. P. Donoghue, K. L. Kerman, F. F. Ebner: Evidence for two organizational plans within the somatic sensory-motor cortex of the rat, *The Journal of comparative Neurology* .
- [78] J. Donoghue, C. Parham: Afferent connections of the lateral agranular field of the rat motor cortex., *J Comp Neurol.* .
- [79] R. Gibb, B. Kolb: A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain., *Journal of neuroscience methods* **79** (1998) 1–4.
- [80] G. Rosoklija, B. Mancevski, B. Ilievski, T. Perera, S. H. Lisanby, J. D. Coplan, A. Duma, T. Serafimova, A. J. Dwork: Optimization of Golgi methods for impregnation of brain tissue from humans and monkeys., *Journal of neuroscience methods* **131** (2003) 1–7.
- [81] S. N. Narayanan, R. Jetti, V. R. Gorantla, R. S. Kumar, S. Nayak, P. G. Bhat: Appraisal of the effect of brain impregnation duration on neuronal staining and morphology in a modified Golgi-Cox method., *Journal of neuroscience methods* **235** (2014) 193–207.
- [82] T. Raju, B. Kutty, T. Sathyaprabha, T. Shanakranarayana, B. Rao: The Golgi techniques for staining neurons, *Brain and Behavior* (2004) 108–111.
- [83] J. Spacek: Dynamics of the Golgi method: a time-lapse study of the early stages of impregnation in single sections., *Journal of neurocytology* **18** (1989) 27–38.
- [84] J. F. Pasternak, T. A. Woolsey: On the selectivity of the Golgi-Cox method., *The Journal of comparative neurology* **160** (1975) 307–12.
- [85] H. Braak, E. Braak: Golgi preparations as a tool in neuropathology with particular reference to investigations of the human telencephalic cortex., *Progress in neurobiology* **25** (1985) 93–139.
- [86] G. B. Rosoklija, V. M. Petrushevski, A. Stankov, A. Dika, Z. Jakovski, G. Pavlovski, N. Davcheva, R. Lipkin, T. Schnieder, K. Scobie, A. Duma, A. J. Dwork: Reliable and durable Golgi staining of brain tissue from human autopsies and experimental animals, *Journal of neuroscience methods* **230** (2014) 20–9.

- [87] G. Paxinos, K. Franklin: *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic, San Diego, Calif./London, 2001.
- [88] R. I. Martinez-Tellez, E. Hernandez-Torres, C. Gamboa, G. Flores: Prenatal stress alters spine density and dendritic length of nucleus accumbens and hippocampus neurons in rat offspring., *Synapse (New York, N.Y.)* **63** (2009) 794–804.
- [89] O. Solis, R. A. Vazquez-Roque, I. Camacho-Abrego, C. Gamboa, F. De La Cruz, S. Zamudio, G. Flores: Decreased dendritic spine density of neurons of the prefrontal cortex and nucleus accumbens and enhanced amphetamine sensitivity in postpubertal rats after a neonatal amygdala lesion., *Synapse (New York, N.Y.)* **63** (2009) 1143–53.
- [90] G. Flores, G. Alquicer, A. B. Silva-Gomez, G. Zaldivar, J. Stewart, R. Quirion, L. K. Srivastava: Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in post-pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus., *Neuroscience* **133** (2005) 463–70.
- [91] M. E. Torres-Garcia, O. Solis, A. Patricio, A. Rodriguez-Moreno, I. Camacho-Abrego, I. D. Limon, G. Flores: Dendritic morphology changes in neurons from the prefrontal cortex, hippocampus and nucleus accumbens in rats after lesion of the thalamic reticular nucleus., *Neuroscience* **223** (2012) 429–38.
- [92] B. Kolb, R. Gibb, D. van der Kooy: Neonatal frontal cortical lesions in rats alter cortical structure and connectivity., *Brain research* **645** (1994) 85–97.
- [93] H. W. Cheng, J. A. Rafols, H. G. Goshgarian, Y. Anavi, J. Tong, T. H. McNeill: Differential spine loss and regrowth of striatal neurons following multiple forms of deafferentation: a Golgi study, *Exp Neurol* **147** (1997) 287–298.
- [94] E. Antzoulatos, M. W. Jakowec, G. M. Petzinger, R. I. Wood: MPTP Neurotoxicity and Testosterone Induce Dendritic Remodeling of Striatal Medium Spiny Neurons in the C57Bl/6 Mouse., *Parkinson's disease* **2011** (2011) 138471.
- [95] J. R. Glaser, E. M. Glaser: Neuron imaging with NeuroLucida—a PC-based system for image combining microscopy., *Computerized medical imaging and graphics : the official journal of the Computerized Medical Imaging Society* **14** (1990) 307–317.
- [96] A. A. Leite-Almeida H: Novel applications of common stereology software to represent the complete distribution, density and spatial organization of anterogradely labelled fibers in neuroanatomical tract-tracing studies., *Neurosci Methods*. .
- [97] D. A. Sholl: Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat., *Journal of Anatomy* **87** (1953) 387–406.
- [98] E. H. Wong, A. R. Knight, G. N. Woodruff: [3H]MK-801 labels a site on the N-methyl-D-aspartate receptor channel complex in rat brain membranes., *Journal of neurochemistry* **50** (1988) 274–281.
- [99] K. Beaumont, W. S. Chilton, H. I. Yamamura, S. J. Enna: Muscimol binding in rat brain: association with synaptic GABA receptors., *Brain research* **148** (1978) 153–162.

- [100] S. Sakurai, J. H. Cha, J. Penney, A. Young: Regional distribution and properties of [3H]MK-801 binding sites determined by quantitative autoradiography in rat brain, *Neuroscience* **40** (1991) 533–543.
- [101] S. Standley, G. Tocco, M. F. Tourigny, G. Massicotte, R. F. Thompson, M. Baudry: Developmental changes in alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor properties and expression in the rat hippocampal formation., *Neuroscience* **67** (1995) 881–92.
- [102] J. M. Palacios, W. Young, M. J. Kuhar: Autoradiographic localization of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors in the rat cerebellum, *Proc Natl Acad Sci U S A* **77** (1980) 670–674.
- [103] K. Zilles, J. Wu, W. E. Crusio, H. Schwegler: Water maze and radial maze learning and the density of binding sites of glutamate, GABA, and serotonin receptors in the hippocampus of inbred mouse strains., *Hippocampus* **10** (2000) 213–25.
- [104] A. S. Leong, J. Wright: The contribution of immunohistochemical staining in tumour diagnosis., *Histopathology* **11** (1987) 1295–1305.
- [105] B. Bodey: The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms., *Expert opinion on biological therapy* **2** (2002) 371–393.
- [106] G. Lang: Histotechnik - Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik, Springer-WienNewYork, 2013.
- [107] G. S. Wood, R. Warnke: Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems., *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **29** (1981) 1196–1204.
- [108] Y. Geinisman, L. Detoledo-Morrell, F. Morrell, R. E. Heller: Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioural, electrophysiological and morphological perspectives, *Progress in Neurobiology* **45** (1995) 223–252.
- [109] A. A. Ricalde, R. P. Hammer: Perinatal opiate treatment delays growth of cortical dendrites, *Neuroscience Letters* **115** (1990) 137–143.
- [110] C. M. Cheng, R. F. Mervis, S. Niu, N. Salem, L. A. Witters, V. Tseng, R. Reinhardt, C. A. Bondy: Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth., *Journal of neuroscience research* **73** (2003) 1–9.
- [111] N. Sousa, N. V. Lukoyanov, M. D. Madeira, O. F. Almeida, M. M. Paula-Barbosa: Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement., *Neuroscience* **97** (2000) 253–266.
- [112] S. Vila-Luna, S. Cabrera-Isidoro, L. Vila-Luna, I. Juárez-Díaz, J. L. Bata-García, F. J. Alvarez-Cervera, R. E. Zapata-Vázquez, G. Arankowsky-Sandoval, F. Heredia-López, G. Flores, J. L. Góngora-Alfaro: Chronic caffeine consumption prevents cognitive decline from young to middle age in rats, and is associated with increased length, branching, and spine density of basal dendrites in CA1 hippocampal neurons., *Neuroscience* **202** (2012) 384–395.

- [113] P. D. Coleman, D. G. Flood: Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease., *Neurobiology of aging* **8** (1987) 521–545.
- [114] I. Spigelman, X. X. Yan, A. Obenaus, L. E. Y-S, C. G. Wasterlain, C. E. Ribak: Dentate granule cells form novel basal dendrites in a rat model of temporal lobe epilepsy, *Neuroscience* **86** (1998) 109–120.
- [115] S. Dieni, S. Rees: Dendritic morphology is altered in hippocampal neurons following prenatal compromise., *Journal of neurobiology* **55** (2003) 41–52.
- [116] R. M.S., T. Raju: Effect of chronic restraint stress on dendritic spines and excrescences of hippocampal CA3 pyramidal neurons: a quantitative Golgi study, *Brain Research* **694** (1995) 312–317.
- [117] E. G. Gray: Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex., *Nature* **183** (1959) 1592–1593.
- [118] M. B. Moser, M. Trommald, P. Andersen: An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91** (1994) 12673–12675.
- [119] F. Alcantara-Gonzalez, I. Juarez, O. Solis, I. Martinez-Tellez, I. Camacho-Abrego, E. Masliah, R. Mena, G. Flores: Enhanced dendritic spine number of neurons of the prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in old rats after chronic donepezil administration., *Synapse (New York, N.Y.)* **64** (2010) 786–93.
- [120] E. Korkotian, M. Segal: Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons, *Proceedings of the National Academy of Sciences* .
- [121] C. S. Woolley, E. Gould, M. Frankfurt, B. S. McEwen: Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **10** (1990) 4035–4039.
- [122] L. Luo, T. K. Hensch, L. Ackerman, S. Barbel, L. Y. Jan, Y. N. Jan: Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines., *Nature* **379** (1996) 837–840.
- [123] K. M. Harris, S. B. Kater: Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function., *Annual review of neuroscience* **17** (1994) 341–371.
- [124] M. Fischer, S. Kaech, D. Knutti, A. Matus: Rapid actin-based plasticity in dendritic spines., *Neuron* **20** (1998) 847–854.
- [125] M. Wyszynski, J. Lin, A. Rao, E. Nigh, A. H. Beggs, A. M. Craig, M. Sheng: Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor, *Nature* **385** (1997) 439–442.
- [126] T. A. Comery, C. X. Stamoudis, S. A. Irwin, W. T. Greenough: Increased density of multiple-head dendritic spines on medium-sized spiny neurons of the striatum in rats reared in a complex environment., *Neurobiology of learning and memory* **66** (1996) 93–96.

