

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

Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten GluN2A und GluN2B im Gehirn von
Mäusen

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

Mariel Hanna Braunbeck
aus Stuttgart

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

[REDACTED]

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
Abbildungsverzeichnis	v
1. Einleitung	1
2. Literaturdiskussion	2
2.1 Hirnregionen	2
2.1.1 Hippocampus.....	2
2.1.2 Corpus Striatum	3
2.1.3 Primärer somatosensorischer Cortex	5
2.2 NMDA-Rezeptoren.....	6
2.2.1 Aufbau	6
2.2.2 Entwicklung	8
2.2.3 Lokalisation.....	9
2.2.4 Eigenschaften	11
2.2.5 Triheteromere NMDA-Rezeptoren	14
2.2.6 Erkrankungen	15
2.3 Ziel der Studie	17
3. Material und Methoden	20
3.1 Versuchstiere	20
3.2 Virusapplikation	21
3.3 Lösungen	22
3.3.1 Sucrose-Lösung	22
3.3.2 Extrazelluläre Lösung	22
3.3.3 Intrazelluläre Lösungen	23
3.3.4 Zusätze zur extrazellulären Lösung	24
3.4 Herstellung der Hirnschnitte.....	24
3.5 Elektrophysiologisches Setup	25
3.6. Messtechnik	26
3.6.1 NMDA/AMPA Ratios	26
3.6.2 Kurzzeitplastizität (Paired-Pulse Ratio)	27
3.6.3 Messung der kleinen exzitatorischen postsynaptischen Ströme	27
3.6.4 Signalabfallzeit (Decay)	27
3.6.5 Aktionspotenziale und Feuerverhalten.....	28
3.7 Statistik.....	28

4. Ergebnisse	29
4.1 Synaptische Expression der GluN2A-Untereinheit in Hippocampus, Striatum und somatosensorischem Cortex	29
4.1.1 NMDA/AMPA Ratio	30
4.1.2 mEPSCs	32
4.1.3 Paired-Pulse Ratio	35
4.1.4 NMDA-Rezeptor Kinetik (Decay)	37
4.2 Deletion der GluN1-Untereinheit über Cre-Rekombinase Expression	39
5. Diskussion	43
5.1 Methodik der Untersuchung von NMDA-Rezeptoren	44
5.2 Synaptische Expression der GluN2A-Untereinheit	46
5.2.1 Synaptische Expression der GluN2A-Untereinheit im Hippocampus	47
5.2.2 Synaptische Expression der GluN2A-Untereinheit im Striatum	49
5.2.3 Synaptische Expression der GluN2A-Untereinheit im somatosensorischen Cortex	49
5.3 Veränderung der Kinetiken in der konditionierten GluN2A-Knockout-Maus	50
5.4 Triheteromere NMDA-Rezeptoren	52
5.5 Einfluss der GluN2A-Untereinheit auf mEPSC	53
6. Zusammenfassung	56
7. Literaturverzeichnis	iv
8. Danksagung	xvi
9. Lebenslauf von Mariel Hanna Braunbeck	xvii

Abkürzungsverzeichnis

APV	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
CA	Cornu Ammonis
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CTD	Carboxyl-terminal-domain
Decay	Signalabfallzeit
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GluN2A ^{fl/fl}	Mit rekombinanten adenoassoziierten Viren infizierte Neurone, die die GluN2A-Untereinheit nicht ausbilden
LBD	Ligand-binding-domain
mEPSC	miniature Excitatory-Postsynaptic Current
NTD	N-terminal-domain
rAAV	Rekombinante adenoassoziierte Viren
Striatum	Corpus Striatum
TTX	Tetrodotoxin
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Entwicklung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten im Mausgehirn dargestellt in 3 Stadien.....	9
Abbildung 2: Versuchsaufbau	30
Abbildung 3: NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme in Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Körnerzellen des Gyrus dentatus.	31
Abbildung 4: NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme in Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Pyramidenzellen von CA1.	31
Abbildung 5: NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme in Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Stachelneuronen des Striatums.	31
Abbildung 6: NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme in Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Pyramidenzellen der Schicht 5 des somatosensorischen Cortex.	32
Abbildung 7: mEPSC Aufnahmen von adulten Körnerzellen im Gyrus dentatus von Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Mäusen.....	33
Abbildung 8: mEPSC Aufnahmen von adulten CA1 Neuronen von Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Mäusen....	34
Abbildung 9: mEPSC Aufnahmen von adulten Stachelneuronen des Striatums von Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Mäusen.....	34
Abbildung 10: mEPSC Aufnahmen von Pyramidenzellen der 5 Schicht des primären somatosensorischen Cortex von Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Mäusen.	35
Abbildung 11: Kurzzeitplastizität in Körnerzellen des Gyrus dentatus in Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Mäusen während 50 Hz Paired Pulse Stimulation..	36
Abbildung 12: Kurzzeitplastizität in CA1 Pyramidenneuronen in Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Mäusen während 50 Hz Paired Pulse Stimulation.	36
Abbildung 13: Kurzzeitplastizität der Stachelneurone des Striatums in Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Mäusen während 50 Hz Paired Pulse Stimulation.	36
Abbildung 14: Kurzzeitplastizität von Motoneuronen des primären somatosensorischen Cortex von Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Mäusen während 50 Hz Paired Pulse Stimulation.	37
Abbildung 15: NMDA-Rezeptor Decays von Körnerzellen des Gyrus dentatus von Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Mäusen.....	38
Abbildung 16: NMDA-Rezeptor Decays von Pyramidenzellen des CA1 von Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Mäusen.....	38
Abbildung 17: NMDA-Rezeptor Decays von Stachelneuronen des Striatums von Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Mäusen.....	38
Abbildung 18: NMDA-Rezeptor Decays von Pyramidenzellen der 5 Schicht des primären somatosensorischen Cortex von Wildtyp und GluN2A ^{fl/fl} Mäusen.	39
Abbildung 19: NMDA/AMPA Ratio und Kurzzeitplastizität von Körnerzellen des Gyrus dentatus in Control, GluN1 ^{fl/fl} , WT+rAAV-Cre und GluN1 ^{fl/+} +tdTomato Mäusen.....	41
Abbildung 20: Passive und aktive Membraneigenschaften der Körnerzellen des Gyrus dentatus in Control, GluN1 ^{fl/fl} , WT+rAAV-Cre und GluN1 ^{fl/+} +tdTomato Mäusen.....	42