- [127] L. Wu, D. Guo, Q. Liu, F. Gao, X. Wang, X. Song, F. Wang, R. Zhan: Abnormal Development of Dendrites in Adult-Born Rat Hippocampal Granule Cells Induced by Cyclophosphamide., *Frontiers in cellular neuroscience* **11** (2017) 171.
- [128] J. M. Fritschy, H. Mohler: GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits., *The Journal of comparative neurology* **359** (1995) 154–194.
- [129] H. Monyer, R. Sprengel, R. Schoepfer, A. Herb, M. Higuchi, H. Lomeli, N. Burnashev, B. Sakmann, P. H. Seeburg: Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes., *Science (New York, N.Y.)* **256** (1992) 1217–1221.
- [130] D. T. Monaghan, J. A. Beaton: Quinolinate differentiates between forebrain and cerebellar NMDA receptors, *European Journal of Pharmacology* .
- [131] H. Monyer, N. Burnashev, D. J. Laurie, B. Sakmann, P. H. Seeburg: Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors., *Neuron* **12** (1994) 529–540.
- [132] P. M. Lledo, G. O. Hjelmstad, S. Mukherji, T. R. Soderling, R. C. Malenka, R. A. Nicoll: Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92** (1995) 11175–11179.
- [133] D. L. Pettit, S. Perlman, R. Malinow: Potentiated transmission and prevention of further LTP by increased CaMKII activity in postsynaptic hippocampal slice neurons., *Science (New York, N.Y.)* **266** (1994) 1881–1885.
- [134] V. A. Derkach, M. C. Oh, E. S. Guire, T. R. Soderling: Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity., *Nature reviews. Neuroscience* **8** (2007) 101–113.
- [135] R. G. Morris, E. Anderson, G. S. Lynch, M. Baudry: Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5., *Nature* **319** (1986) 774–776.
- [136] J. Z. Tsien, P. T. Huerta, S. Tonegawa: The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory., *Cell* **87** (1996) 1327–1338.
- [137] A. C. Penn, C. L. Zhang, F. Georges, L. Royer, C. Breillat, E. Hosy, J. D. Petersen, Y. Humeau, D. Choquet: Hippocampal LTP and contextual learning require surface diffusion of AMPA receptors., *Nature* **549** (2017) 384–388.
- [138] S. E. Tan, R. J. Wenthold, T. R. Soderling: Phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in cultured hippocampal neurons., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **14** (1994) 1123–1129.
- [139] P. Opazo, D. Choquet: A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors., *Molecular and cellular neurosciences* **46** (2011) 1–8.

- [140] D. Liao, N. A. Hessler, R. Malinow: Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice., *Nature* **375** (1995) 400–404.
- [141] A. Nayak, D. J. Zastrow, R. Lickteig, N. R. Zahniser, M. D. Browning: Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis., *Nature* **394** (1998) 680–683.
- [142] H. W. Kessels, R. Malinow: Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior., *Neuron* **61** (2009) 340–350.
- [143] Y. P. Tang, E. Shimizu, G. R. Dube, C. Rampon, G. A. Kerchner, M. Zhuo, G. Liu, J. Z. Tsien: Genetic enhancement of learning and memory in mice., *Nature* **401** (1999) 63–69.
- [144] T. Rubino, N. Realini, D. Braidà, S. Guidi, V. Capurro, D. Viganò, C. Guidali, M. Pinter, M. Sala, R. Bartesaghi, D. Parolaro: Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood., *Hippocampus* **19** (2009) 763–772.
- [145] K. B. Hansen, F. Yi, R. E. Perszyk, F. S. Menniti, S. F. Traynelis: NMDA Receptors in the Central Nervous System., *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1677** (2017) 1–80.
- [146] M. C. Cercato, N. Coletti, M. Snitcofsky, A. I. Aguirre, E. E. Kornisiuk, M. V. Baez, D. A. Jerusalinsky: Hippocampal NMDA receptors and the previous experience effect on memory., *Journal of physiology, Paris* **108** (2014) 263–269.
- [147] C. Bellone, R. A. Nicoll: Rapid bidirectional switching of synaptic NMDA receptors., *Neuron* **55** (2007) 779–785.
- [148] I. Mody, U. Heinemann: NMDA receptors of dentate gyrus granule cells participate in synaptic transmission following kindling., *Nature* **326** (1987) 701–704.
- [149] T. J. McHugh, M. W. Jones, J. J. Quinn, N. Balthasar, R. Coppari, J. K. Elmquist, B. B. Lowell, M. S. Fanselow, M. A. Wilson, S. Tonegawa: Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network., *Science (New York, N.Y.)* **317** (2007) 94–99.
- [150] M. Lynch, U. Sayin, G. Golarai, T. Sutula: NMDA receptor-dependent plasticity of granule cell spiking in the dentate gyrus of normal and epileptic rats., *Journal of neurophysiology* **84** (2000) 2868–2879.
- [151] M. Lynch, T. Sutula: Recurrent excitatory connectivity in the dentate gyrus of kindled and kainic acid-treated rats., *Journal of neurophysiology* **83** (2000) 693–704.
- [152] J. W. Olney: Inciting excitotoxic cytotoxicity among central neurons, *Advances in Experimental Medicine and Biology* **203** (1986) 631–645.
- [153] T. Wieloch: Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist., *Science (New York, N.Y.)* **230** (1985) 681–683.

- [154] C. M. Wroge, J. Hogins, L. Eisenman, S. Mennerick: Synaptic NMDA receptors mediate hypoxic excitotoxic death., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32** (2012) 6732–6742.
- [155] I. Mody, J. F. MacDonald: NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release., *Trends in pharmacological sciences* **16** (1995) 356–359.
- [156] D. J. Surmeier, P. T. Schumacker: Calcium, bioenergetics, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease., *The Journal of biological chemistry* **288** (2013) 10736–10741.
- [157] D. W. Choi: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system., *Neuron* **1** (1988) 623–634.
- [158] A. M. Brennan, S. W. Suh, S. J. Won, P. Narasimhan, T. M. Kauppinen, H. Lee, Y. Edling, P. H. Chan, R. A. Swanson: NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation., *Nature neuroscience* **12** (2009) 857–863.
- [159] G. Garthwaite, J. Garthwaite: Neurotoxicity of excitatory amino acid receptor agonist in rat cerebellar slices: dependence on calcium concentration, *Neuroscience Letters* **66** (1986) 193–198.
- [160] D. W. Choi: Ionic dependence of glutamate neurotoxicity., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **7** (1987) 369–379.
- [161] A. Atlante, S. Gagliardi, G. M. Minervini, M. T. Ciotti, E. Marra, P. Calissano: Glutamate neurotoxicity in rat cerebellar granule cells: a major role for xanthine oxidase in oxygen radical formation, *Journal of Neurochemistry* **68** (1997) 2038–2045.
- [162] E. K. Michaelis: Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging., *Progress in neurobiology* **54** (1998) 369–415.
- [163] Y. Dong, A. V. Kalueff, C. Song: N-methyl-d-aspartate receptor-mediated calcium overload and endoplasmic reticulum stress are involved in interleukin-1 β -induced neuronal apoptosis in rat hippocampus., *Journal of neuroimmunology* **307** (2017) 7–13.
- [164] R. Lujan, Z. Nusser, J. D. Roberts, R. Shigemoto, P. Somogyi: Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus., *The European journal of neuroscience* **8** (1996) 1488–1500.
- [165] Z. I. Bashir, Z. A. Bortolotto, C. H. Davies, N. Berretta, A. J. Irving, A. J. Seal, J. M. Henley, D. E. Jane, J. C. Watkins, G. L. Collingridge: Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors., *Nature* **363** (1993) 347–350.
- [166] L. Aniksztejn, S. Otani, Y. Ben-Ari: Quisqualate metabotropic receptors modulate NMDA currents and facilitate induction of long-term potentiation through protein kinase C, *European Journal of Neuroscience* **4** (1992) 500–505.

- [167] G. Mannaioni, M. J. Marino, O. Valenti, S. F. Traynelis, P. J. Conn: Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21** (2001) 5925–5934.
- [168] A. M. Sebastiano, J. A. Ribeiro: Evidence for the presence of excitatory A2 adenosine receptors in the rat hippocampus, *Neuroscience Letters* **138** (1992) 41–44.
- [169] A. de Mendonca, J. A. Ribeiro: Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus., *Neuroscience* **62** (1994) 385–390.
- [170] D. R. Curtis, D. Felix, H. McLellan: GABA and hippocampal inhibition, *British Journal of Pharmacology* **40** (1970) 881–883.
- [171] J. M. Palacios, J. K. Wamsley, M. J. Kuhar: High affinity GABA receptors- autoradiographic localization., *Brain research* **222** (1981) 285–307.
- [172] O. Paulsen, E. I. Moser: A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity., *Trends in neurosciences* **21** (1998) 273–278.
- [173] V. Chan-Palay: Quantitative visualization of gamma-aminobutyric acid receptors in hippocampus and area dentata demonstrated by [3H]muscimol autoradiography., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75** (1978) 2516–2520.
- [174] F. Arima-Yoshida, A. M. Watabe, T. Manabe: The mechanisms of the strong inhibitory modulation of long-term potentiation in the rat dentate gyrus., *The European journal of neuroscience* **33** (2011) 1637–1646.
- [175] V. B. Caraiscos, E. M. Elliott, K. E. You-Ten, V. Y. Cheng, D. Belelli, J. G. Newell, M. F. Jackson, J. J. Lambert, T. W. Rosahl, K. A. Wafford, J. F. MacDonald, B. A. Orser: Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing-GABA type A receptors, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101** (2004) 3662–3667.
- [176] N. Collinson, F. M. Kuenzi, W. Jarolimek, K. A. Maubach, R. Cothliff, C. Sur, A. Smith, F. M. Otu, O. Howell, J. R. Atack, R. M. McKernan, G. R. Seabrook, G. R. Dawson, P. J. Whiting, T. W. Rosahl: Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha5 subunit of the GABAA receptor, *Journal of Neuroscience* **22** (2002) 5572–5580.
- [177] A. Mousavi Majd, F. Ebrahim Tabar, A. Afghani, S. Ashrafpour, S. Dehghan, M. Gol, M. Ashrafpour, F. Pourabdolhossein: Inhibition of GABA A receptor improved special memory impairment in the local model of demyelination in rat hippocampus., *Behavioural brain research* **336** (2018) 111–121.
- [178] B. Yousefi, M. Nasehi, F. Khakpai, M. R. Zarrindast: Possible interaction of cholinergic and GABAergic systems between MS and CA1 upon memory acquisition in rats., *Behavioural brain research* **235** (2012) 231–243.
- [179] S. A. Farr, J. F. Flood, J. E. Morley: The effect of cholinergic, GABAergic, serotonergic, and glutamatergic receptor modulation on posttrial memory processing in the hippocampus., *Neurobiology of learning and memory* **73** (2000) 150–167.

- [180] J. L. Maguire, B. M. Stell, M. Rafizadeh, I. Mody: Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety., *Nature neuroscience* **8** (2005) 797–804.
- [181] J.-M. Fritschy: Epilepsy, E/I balance and GABAA receptor plasticity, *Frontiers in Molecular Neurosciences* .
- [182] C. Sommer, A. Fahrner, M. Kiessling: [3H] Muscimol binding to gamma-aminobutyric acid A receptors is upregulated in CA1 neurons of the gerbil hippocampus in the ischemia-tolerant state, *Stroke* .
- [183] R. D. Schwartz-Bloom, R. Sah: gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia., *Journal of neurochemistry* **77** (2001) 353–371.
- [184] E. I. Charych, F. Liu, S. J. Moss, N. J. Brandon: GABA(A) receptors and their associated proteins: implications in the etiology and treatment of schizophrenia and related disorders., *Neuropharmacology* **57** (2009) 481–495.
- [185] F. Crestani, M. Lorez, K. Baer, C. Essrich, D. Benke, J. P. Laurent, C. Belzung, J. M. Fritschy, B. Lüscher, H. Mohler: Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues., *Nature neuroscience* **2** (1999) 833–839.
- [186] R. B. Lydiard: The role of GABA in anxiety disorders., *The Journal of clinical psychiatry* **64 Suppl 3** (2003) 21–27.
- [187] A. Higuera-Matas, M. Miguéns, S. M. Coria, M. A. Assis, E. Borcel, N. del Olmo, E. Ambrosio: Sex-specific disturbances of the glutamate/GABA balance in the hippocampus of adult rats subjected to adolescent cannabinoid exposure., *Neuropharmacology* **62** (2012) 1975–1984.
- [188] I. Brünig, S. Penschuck, B. Berninger, J. Benson, J. M. Fritschy: BDNF reduces miniature inhibitory postsynaptic currents by rapid downregulation of GABA(A) receptor surface expression., *The European journal of neuroscience* **13** (2001) 1320–1328.
- [189] Q. Wan, Z. G. Xiong, H. Y. Man, C. A. Ackerley, J. Branton, W. Y. Lu, L. E. Becker, J. F. MacDonald, Y. T. Wang: Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin., *Nature* **388** (1997) 686–690.
- [190] Z. P. Pang, W. Han: Regulation of synaptic functions in central nervous system by endocrine hormones and the maintenance of energy homeostasis., *Bioscience reports* **32** (2012) 423–432.
- [191] J. Z. Little, T. J. Teyler: GABAa receptor-mediated field potentials are enhanced in area CA1 following prenatal cocaine exposure., *Brain research. Developmental brain research* **110** (1998) 115–119.
- [192] S. Marty, R. Wehrlé, C. Sotelo: Neuronal activity and brain-derived neurotrophic factor regulate the density of inhibitory synapses in organotypic slice cultures of postnatal hippocampus., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20** (2000) 8087–8095.

- [193] F. J. Seil, R. Drake-Baumann: Reduced cortical inhibitory synaptogenesis in organotypic cerebellar cultures developing in the absence of neuronal activity., *The Journal of comparative neurology* **342** (1994) 366–377.
- [194] K. Kitagawa, M. Matsumoto, M. Niinobe, K. Mikoshiba, R. Hata, H. Ueda, N. Handa, R. Fukunaga, Y. Isaka, K. Kimura: Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage—immunohistochemical investigation of dendritic damage., *Neuroscience* **31** (1989) 401–411.
- [195] D. F. Matesic, R. C. Lin: Microtubule-associated protein 2 as an early indicator of ischemia-induced neurodegeneration in the gerbil forebrain., *Journal of neurochemistry* **63** (1994) 1012–1020.
- [196] R. Siman, J. C. Noszek: Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo, *Neuron* **1** (1988) 279–287.
- [197] B. Chamak, A. Fellous, J. Glowinski, A. Prochiantz: MAP2 expression and neuritic outgrowth and branching are coregulated through region-specific neuro-astroglial interactions., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **7** (1987) 3163–3170.
- [198] A. Ferreira, A. Cáceras: Estrogen-enhanced neurite growth: evidence for a selective induction of tau and stable microtubules, *The Journal of Neuroscience* **11** (1991) 392–400.
- [199] H. Yamanouchi, W. Zhang, V. Jay, L. E. Becker: Enhanced expression of microtubule-associated protein 2 in large neurons of cortical dysplasia., *Annals of neurology* **39** (1996) 57–61.
- [200] A. Cácares, J. Busciglio, A. Ferreira, O. Steward: An immunocytochemical and biochemical study of the microtubule-associated protein MAP-2 during post-lesion dendritic remodeling in the central nervous system of adult rats, *Molecular Brain Research* **3** (1988) 233–246.
- [201] S. J. Koo, G. Kochlamazashvili, B. Rost, D. Puchkov, N. Gimber, M. Lehmann, G. Tadeus, J. Schmoranzner, C. Rosenmund, V. Haucke, T. Maritzen: Vesicular Synaptobrevin/VAMP2 Levels Guarded by AP180 Control Efficient Neurotransmission., *Neuron* **88** (2015) 330–344.
- [202] I. Slutsky, N. Abumaria, L.-J. Wu, C. Huang, L. Zhang, B. Li, X. Zhao, A. Govindarajan, M.-G. Zhao, M. Zhuo, S. Tonegawa, G. Liu: Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium., *Neuron* **65** (2010) 165–177.
- [203] X. Chen, X. Wang, L. Tang, J. Wang, C. Shen, J. Liu, S. Lu, H. Zhang, Y. Kuang, J. Fei, Z. Wang: Nhe5 deficiency enhances learning and memory via upregulating Bdnf/TrkB signaling in mice., *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* .
- [204] R. Janz, T. C. Südhof, R. E. Hammer, V. Unni, S. A. Siegelbaum, V. Y. Bolshakov: Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I., *Neuron* **24** (1999) 687–700.

- [205] A. B. Young, H. S. Pan, B. J. Ciliax, J. B. Penney: GABA and benzodiazepine receptors in basal ganglia function., *Neuroscience letters* **47** (1984) 361–367.
- [206] A. B. Young, J. T. Greenamyre, Z. Hollingsworth, R. Albin, C. D’Amato, I. Shoulson, J. B. Penney: NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington’s disease., *Science (New York, N.Y.)* **241** (1988) 981–983.
- [207] S. Ferré, M. Karcz-Kubicha, B. T. Hope, P. Popoli, J. Burgueño, M. A. Gutiérrez, V. Casadó, K. Fuxe, S. R. Goldberg, C. Lluis, R. Franco, F. Ciruela: Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** (2002) 11940–11945.
- [208] B. D. Hettinger, A. Lee, J. Linden, D. L. Rosin: Ultrastructural localization of adenosine A2A receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum., *The Journal of comparative neurology* **431** (2001) 331–346.
- [209] P. Svenningsson, C. Le Moine, G. Fisone, B. B. Fredholm: Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors., *Progress in neurobiology* **59** (1999) 355–396.
- [210] K. Azdad, D. Gall, A. S. Woods, C. Ledent, S. Ferré, S. N. Schiffmann: Dopamine D2 and adenosine A2A receptors regulate NMDA-mediated excitation in accumbens neurons through A2A-D2 receptor heteromerization., *Neuropsychopharmacology* **34** (2009) 972–986.
- [211] S. Hernandez-Lopez, T. Tkatch, E. Perez-Garci, E. Galarraga, J. Bargas, H. Hamm, D. J. Surmeier: D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β]₁-IP₃-calcineurin-signaling cascade., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20** (2000) 8987–8995.
- [212] M. J. Kupersmith, M. Goldstein: The effect of decortication on the basal ganglia GABA receptor., *Neuroscience letters* **17** (1980) 335–337.
- [213] D. C. Chu, R. L. Albin, A. B. Young, J. B. Penney: Distribution and kinetics of GABAB binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study., *Neuroscience* **34** (1990) 341–357.
- [214] M. E. Diamond, W. Huang, F. F. Ebner: Laminar comparison of somatosensory cortical plasticity., *Science (New York, N.Y.)* **265** (1994) 1885–1888.

Anhang

A Pufferlösungen

- **PBS - Stammlösung (pH=7,4)**
 - 81,8 g NaCl
 - 2,0 g KCl
 - 14,4 g Na₂HPO₄ + H₂O
 - 2,0 g KH₂PO₄
- **PBS - Gebrauchslösung**
 - 100 ml PBS-Stammlösung
 - 900 ml Aqua dest.
- **PBST - Gebrauchslösung**
 - 100 ml PBS-Stammlösung
 - 900 ml Aqua dest.
 - 3 ml Triton X 100
- **Tris-Citrat - Stammlösung (pH=7,0)**
 - 121,1 g Tris in 800 ml Aqua dest. lösen
 - mit Citronensäure bei 4 °C auf pH 7,0 einstellen
 - auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
- **Tris-Citrat - Gebrauchslösung (50 mM)**
 - 50 ml einmolare Tris-Citrat-Stammlösung auf 1000 ml Aqua dest.
- **Tris-Acetat - Stammlösung (pH=7,2)**
 - 121,1 g Tris in 800 ml Aqua dest. lösen
 - mit Essigsäure bei 4 °C auf pH 7,2 einstellen
 - auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
- **Tris-Acetat - Gebrauchslösung (50 mM)**

-
- 50 ml einmolare Tris-Acetat-Stammlösung auf 1000 ml Aqua dest.