1. Einleitung

Neben AMPA- und Kainat-Rezeptoren gehören NMDA-Rezeptoren zu der Klasse der ionotropen Glutamat-Rezeptoren. NMDA-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in vielen verschiedenen Abläufen der synaptischen Kommunikation. Vor allem sind NMDA-Rezeptoren für die Langzeitpotenzierung, die die synaptische Grundlage für Lernen und Gedächtnis darstellt, relevant. Zusätzlich wird angenommen, dass NMDA-Rezeptoren eine Rolle bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie z.B. der Chorea Huntington spielen. NMDA-Rezeptoren sind auch von klinischem Interesse, z.B. ist Memantin, ein NMDA-Rezeptorantagonist, aktuell Gegenstand der Therapie von Morbus Alzheimer.

NMDA-Rezeptoren sind Heterotetramere, die aus vier Untereinheiten bestehen. Zwei der vier Untereinheiten stellen die essenzielle GluN1-Untereinheit dar, da ohne die GluN1-Untereinheit die Rezeptoren nicht in die Membran eingebaut werden. Die verbleibenden zwei Untereinheiten bestehen aus verschiedenen Kombinationen von GluN2- und/oder GluN3-Untereinheiten. Bei den GluN2-Untereinheiten unterscheidet man GluN2A-, GluN2B-, GluN2C- und GluN2D-Untereinheiten, die sich in kinetischen als auch pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass neben Kombinationen von GluN1- und zweimal derselben GluN2-Untereinheit, sog. diheteromeren Rezeptoren, auch Rezeptoren existieren, die neben den obligatorischen GluN1-Untereinheiten zwei unterschiedliche GluN2-Untereinheiten besitzen. Diese Rezeptoren werden als triheteromere Rezeptoren bezeichnet und machen einen Großteil der Rezeptoren im Hippocampus aus. Ebenso sind sowohl diheteromere als auch triheteromere GluN3-Rezeptoren im zentralen Nervensystem zu finden.

Eine in der Wissenschaft nach heutigem Stand vorherrschende Theorie ist, dass diheteromere Rezeptoren, die die GluN2B-Untereinheit enthalten, überwiegend extrasynaptisch vorkommen und Rezeptoren, die die GluN2A-Untereinheit enthalten, vor allem innerhalb von Synapsen zu finden sind. Den extrasynaptischen GluN1/GluN2B-Rezeptoren wird in dieser Theorie eine Rolle bei der NMDA-Rezeptor-vermittelten Erregungstoxizität zugeschrieben. In meiner Dissertation analysiere ich mit elektrophysiologischen Methoden die Zusammensetzung synaptischer NMDA-Rezeptoren.

2. Literaturdiskussion

2.1 Hirnregionen

2.1.1 Hippocampus

Der Hippocampus spielt eine wichtige Rolle bei der Informationsspeicherung, Lernen und räumlicher Orientierung. (Scoville und Milner 1957; Graf und Schacter 1985; Sidman et al. 1968, Fyhn et al. 2004; Kesner und Hopkins 2006; Moser et al. 2008; Olsen et al. 2012). Er ist Teil des Vorderhirns und befindet sich im medialen Temporallappen und besteht aus dem Gyrus Dentatus (engl. Dentate Gyrus), dem Cornu Ammonis (CA), welches nochmal in CA1-3 unterschieden wird, und dem Subiculum. Anders als die meisten cerebralen Strukturen, die aus sechs Schichten bestehen, besteht der Gyrus dentatus nur aus drei Schichten – molekulare Schicht, Körnerzellschicht und dem Hilus – und das CA aus vier Schichten – *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum radiatum* and *stratum lacunosum-moleculare*. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Hippocampus dem Archicortex zugehört und es sich um eine ältere Hirnstruktur handelt. Ein weiterer Unterschied ist, dass die Zellen hier sehr kompakt liegen und nicht wie im sechsschichtigen Neocortex weit über ihre Schicht verteilt sind.