 - **Tris-HCl - Stammlösung (pH=7,7)**
 - 201,8 g Tris in 1000 ml Aqua dest. lösen
 - 100 ml 37%ige HCl dazu, anschließend über Nacht rühren
 - mit Salzsäure bei 25 °C auf pH 7,7 einstellen
 - auf 1660 ml mit Aqua dest. auffüllen

 - **Tris-HCl - Gebrauchslösung (170 mM, 50 mM)**
 - 170 mM: 170 ml einmolare Tris-HCl-Stammlösung auf 1000 ml Aqua dest.
 - 50 mM: 50 ml einmolare Tris-HCl-Stammlösung auf 1000 ml Aqua dest.

B Tabellarische Auflistung der Ergebnisse

- Tabelle 1:** Verzweigungsstruktur MSN: mittlere Anzahl der Endungen
- Tabelle 2:** Verzweigungsstruktur MSN: mittlere Anzahl der Knotenpunkte
- Tabelle 3:** Verzweigungsstruktur MSN: mittlere Dendritenlänge in μm
- Tabelle 4:** Verzweigungsstruktur MSN: mittlere Anzahl an Dendriten
- Tabelle 5:** Verzweigungsstruktur MSN: mittlere Dendritenlänge/Ordnung
- Tabelle 6:** Verzweigungsstruktur MSN: mittlere Anzahl der Dendriten/Ordnung
- Tabelle 7:** Verzweigungsstruktur CA1-Neurone, apikaler Abschnitt:
mittlere Anzahl der Endungen
- Tabelle 8:** Verzweigungsstruktur CA1-Neurone, apikaler Abschnitt:
mittlere Anzahl der Knotenpunkte
- Tabelle 9:** Verzweigungsstruktur CA1-Neurone, apikaler Abschnitt:
mittlere Dendritenlänge in μm
- Tabelle 10:** Verzweigungsstruktur CA1-Neurone, apikaler Abschnitt:
mittlere Dendritenlänge/Ordnung
- Tabelle 11:** Verzweigungsstruktur CA1-Neurone, apikaler Abschnitt:
mittlere Dendritenanzahl/Ordnung
- Tabelle 12:** Verzweigungsstruktur CA1-Neurone, basaler Abschnitt:
mittlere Anzahl der Endungen
- Tabelle 13:** Verzweigungsstruktur CA1-Neurone, basaler Abschnitt:
mittlere Anzahl an Knotenpunkten
- Tabelle 14:** Verzweigungsstruktur CA1-Neurone, basaler Abschnitt:
mittlere Dendritenlänge in μm
- Tabelle 15:** Verzweigungsstruktur CA1-Neurone, basaler Abschnitt:
mittlere Dendritenanzahl
- Tabelle 16:** Verzweigungsstruktur CA1-Neurone, basaler Abschnitt:
mittlere Dendritenlänge/Ordnung
- Tabelle 17:** Verzweigungsstruktur CA1-Neurone, basaler Abschnitt:
mittlere Dendritenanzahl/Ordnung
- Tabelle 18:** Dichte dendritischer Spines MSN: Dendriten 3. und 4. Ordnung
- Tabelle 19:** Dichte dendritischer Spines CA1-Neurone, apikaler Abschnitt:
Dendriten 3. und 4. Ordnung
- Tabelle 20:** Dichte dendritischer Spines CA1-Neurone, basaler Abschnitt:
Dendriten 3. und 4. Ordnung
- Tabelle 21:** Sholl-Analyse MSN: mittlere Anzahl an Endungen
- Tabelle 22:** Sholl-Analyse MSN: mittlere Anzahl an Knotenpunkten
- Tabelle 23:** Sholl-Analyse MSN: mittlere Dendritenlänge in μm
- Tabelle 24:** Sholl-Analyse MSN: mittlere Anzahl an Schnittpunkten mit den Shollspären
- Tabelle 25:** Sholl-Analyse CA1-Neurone, apikaler Abschnitt: mittlere Anzahl an Endungen

- Tabelle 26:** Sholl-Analyse CA1-Neurone, apikaler Abschnitt: mittlere Anzahl an Knotenpunkten
- Tabelle 27:** Sholl-Analyse CA1-Neurone, apikaler Abschnitt: mittlere Dendritenlänge
- Tabelle 28:** Sholl-Analyse CA1-Neurone, apikaler Abschnitt:
mittlere Anzahl an Schnittpunkten mit den Shollspähren
- Tabelle 29:** Sholl-Analyse CA1-Neurone, basaler Abschnitt: mittlere Anzahl an Endungen
- Tabelle 30:** Sholl-Analyse CA1-Neurone, basaler Abschnitt: mittlere Anzahl an Knotenpunkten
- Tabelle 31:** Sholl-Analyse CA1-Neurone, basaler Abschnitt: mittlere Dendritenlänge in μm
- Tabelle 32:** Sholl-Analyse CA1-Neurone, basaler Abschnitt:
mittlere Anzahl an Schnittpunkten mit den Shollspähren
- Tabelle 33:** Spezifische Ligandenbindungsdichte von $[^3\text{H}]\text{MK-801}$ im Hippocampus
- Tabelle 34:** Spezifische Ligandenbindungsdichte von $[^3\text{H}]\text{AMPA}$ im Hippocampus
- Tabelle 35:** Spezifische Ligandenbindungsdichte von $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ im Hippocampus
- Tabelle 36:** Spezifische Ligandenbindungsichten von $[^3\text{H}]\text{MK-801}$, $[^3\text{H}]\text{AMPA}$ und $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$
im Caudoputamen
- Tabelle 37:** Spezifische Ligandenbindungsdichte von $[^3\text{H}]\text{MK-801}$ im Areal M1
- Tabelle 38:** Spezifische Ligandenbindungsdichte von $[^3\text{H}]\text{AMPA}$ im Areal M1
- Tabelle 39:** Spezifische Ligandenbindungsdichte von $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ im Areal M1
- Tabelle 40:** Spezifische Ligandenbindungsdichte von $[^3\text{H}]\text{MK-801}$ im Areal S1 *Tr*
- Tabelle 41:** Spezifische Ligandenbindungsdichte von $[^3\text{H}]\text{AMPA}$ im Areal S1 *Tr*
- Tabelle 42:** Spezifische Ligandenbindungsdichte von $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ im Areal S1 *Tr*
- Tabelle 43:** Spezifische Ligandenbindungsdichte von $[^3\text{H}]\text{MK-801}$ im Areal S1 *Bf*
- Tabelle 44:** Spezifische Ligandenbindungsdichte von $[^3\text{H}]\text{AMPA}$ im Areal S1 *Bf*
- Tabelle 45:** Spezifische Ligandenbindungsdichte von $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ im Areal S1 *Bf*
- Tabelle 46:** Spezifische Ligandenbindungsdichte von $[^3\text{H}]\text{MK-801}$ im Areal S2
- Tabelle 47:** Spezifische Ligandenbindungsdichte von $[^3\text{H}]\text{AMPA}$ im Areal S2
- Tabelle 48:** Spezifische Ligandenbindungsdichte von $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ im Areal S2
- Tabelle 49:** Optische Dichte von MAP2 im Hippocampus
- Tabelle 50:** Optische Dichte von Synaptobrevin im Hippocampus
- Tabelle 51:** Optische Dichte von Synaptophysin im Hippocampus

Tabelle 1:

Verzweigungsstruktur der MSN: mittlere Anzahl der Endungen; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)		Knockout (NECAB2-/-)		<i>p</i> -Wert
<i>M</i>	SEM	<i>M</i>	SEM	
21,8	0,60	20,7	0,69	0,2341

Tabelle 2:

Verzweigungsstruktur der MSN: mittlere Anzahl der Knotenpunkte; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)		Knockout (NECAB2-/-)		<i>p</i> -Wert
<i>M</i>	SEM	<i>M</i>	SEM	
15,2	0,54	14,9	0,62	0,6551

Tabelle 3:

Verzweigungsstruktur der MSN: mittlere Dendritenlänge in μm ; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)		Knockout (NECAB2-/-)		<i>p</i> -Wert
<i>M</i> [μm]	SEM [μm]	<i>M</i> [μm]	SEM [μm]	
203,22	10,10	215,31	11,61	0,1049

Tabelle 4:

Verzweigungsstruktur der MSN: mittlere Anzahl an Dendriten; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)		Knockout (NECAB2-/-)		<i>p</i> -Wert
<i>M</i>	SEM	<i>M</i>	SEM	
6,0	0,17	5,4	0,19	0,0169 *

Tabelle 5:

Verzweigungsstruktur der MSN: mittlere Dendritenlänge/Ordnung; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			<i>p</i> -Wert
Ordnungsgrad	<i>M</i> [μm]	SEM [μm]	Ordnungsgrad	<i>M</i> [μm]	SEM [μm]	
1	18,62	1,02	1	20,04	1,19	0,5135
2	27,78	1,22	2	26,92	1,40	0,6159
3	33,60	1,43	3	35,54	1,64	0,5936
4	32,90	1,52	4	36,98	1,79	0,0858
5	36,06	1,96	5	34,78	2,20	0,9641
6	36,35	3,97	6	36,24	4,21	0,9024
7	21,63	6,92	7	29,97	6,92	0,9015
≥ 8	23,75	4,92	≥ 8	29,97	6,16	0,9298

Tabelle 6:

Verzweigungsstruktur der MSN: mittlere Anzahl der Dendriten/Ordnung; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* *p* > 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			<i>p</i> -Wert
Ordnungsgrad	<i>M</i>	SEM	Ordnungsgrad	<i>M</i>	SEM	
1	6,0	0,17	1	5,5	0,20	0,0380 *
2	9,0	0,26	2	7,8	0,30	0,0126 *
3	10,1	0,38	3	9,8	0,44	0,6451
4	7,0	0,43	4	7,7	0,50	0,1972
5	4,6	0,34	5	4,7	0,38	0,7919
6	3,2	0,27	6	3,3	0,28	0,6850
7	2,6	0,45	7	2,3	0,45	1,0000
≥ 8	2,5	0,34	≥ 8	2,3	0,42	0,9298

Tabelle 7:

Verzweigungsstruktur der CA1-Neurone, apikaler Abschnitt: mittlere Anzahl der Endungen; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* *p* > 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)		Knockout (NECAB2-/-)		<i>p</i> -Wert
<i>M</i>	SEM	<i>M</i>	SEM	
24,1	1,60	24,3	2,07	0,4266

Tabelle 8:

Verzweigungsstruktur der CA1-Neurone, apikaler Abschnitt: mittlere Anzahl der Knotenpunkte; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* *p* > 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)		Knockout (NECAB2-/-)		<i>p</i> -Wert
<i>M</i>	SEM	<i>M</i>	SEM	
21,9	1,51	22,4	1,96	0,3715

Tabelle 9:

Verzweigungsstruktur der CA1-Neurone, apikaler Abschnitt: mittlere Dendritenlänge in μm ; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* *p* > 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)		Knockout (NECAB2-/-)		<i>p</i> -Wert
<i>M</i> [μm]	SEM [μm]	<i>M</i> [μm]	SEM [μm]	
1581,37	101,77	1483,06	131,85	0,9520

Tabelle 10:

Verzweigungsstruktur der CA1-Neurone, apikaler Abschnitt: mittlere Dendritenlänge/Ordnung; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* *p* > 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			<i>p</i> -Wert
Ordnungsgrad	<i>M</i> [μm]	SEM [μm]	Ordnungsgrad	<i>M</i> [μm]	SEM [μm]	
1	23,33	3,04	1	22,19	2,85	0,7926
2	25,31	2,78	2	22,80	2,53	0,7716
3	34,04	3,28	3	29,35	2,78	0,6415
4	29,52	2,47	4	31,35	2,16	0,3109
5	31,86	2,31	5	31,03	2,76	0,9334
6	30,53	2,41	6	32,19	3,24	0,8020
7	32,24	2,51	7	29,39	3,01	0,3728

8	35,02	2,53	8	31,29	2,89	0,3521
9	33,44	2,04	9	35,01	3,25	0,6668
10	34,58	2,32	10	27,18	3,33	0,0151*
11	34,86	2,65	11	33,55	3,05	0,7479
12	35,15	3,13	12	31,50	3,45	0,3580
13	39,34	4,25	13	31,25	4,49	0,1824
14	37,41	2,77	14	34,67	4,38	0,2203
15	36,77	3,55	15	30,66	2,79	0,3030
16	32,26	4,89	16	31,86	3,16	0,9481
17	36,93	6,95	17	36,50	4,51	0,8874
18	34,21	4,58	18	39,26	7,11	0,5511
≥ 19	44,05	4,02	≥ 19	31,75	4,36	0,0615

Tabelle 11:

Verzweigungsstruktur der CA1-Neurone, apikaler Abschnitt: mittlere Dendritenanzahl/Ordnung; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* *p* > 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			<i>p</i> -Wert
Ordnungsgrad	<i>M</i>	SEM	Ordnungsgrad	<i>M</i>	SEM	
1	1,0	0,00	1	1,0	0,00	-
2	2,1	0,05	2	2,0	0,00	0,0331
3	3,1	0,15	3	3,1	0,18	0,9706
4	3,8	0,23	4	3,6	0,27	0,6695
5	4,1	0,33	5	3,7	0,32	0,4861
6	4,2	0,30	6	3,6	0,31	0,3293
7	4,2	0,32	7	4,0	0,37	0,9619
8	4,0	0,32	8	4,0	0,35	0,7125
9	3,8	0,37	9	3,6	0,39	0,8631
10	3,8	0,37	10	3,6	0,28	0,8817
11	3,5	0,39	11	3,7	0,35	0,3750
12	3,7	0,40	12	3,4	0,24	0,7619
13	3,4	0,46	13	2,8	0,24	0,5634
14	3,1	0,46	14	2,7	0,27	0,6879
15	2,9	0,58	15	2,6	0,23	0,8396
16	2,9	0,48	16	2,6	0,25	0,9813
17	3,0	0,67	17	2,3	0,22	0,7125
18	2,4	0,26	18	2,3	0,29	0,6126
≥ 19	2,8	0,22	≥ 19	2,0	0,00	0,0171*

Tabelle 12:

Verzweigungsstruktur der CA1-Neurone, basaler Abschnitt: mittlere Anzahl der Endungen; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* *p* > 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)		Knockout (NECAB2-/-)		<i>p</i> -Wert
<i>M</i>	SEM	<i>M</i>	SEM	
18,8	1,19	18,9	1,54	0,8092

Tabelle 13:

Verzweigungsstruktur der CA1-Neurone, basaler Abschnitt: mittlere Anzahl an Knotenpunkten; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* *p* > 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)		Knockout (NECAB2-/-)		<i>p</i> -Wert
<i>M</i>	SEM	<i>M</i>	SEM	
13,9	0,98	13,3	1,27	0,7419

Tabelle 14:

Verzweigungsstruktur der CA1-Neurone, basaler Abschnitt: mittlere Dendritenlänge in μm ; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten p -Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)		Knockout (NECAB2-/-)		p -Wert
M [μm]	SEM [μm]	M [μm]	SEM [μm]	
251,15	17,51	168,94	22,68	0,0062*

Tabelle 15:

Verzweigungsstruktur der CA1-Neurone, basaler Abschnitt: mittlere Dendritenanzahl; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten p -Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)		Knockout (NECAB2-/-)		p -Wert
M	SEM	M	SEM	
4,2	0,28	5,2	0,36	0,0174*

Tabelle 16:

Verzweigungsstruktur der CA1-Neurone, basaler Abschnitt: mittlere Dendritenlänge/Ordnung; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten p -Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			p -Wert
Ordnungsgrad	M [μm]	SEM [μm]	Ordnungsgrad	M [μm]	SEM [μm]	
1	17,05	1,28	1	18,57	1,49	0,5360
2	22,78	1,71	2	21,86	1,54	0,9084
3	31,74	2,03	3	28,74	1,98	0,4688
4	33,00	2,13	4	27,18	2,12	0,0771
5	35,28	2,66	5	30,45	3,15	0,4247
6	32,14	4,16	6	22,20	4,12	0,1271
≥ 7	33,10	2,66	≥ 7	34,45	8,52	0,9563

Tabelle 17:

Verzweigungsstruktur der CA1-Neurone, basaler Abschnitt: mittlere Dendritenanzahl/Ordnung; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten p -Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			p -Wert
Ordnungsgrad	M	SEM	Ordnungsgrad	M	SEM	
1	4,2	0,29	1	5,2	0,35	0,0174*
2	6,6	0,43	2	7,8	0,60	0,0359*
3	8,5	0,53	3	7,8	0,66	0,3717
4	8,1	0,62	4	7,1	0,79	0,1565
5	5,5	0,60	5	4,9	0,63	0,6927
6	3,5	0,50	6	3,0	0,61	0,4080
≥ 7	2,5	0,24	≥ 7	2,0	0,00	0,5487

Tabelle 18:

Dichte dendritischer Spines MSN: Dendriten 3. und 4. Ordnung; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten p -Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			p -Wert
Ordnungsgrad	M [1/ μ m]	SEM [1/ μ m]	Ordnungsgrad	M [1/ μ m]	SEM [1/ μ m]	
3	1,24	0,03	3	1,47	0,04	< 0,0001*
4	1,22	0,03	4	1,42	0,04	< 0,0001*

Tabelle 19:

Dichte dendritischer Spines CA1-Neurone, apikaler Abschnitt: Dendriten 3. und 4. Ordnung; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten p -Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			p -Wert
Ordnungsgrad	M [1/ μ m]	SEM [1/ μ m]	Ordnungsgrad	M [1/ μ m]	SEM [1/ μ m]	
3	0,96	0,04	3	1,01	0,06	0,5007
4	0,99	0,05	4	1,10	0,06	0,1154

Tabelle 20:

Dichte dendritischer Spines CA1-Neurone, basaler Abschnitt: Dendriten 3. und 4. Ordnung; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten p -Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			p -Wert
Ordnungsgrad	M [1/ μ m]	SEM [1/ μ m]	Ordnungsgrad	M [1/ μ m]	SEM [1/ μ m]	
3	0,88	0,05	3	1,00	0,06	0,0326*
4	0,95	0,05	4	1,10	0,06	0,0242*

Tabelle 21:

Sholl-Analyse der MSN: mittlere Anzahl an Endungen; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten p -Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			p -Wert
Radius [μ m]	M	SEM	Radius [μ m]	M	SEM	
10	0,05	0,03	10	0,05	0,03	0,7502
20	0,71	0,10	20	0,49	0,11	0,0790
30	1,73	0,15	30	1,08	0,17	0,4020
40	2,74	0,22	40	2,38	0,25	0,1945
50	3,14	0,23	50	2,77	0,26	0,4353
60	3,19	0,24	60	3,12	0,27	0,8312
70	2,80	0,22	70	2,85	0,25	0,9954
80	2,22	0,18	80	2,37	0,20	0,6191
90	1,91	0,19	90	1,98	0,21	0,5620
100	1,45	0,15	100	1,41	0,18	0,6844
110	1,15	0,17	110	1,56	0,20	0,1424
120	1,00	0,13	120	0,72	0,15	0,2654
130	0,88	0,20	130	0,78	0,22	0,6517
140	1,04	0,19	140	0,88	0,19	0,2425
≥ 150	0,75	0,19	≥ 150	0,83	0,16	0,9633

Tabelle 22:

Sholl-Analyse der MSN: mittlere Anzahl an Knotenpunkten; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten p -Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			p-Wert
Radius [μm]	M	SEM	Radius [μm]	M	SEM	
10	0,47	0,07	10	0,26	0,08	0,1159
20	3,98	0,20	20	3,85	0,23	0,5141
30	4,42	0,24	30	4,05	0,28	0,1801
40	2,73	0,20	40	2,91	0,23	0,4277
50	1,60	0,16	50	1,88	0,18	0,3881
60	0,93	0,10	60	0,83	0,12	0,9041
70	0,47	0,08	70	0,58	0,09	0,5742
80	0,33	0,06	80	0,33	0,07	0,2323
90	0,08	0,04	90	0,08	0,04	0,9584
100	0,08	0,04	100	0,08	0,04	0,5006
110	0,06	0,02	110	0,00	0,03	0,4640
120	0,00	0,02	120	0,06	0,03	0,1077
130	0,00	0,00	130	0,00	0,00	-
140	0,00	0,03	140	0,00	0,03	0,3173
≥ 150	0,00	0,00	≥ 150	0,00	0,00	-

Tabelle 23:

Sholl-Analyse der MSN: mittlere Dendritenlänge in μm ; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten p-Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			p-Wert
Radius [μm]	M [μm]	SEM [μm]	Radius [μm]	M [μm]	SEM [μm]	
10	13,87	0,87	10	11,06	1,00	0,0739
20	111,67	3,47	20	98,04	3,99	0,0128*
30	174,14	5,52	30	158,47	6,35	0,0645
40	190,82	6,31	40	183,82	7,26	0,5315
50	170,27	6,90	50	177,40	7,93	0,2944
60	139,82	6,86	60	144,08	7,89	0,4614
70	107,89	6,67	70	115,61	7,63	0,3260
80	80,58	6,24	80	81,93	7,05	0,9123
90	57,32	5,37	90	59,03	6,05	0,9417
100	37,36	4,32	100	44,66	5,16	0,2059
110	32,12	3,99	110	33,78	4,61	0,4258
120	25,04	3,33	120	27,42	3,76	0,4189
130	19,48	3,03	130	25,10	3,29	0,1881
140	17,25	3,20	140	16,24	3,20	0,5430
≥ 150	12,39	2,32	≥ 150	11,63	1,92	0,4099

Tabelle 24:

Sholl-Analyse der MSN: mittlere Anzahl an Schnittpunkten mit den Shollspären; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten p-Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			p-Wert
Radius [μm]	M	SEM	Radius [μm]	M	SEM	
10	5,07	0,17	10	4,31	0,20	0,0065*
20	10,36	0,31	20	9,45	0,36	0,0460*
30	13,21	0,41	30	12,89	0,47	0,6137
40	13,28	0,46	40	13,42	0,53	0,6646
50	11,62	0,48	50	12,22	0,56	0,2272
60	9,28	0,51	60	9,94	0,59	0,3199
70	7,12	0,49	70	7,58	0,56	0,4710
80	5,33	0,47	80	5,48	0,53	0,8339
90	3,64	0,37	90	3,65	0,42	0,6718
100	2,43	0,31	100	2,98	0,37	0,2116
110	1,95	0,26	110	1,95	0,30	0,5047
120	1,46	0,24	120	1,83	0,28	0,3476
130	1,28	0,22	130	1,67	0,24	0,1552
140	0,63	0,22	140	1,00	0,22	0,1874

≥150	0,60	0,21	≥150	0,72	0,17	0,9639
------	------	------	------	------	------	--------

Tabelle 25:

Sholl-Analyse der CA1-Neurone, apikaler Abschnitt: mittlere Anzahl an Endungen; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* *p* > 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			<i>p</i> -Wert
Radius [μm]	<i>M</i>	SEM	Radius [μm]	<i>M</i>	SEM	
20	0,04	0,03	20	0,04	0,04	0,8845
40	0,77	0,16	40	0,57	0,17	0,3489
60	1,89	0,30	60	1,57	0,27	0,6617
80	2,91	0,32	80	2,96	0,33	0,7264
100	2,81	0,37	100	2,89	0,36	0,5234
120	3,17	0,41	120	3,17	0,51	0,9823
140	2,68	0,25	140	2,54	0,46	0,3526
160	2,16	0,33	160	2,29	0,30	0,3088
180	1,80	0,25	180	1,96	0,30	0,5560
200	1,70	0,24	200	1,61	0,27	0,9074
220	1,68	0,25	220	1,88	0,31	0,5394
240	1,29	0,20	240	1,08	0,22	0,5461
260	0,81	0,15	260	1,15	0,22	0,2468
280	0,81	0,19	280	1,18	0,26	0,1797
300	0,65	0,21	300	0,44	0,18	0,8100
320	0,94	0,20	320	0,56	0,24	0,2483
340	1,25	0,30	340	0,86	0,26	0,5358
≥ 360	0,73	0,19	≥ 360	0,83	0,17	0,7325

Tabelle 26:

Sholl-Analyse der CA1-Neurone, apikaler Abschnitt: mittlere Anzahl an Knotenpunkten; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* *p* > 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			<i>p</i> -Wert
Radius [μm]	<i>M</i>	SEM	Radius [μm]	<i>M</i>	SEM	
20	0,36	0,09	20	0,36	0,11	0,8596
40	2,66	0,42	40	2,29	0,32	0,7983
60	4,00	0,57	60	3,54	0,41	0,7182
80	3,53	0,33	80	3,71	0,44	0,7379
100	2,43	0,27	100	2,71	0,36	0,4213
120	1,91	0,22	120	2,50	0,35	0,1730
140	1,89	0,24	140	2,00	0,26	0,4788
160	1,69	0,20	160	1,54	0,21	0,8881
180	1,11	0,16	180	1,11	0,20	0,9087
200	0,53	0,13	200	0,75	0,13	0,0963
220	0,66	0,16	220	0,88	0,17	0,1340
240	0,66	0,14	240	0,46	0,12	0,4709
260	0,41	0,11	260	0,25	0,12	0,2907
280	0,42	0,16	280	0,36	0,20	0,9660
300	0,35	0,15	300	0,56	0,24	0,3542
320	0,59	0,17	320	0,11	0,11	0,0667
340	0,08	0,08	340	0,43	0,20	0,2614

Tabelle 27:

Sholl-Analyse der CA1-Neurone, apikaler Abschnitt: mittlere Dendritenlänge; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* *p* > 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			<i>p</i> -Wert
Radius [μm]	<i>M</i> [μm]	SEM [μm]	Radius [μm]	<i>M</i> [μm]	SEM [μm]	
20	17,68	1,34	20	13,54	1,24	0,0131*
40	93,46	13,41	40	82,31	9,36	0,8954

60	181,50	21,31	60	153,23	14,66	0,6455
80	224,08	21,16	80	213,03	18,79	0,9128
100	195,59	18,45	100	193,63	21,31	0,9651
120	169,97	14,88	120	165,26	20,71	0,5616
140	150,29	12,52	140	151,84	15,67	0,6376
160	134,29	13,24	160	129,22	11,16	0,6097
180	110,83	11,21	180	112,28	11,14	0,6482
200	91,78	9,32	200	81,96	9,20	0,6633
220	70,95	8,16	220	67,27	5,35	0,5034
240	58,07	5,97	240	47,53	5,72	0,2941
260	49,15	5,75	260	36,87	6,71	0,1640
280	44,36	7,17	280	51,25	12,08	0,3352
300	44,91	8,76	300	48,20	7,66	0,2996
320	49,25	9,25	320	29,04	6,92	0,1548
340	35,63	10,13	340	26,84	6,97	0,9018
≥ 360	27,72	5,02	≥ 360	25,88	5,97	0,5249

Tabelle 28:

Sholl-Analyse der CA1-Neurone, apikaler Abschnitt: mittlere Anzahl an Schnittpunkten mit den Shollsphären; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* *p* > 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			<i>p</i> -Wert
Radius [μm]	<i>M</i>	SEM	Radius [μm]	<i>M</i>	SEM	
20	1,74	0,19	20	1,32	0,09	0,4156
40	4,55	0,67	40	3,89	0,43	0,9779
60	7,04	0,70	60	6,29	0,47	0,8127
80	8,17	0,75	80	7,43	0,72	0,7920
100	7,13	0,59	100	7,13	0,85	0,6839
120	5,89	0,45	120	6,11	0,72	0,9737
140	5,32	0,46	140	5,36	0,50	0,9578
160	4,49	0,42	160	4,82	0,43	0,3306
180	4,05	0,41	180	3,82	0,42	0,9116
200	3,07	0,33	200	2,89	0,34	0,9377
220	2,29	0,26	220	2,12	0,24	0,8079
240	1,66	0,19	240	1,58	0,24	0,8574
260	1,44	0,20	260	1,10	0,28	0,2256
280	1,31	0,23	280	1,18	0,26	0,9856
300	1,40	0,28	300	1,56	0,24	0,3715
320	1,59	0,31	320	0,89	0,20	0,1825
340	0,67	0,28	340	0,67	0,36	0,9671
≥ 360	0,55	0,16	≥ 360	0,55	0,22	0,9612

Tabelle 29:

Sholl-Analyse der CA1-Neurone, basaler Abschnitt: mittlere Anzahl an Endungen; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten *p*-Wertes (* *p* > 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			<i>p</i> -Wert
Radius [μm]	<i>M</i>	SEM	Radius [μm]	<i>M</i>	SEM	
20	0,60	0,13	10	0,75	0,17	0,3540
40	3,00	0,32	20	3,86	0,41	0,1721
60	5,00	0,44	30	5,54	0,57	0,3369
80	4,61	0,56	40	4,63	0,71	0,7110
100	3,35	0,48	50	3,72	0,69	0,4244
120	3,07	0,38	60	2,54	0,58	0,5598
≥ 140	1,49	0,23	70	2,38	0,55	0,1446

Tabelle 30:

Sholl-Analyse der CA1-Neurone, basaler Abschnitt: mittlere Anzahl an Knotenpunkten; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten p -Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			p -Wert
Radius [μm]	M	SEM	Radius [μm]	M	SEM	
20	3,66	0,29	10	3,79	0,38	0,6210
40	6,26	0,50	20	6,96	0,65	0,3459
60	2,70	0,32	30	1,82	0,42	0,0963
80	0,77	0,21	40	0,63	0,27	0,7942
100	0,27	0,09	50	0,17	0,13	0,6419
120	0,40	0,13	60	0,00	0,20	0,0422*
≥ 140	0,11	0,04	70	0,00	0,10	0,3377

Tabelle 31:

Sholl-Analyse der CA1-Neurone, basaler Abschnitt: mittlere Dendritenlänge in μm ; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des ermittelten p -Wertes (* $p > 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			p -Wert
Radius [μm]	M [μm]	SEM [μm]	Radius [μm]	M [μm]	SEM [μm]	
20	91,92	5,13	10	98,24	6,65	0,3136
40	265,47	16,38	20	283,07	21,22	0,4971
60	262,86	22,66	30	237,57	29,36	0,5505
80	181,33	21,04	40	142,06	26,85	0,1325
100	123,69	17,42	50	98,23	24,98	0,3892
120	79,38	12,73	60	59,27	19,34	0,4199
≥ 140	35,13	4,67	70	21,04	11,32	0,2326

Tabelle 32:

Sholl-Analyse der CA1-Neurone, basaler Abschnitt: mittlere Anzahl an Schnittpunkten mit den Shollspähren; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und des

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			p -Wert
Radius [μm]	M	SEM	Radius [μm]	M	SEM	
20	8,02	0,55	10	8,75	0,52	0,0930
40	11,45	0,86	20	11,71	0,91	0,6486
60	9,11	0,98	30	8,14	1,27	0,4825
80	5,70	0,86	40	4,30	1,00	0,1662
100	3,76	0,58	50	2,89	0,78	0,3319
120	1,90	0,40	60	1,46	0,63	0,4500
≥ 140	0,87	0,17	70	0,13	0,13	0,0265*

Tabelle 33:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichte von [^3H]MK-801 in nCi/g im Hippocampus mit den Regionen CA1, CA3 und DG mit jeweiliger Schichtaufteilung; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten p -Wertes (OR: Stratum oriens; RAD: Stratum radiatum; PYR: Stratum pyramidale; MOL: Stratum moleculare; GR: Stratum granulosum; * $p < 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	p -Wert
Region	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Region	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
CA1 OR	51.925,74	2.184,37	CA1 OR	56.253,75	1.406,36	4.328,00	8,34	2,7	0,4481
CA1 RAD	58.739,63	2.702,22	CA1 RAD	65.089,75	1.772,08	6.350,10	12,23	3,01	0,0351*
CA1 PYR	29.396,37	1.941,11	CA1 PYR	31.318,85	1.334,06	1.922,50	3,70	4,53	0,2857
CA3 OR	32.668,05	1.224,86	CA3 OR	32.901,10	876,33	233,00	0,45	2,68	0,8661
CA3 RAD	33.915,89	1.525,84	CA3 RAD	37.563,50	796,20	3.647,60	7,02	2,34	0,0815
CA3 PYR	12.654,37	530,75	CA3 PYR	13.493,10	459,24	838,70	1,62	3,62	0,2382

DG MOL	48.480,29	710,85	DG MOL	51.868,46	1.517,86	3.388,20	6,53	3,13	0,0482*
DG GR	15.170,18	543,09	DG GR	15.046,96	552,68	-123,20	-0,24	3,64	0,8743

Tabelle 34:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichte von [³H]AMPA in nCi/g im Hippocampus mit den Regionen CA1, CA3 und DG mit jeweiliger Schichtaufteilung; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten *p*-Wertes (OR: Stratum oriens; RAD: Stratum radiatum; PYR: Stratum pyramidale; MOL: Stratum moleculare; GR: Stratum granulosum; * *p* < 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	<i>p</i> -Wert
Region	<i>M</i> [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Region	<i>M</i> [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
CA1 OR	86.938,06	4.212,94	CA1 OR	91.867,16	3.966,85	4.929,10	5,67	4,56	0,4002
CA1 RAD	100.648,41	7.240,69	CA1 RAD	109.487,84	6.426,43	8.839,40	10,17	6,39	0,3031
CA1 PYR	102.303,76	6.742,14	CA1 PYR	113.611,89	6.773,48	11.308,10	13,01	6,20	0,1095
CA3 OR	81.284,25	3.673,78	CA3 OR	82.938,42	3.826,87	1.654,20	1,90	4,71	0,7568
CA3 RAD	71.521,35	5.049,42	CA3 RAD	77.732,32	4.660,99	6.211,00	7,14	6,52	0,3732
CA3 PYR	62.482,35	4.776,09	CA3 PYR	71.308,05	4.422,84	8.825,70	10,15	7,08	0,1845
DG MOL	95.935,76	4.297,27	DG MOL	99.660,63	4.485,95	3.724,90	4,28	4,68	0,6945
DG GR	51.675,71	3.570,48	DG GR	49.391,84	3.896,97	-2.283,90	-2,63	7,54	0,6675

Tabelle 35:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichte von [³H]Muscimol in nCi/g im Hippocampus mit den Regionen CA1, CA3 und DG mit jeweiliger Schichtaufteilung; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten *p*-Wertes (OR: Stratum oriens; RAD: Stratum radiatum; PYR: Stratum pyramidale; MOL: Stratum moleculare; GR: Stratum granulosum; * *p* < 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	<i>p</i> -Wert
Region	<i>M</i> [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Region	<i>M</i> [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
CA1 OR	23.449,42	1.096,24	CA1 OR	27.093,94	1.255,41	3.644,50	15,54	5,35	0,0350*
CA1 RAD	24.485,74	1.188,89	CA1 RAD	27.378,18	609,67	2.892,40	12,33	2,48	0,0442*
CA1 PYR	23.607,84	1.095,38	CA1 PYR	27.200,88	800,35	3.593,00	15,32	3,39	0,0061*
CA3 OR	12.756,60	663,84	CA3 OR	13.178,12	318,75	421,50	1,80	2,49	0,4106
CA3 RAD	14.356,90	808,58	CA3 RAD	15.324,35	680,60	967,50	4,13	4,74	0,3760
CA3 PYR	8.334,85	620,76	CA3 PYR	8.601,47	243,81	266,60	1,14	2,92	0,2346
DG MOL	32.224,45	1.251,76	DG MOL	33.633,40	656,62	1.409,00	6,01	2,03	0,3252
DG GR	14.300,55	620,14	DG GR	13.098,30	535,03	-1.202,30	-5,13	3,74	0,1504

Tabelle 36:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichten von [3H]MK-801, [3H]AMPA und [3H]Muscimol in nCi/g im Caudoputamen; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten *p*-Wertes (* *p* < 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	<i>p</i> -Wert
Ligand	<i>M</i> [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Ligand	<i>M</i> [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
[³ H]MK-801	12.488,3	405,01	[³ H]MK-801	12.753,2	277,49	264,90	2,12	2,22	0,5925
[³ H]AMPA	46.938,2	2.259,65	[³ H]AMPA	46.003,0	1.217,81	-935,20	-1,99	2,59	0,6707
[³ H]Muscimol	18.142,0	405,29	[³ H]Muscimol	17.735,2	406,98	-406,80	-2,24	2,24	0,9813

Tabelle 37:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichte von [³H]MK-801 in nCi/g im Areal M1 mit Schichtaufteilung in I, II/III (zusammengefasst), IV, V, VI; Darstellung als Mittelwerte (*M*) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten *p*-Wertes (* *p* < 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	p-Wert
Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
I	22.675,50	790,06	I	29.084,56	1.317,28	6.409,10	28,26	5,80	0,0007*
II/III	25.227,67	876,68	II/III	28.071,06	719,85	2.843,40	12,54	2,85	0,0197*
IV	21.926,40	1.162,66	IV	24.056,69	770,90	2.130,30	9,39	3,51	0,3230
V	18.836,00	743,73	V	20.619,94	674,31	1.783,90	7,87	3,57	0,0854
VI	12.835,07	733,14	VI	13.972,25	598,28	1.137,20	5,02	4,66	0,2366

Tabelle 38:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichte von [³H]AMPA in nCi/g im Areal M1 mit Schichtaufteilung in I, II/III (zusammengefasst), IV, V, VI; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten p-Wertes (* p < 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	p-Wert
Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
I	58.659,36	6.895,03	I	70.118,73	6.637,31	11.459,40	19,54	11,31	0,1832
II/III	54.648,80	4.571,81	II/III	61.061,00	4.930,29	6.412,20	10,93	9,02	0,3489
IV	49.569,27	3.912,69	IV	50.627,62	2.883,79	1.058,30	1,80	5,81	0,8338
V	41.104,00	2.838,56	V	47.904,00	2.800,43	6.800,00	11,59	6,81	0,1021
VI	32.800,27	1.810,46	VI	38.382,31	1.469,38	5.582,00	9,52	4,79	0,0269*

Tabelle 39:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichte von [³H]Muscimol in nCi/g im Areal M1 mit Schichtaufteilung in I, II/III (zusammengefasst), IV, V, VI; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten p-Wertes (* p < 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	p-Wert
Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
I	29.807,00	2.249,93	I	30.439,47	1.785,34	632,50	2,12	5,89	0,8249
II/III	37.534,06	1.598,31	II/III	40.012,21	1.628,17	2.478,20	8,31	4,33	0,2871
IV	30.197,63	1.392,11	IV	36.000,68	1.508,42	5.803,10	19,47	4,99	0,0088*
V	25.212,25	1.197,03	V	27.472,21	955,70	2.260,00	7,58	3,79	0,1448
VI	15.376,19	673,78	VI	15.679,32	843,31	303,10	1,02	5,48	0,8685

Tabelle 40:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichte von [³H]MK-801 in nCi/g im Areal S1 Tr mit Schichtaufteilung in I, II/III (zusammengefasst), IV, V, VI; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten p-Wertes (* p < 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	p-Wert
Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
I	23.352,75	2.061,93	I	23.760,30	1.715,50	407,50	1,75	7,34	0,2829
II/III	29.614,08	2.754,89	II/III	27.103,18	960,02	-2.510,90	-10,75	3,24	0,8201
IV	25.962,46	2.182,79	IV	25.139,73	983,71	-822,70	-3,52	3,78	0,9547
V	25.233,77	1.664,62	V	22.477,18	1.118,77	-2.756,60	-11,80	4,43	0,1500
VI	19.875,31	1.175,05	VI	17.420,45	930,39	-2.452,90	-10,51	4,68	0,1191

Tabelle 41:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichte von [³H]AMPA in nCi/g im Areal S1 Tr mit Schichtaufteilung in I, II/III (zusammengefasst), IV, V, VI; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten p-Wertes (* p < 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	p-Wert
Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
I	49.578,50	6.661,65	I	37.839,78	5.503,71	-11.738,70	-23,68	11,10	0,1977
II/III	57.690,00	5.046,70	II/III	65.882,89	6.351,36	8.192,90	16,53	11,00	0,3195
IV	49.979,36	5.097,31	IV	55.176,78	4.821,26	5.197,40	10,48	9,64	0,4755
V	45.173,91	3.282,56	V	54.084,78	4.320,21	8.910,90	17,97	9,56	0,1117
VI	34.830,30	2.496,91	VI	40.710,89	3.808,11	5.880,60	11,86	10,90	0,2053

Tabelle 42:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichte von [³H]Muscimol in nCi/g im Areal S1 Tr mit Schichtaufteilung in I, II/III (zusammengefasst), IV, V, VI ; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten p-Wertes (* p < 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	p-Wert
Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
I	21.686,43	3.210,67	I	28.219,14	1.996,97	6.532,70	30,12	9,20	0,1097
II/III	27.853,13	2.337,71	II/III	33.883,00	1.397,78	6.029,90	27,80	5,01	0,0281*
IV	24.002,63	1.737,72	IV	33.430,25	2.275,52	9.427,60	43,47	9,48	0,0053*
V	23.733,50	1.450,98	V	27.863,13	1.143,22	4.129,60	19,04	4,81	0,0379*
VI	17.804,50	1.376,66	VI	19.575,75	1.641,04	1.771,30	8,17	9,21	0,4222

Tabelle 43:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichte von [³H]MK-801 in nCi/g im Areal S1 Bf mit Schichtaufteilung in I, II/III (zusammengefasst), IV, V, VI; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten p-Wertes (* p < 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	p-Wert
Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
I	26.527,47	1.947,16	I	23.441,50	940,13	-3.086,00	-11,63	3,54	0,3118
II/III	27.314,26	3.006,11	II/III	25.045,40	614,05	-2.268,90	-8,55	2,24	0,0918
IV	25.474,00	2.166,36	IV	22.386,05	743,03	-3.088,00	-11,64	2,91	0,1032
V	19.626,11	1.644,55	V	19.051,90	442,21	-574,20	-2,16	2,25	0,3254
VI	16.444,79	1.119,14	VI	15.386,25	490,51	-1.058,50	-3,99	2,98	0,9552

Tabelle 44:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichte von [³H]AMPA in nCi/g im Areal S1 Bf mit Schichtaufteilung in I, II/III (zusammengefasst), IV, V, VI; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten p-Wertes (* p < 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	p-Wert
Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
I	58.788,00	3.395,41	I	57.022,76	3.566,11	-1.765,20	-3,00	6,06	0,7228
II/III	47.860,38	3.169,01	II/III	58.262,22	3.300,39	10.401,80	17,69	6,89	0,0293*
IV	37.188,24	1.934,67	IV	38.918,61	1.759,33	1.730,40	2,94	4,73	0,5179
V	38.489,05	2.244,85	V	44.818,39	2.163,73	6.329,30	10,77	5,62	0,0516
VI	35.033,67	1.874,74	VI	38.723,22	1.682,19	3.689,60	6,28	4,80	0,1572

Tabelle 45:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichte von [³H]Muscimol in nCi/g im Areal S1 Bf mit Schichtaufteilung in I, II/III (zusammengefasst), IV, V, VI ; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten p-

Wertes (* p < 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	p-Wert
Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
I	29.882,10	1.404,47	I	31.877,84	1.586,84	1.995,70	6,68	5,31	0,3512
II/III	40.923,40	1.588,25	II/III	43.000,63	1.341,68	2.077,20	6,95	3,27	0,3266
IV	32.522,30	1.659,54	IV	35.496,11	1.709,07	2.973,80	9,95	5,25	0,2197
V	24.940,75	884,49	V	25.423,45	850,03	482,70	1,62	3,40	0,6962
VI	18.235,35	788,19	VI	19.062,05	620,38	826,70	2,77	3,40	0,4183

Tabelle 46:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichte von [³H]MK-801 in nCi/g im Areal S2 mit Schichtaufteilung in I, II/III (zusammengefasst), IV, V, VI; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten p-Wertes (* p < 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	p-Wert
Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
I	23.790,42	2.275,50	I	23.560,55	1.264,44	-229,90	-0,97	5,31	0,3269
II/III	27.929,37	2.754,37	II/III	26.784,82	841,99	-1.144,60	-4,81	3,01	0,0530
IV	27.624,26	2.718,60	IV	25.020,91	580,74	-2.603,40	-10,94	2,10	0,7737
V	21.626,74	1.482,83	V	19.736,36	797,20	-1.890,40	-7,95	3,68	0,8343
VI	17.072,32	962,15	VI	15.493,45	722,25	-1.578,90	-6,64	4,23	0,1902

Tabelle 47:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichte von [³H]AMPA in nCi/g im Areal S2 mit Schichtaufteilung in I, II/III (zusammengefasst), IV, V, VI; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten p-Wertes (* p < 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	p-Wert
Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
I	57.796,94	4.421,72	I	54.307,95	2.949,66	-3.489,00	-6,04	5,10	0,5051
II/III	57.016,28	4.026,44	II/III	66.668,00	3.850,76	9.651,70	16,70	6,75	0,0923
IV	42.329,61	2.438,15	IV	51.850,62	2.567,54	9.521,00	16,47	6,06	0,0122*
V	44.555,56	2.897,25	V	53.363,19	2.609,86	8.807,60	15,24	5,85	0,0296*
VI	39.116,06	2.067,52	VI	45.033,43	1.850,44	5.917,40	10,24	4,73	0,0392*

Tabelle 48:

Darstellung der spezifischen Ligandenbindungsichte von [³H]Muscimol in nCi/g im Areal S2 mit Schichtaufteilung in I, II/III (zusammengefasst), IV, V, VI; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der Ligandenbindungsichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten p-Wertes (* p < 0,05).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ [nCi/g]	Δ [%]	SEM [%]	p-Wert
Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]	Schicht	M [nCi/g]	SEM [nCi/g]				
I	29.784,95	1.761,06	I	33.149,63	1.462,82	3.364,70	11,30	4,91	0,1503
II/III	41.757,75	1.082,81	II/III	44.263,05	969,24	2.505,30	8,41	2,32	0,0942
IV	36.082,00	1.587,73	IV	38.825,37	1.806,53	2.743,40	9,21	5,00	0,2601
V	27.078,75	909,91	V	28.688,11	642,08	1.609,40	5,40	2,37	0,1607
VI	18.913,50	539,19	VI	20.776,47	877,31	1.863,00	6,25	4,63	0,0753

Tabelle 49:

Darstellung der optischen Dichte von MAP2 im Hippocampus mit den Regionen CA1, CA3 und DG mit jeweiliger Schichtaufteilung; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter

prozentualer Abweichung der optischen Dichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten p -Wertes (Darstellung nur der dendritischen Schichten: OR: Stratum oriens; RAD: Stratum radiatum; MOL: Stratum moleculare; * $p < 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ	Δ [%]	SEM [%]	p -Wert
Region	M	SEM	Region	M	SEM				
CA1 OR	0,4159	0,0324	CA1 OR	0,4996	0,0274	0,0837	19,53	6,59	0,0680
CA1 RAD	0,4764	0,0321	CA1 RAD	0,5744	0,0226	0,0981	22,89	4,75	0,0258*
CA3 OR	0,4882	0,0321	CA3 OR	0,5174	0,0376	0,0292	6,81	7,70	0,5610
CA3 RAD	0,5551	0,0371	CA3 RAD	0,5911	0,0372	0,0360	8,41	6,70	0,5030
DG MOL	0,4856	0,0361	DG MOL	0,5419	0,0276	0,0563	13,15	5,67	0,0535

Tabelle 50:

Darstellung der optischen Dichte von **Synaptobrevin** im Hippocampus mit den Regionen CA1, CA3 und DG mit jeweiliger Schichtaufteilung; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der optischen Dichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten p -Wertes (Darstellung nur der dendritischen Schichten; OR: Stratum oriens; RAD: Stratum radiatum; MOL: Stratum moleculare; * $p < 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ	Δ [%]	SEM [%]	p -Wert
Region	M	SEM	Region	M	SEM				
CA1 OR	0,1451	0,0116	CA1 OR	0,1771	0,0100	0,0320	22,05	6,90	0,0515
CA1 RAD	0,1323	0,0105	CA1 RAD	0,1635	0,0100	0,0313	21,56	7,55	0,0451*
CA3 OR	0,1797	0,0210	CA3 OR	0,2163	0,0170	0,0366	25,21	9,48	0,1935
CA3 RAD	0,1261	0,0192	CA3 RAD	0,1559	0,0163	0,0298	20,51	12,90	0,2523
DG MOL	0,0969	0,0098	DG MOL	0,1370	0,0128	0,0401	27,64	13,20	0,0228*

Tabelle 51:

Darstellung der optischen Dichte von **Synaptophysin** im Hippocampus mit den Regionen CA1, CA3 und DG mit jeweiliger Schichtaufteilung; Darstellung als Mittelwerte (M) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechneter Differenz zwischen Wildtyp und Knockout (Δ) und berechneter prozentualer Abweichung der optischen Dichte (Δ [%]) und des SEM ([%]) des Knockouts vom Wildtyp sowie des ermittelten p -Wertes (Darstellung nur der dendritischen Schichten; OR: Stratum oriens; RAD: Stratum radiatum; MOL: Stratum moleculare; * $p < 0,05$).

Wildtyp (NECAB2+/+)			Knockout (NECAB2 -/-)			Δ	Δ [%]	SEM [%]	p -Wert
Region	M	SEM	Region	M	SEM				
CA1 OR	0,4284	0,0272	CA1 OR	0,5126	0,0215	0,0843	19,67	5,01	0,0257*
CA1 RAD	0,4277	0,0261	CA1 RAD	0,5196	0,0253	0,0919	21,44	5,90	0,0217*
CA3 OR	0,4880	0,0321	CA3 OR	0,5577	0,0314	0,0696	16,26	6,43	0,1385
CA3 RAD	0,4112	0,0303	CA3 RAD	0,4745	0,0332	0,0633	14,77	8,07	0,1766
DG MOL	0,2896	0,0191	DG MOL	0,4019	0,0336	0,1123	26,21	11,59	0,0094*