Die In- und Output Region vom Hippocampus ist der entorhinale Cortex. Eine vereinfachte Darstellung der Erregungsleitung ist der „Trisynaptic Excitatory Circuit“ der von Andersen et al. 1971 vorgestellt wurde. In diesem Modell durchläuft die Erregungsleitung drei weitere Synapsen, bevor sie wieder im entorhinalen Cortex ankommt. Die meisten exzitatorischen Signale kommen von Neuronen der zweiten Schicht des entorhinalen Cortex. Sie erregen die Körnerzellen des Gyrus dentatus über den „perforant path“, welches die Verbindung zwischen den beiden Stationen ist und in medialen und lateralen Weg unterteilt werden kann. Medial und lateral perforant path haben unterschiedliche Effekte und auch Ziele in den Neuronen. Axone des lateral perforant path erreichen z.B. eher den distalen Dendriten der Körnerzellen, wohingegen der medial perforant path eher auf proximale Dendriten projiziert. Die Körnerzellen leiten das Signal dann über ihre Axone, auch bekannt als „Moosfasern“, weiter zu den CA3 Neuronen, welche dann über die Schaffer Kollateralen die CA1 Pyramidenzellen aktivieren. Das Signal kann die Körnerzellen des Gyrus dentatus auch überspringen und gleich die CA3 oder CA1 Neuronen aktivieren (Doller und Weight 1982; Yeckel und Berger 1990). Letztlich wird das Signal von dort wieder in den entorhinalen Cortex weitergeleitet. Eine

pathologische Veränderung des Hippocampus kann zu Epilepsien oder auch zu Gedächtnisproblemen, wie im Falle des Morbus Alzheimers, führen.

Da ich meine Experimente im Hippocampus vor allem im Gyrus dentatus und CA1 durchgeführt habe, werde ich nun im Detail auf diese beiden Regionen eingehen.

Eine weitere Besonderheit des Gyrus dentatus neben seiner Dreischichtigkeit ist, dass dort selbst im adulten Gehirn Neurogenese stattfindet (Altman und Das 1965). Die Körnerzellen werden kontinuierlich erneuert und haben postnatal andere Charakteristika als reife Körnerzellen (Wang et al. 2000; Ambrogini et al. 2004). Die Neurogenese kann durch körperliche Aktivität gesteigert und durch Stress reduziert werden (Welsch 2017). Obwohl die Körnerzellen viel Input bekommen, haben sie eine außergewöhnlich geringe Feuerrate (Pernia-Andrade und Jonas 2014). Die geringe Erregbarkeit wird durch ein stark negatives Ruhepotential und eine hohe Kaliumleitfähigkeit erreicht (Brenner et al. 2005). Man schreibt ihnen aufgrund dessen auch eine Filterfunktion zu, um den Hippocampus vor Übererregung und vielleicht darauffolgender Erregungstoxizität zu schützen (Iijima et al. 1996).

CA1 wird auch Sommer's Sektor genannt, da 1880 von Sommer et al. die Beteiligung dieser Region an der Temporallappen-Epilepsie entdeckt wurde. Die Hauptzellen von CA1 sind die Pyramidenzellen, die nur wenige Kollateralen zu ihren Nachbarzellen ausbilden. CA1 Neurone projizieren nicht nur zum entorhinalen Cortex, sondern z.B. auch zum Hypothalamus, zur Amygdala und dem olfaktorischen Bulbus. Die Pyramidenzellen stehen unter starker Regulation der Korbzellen, welche durch ihre Inhibitorischen Effekte, die Cl-Leitfähigkeit erhöhen und so hyperpolarisierende Potenziale verursachen (Ali et al. 1999; Miles et al. 1996).

2.1.2 Corpus Striatum

Das Corpus Striatum (kurz Striatum) ist Teil der Basalganglien und wird dem Großhirn zu geordnet. Seinen Namen „Streifenkörper“ verdankt es den Fasern, der Capsula interna, die das Striatum auf ihrem Weg vom Cortex zum Thalamus durchqueren und so eine weiß-schwarze Streifung erzeugen. Das Striatum kann in zwei Teile unterteilt werden, Putamen und den Nucleus caudatus, welche, obwohl durch das Einwachsen der Capsula interna zwar räumlich getrennt, funktionell gleich sind. Jedoch ist diese Aufteilung nicht im Gehirn von Mäusen zu finden. Histologisch besteht das Striatum aus zwei Komponenten: der Matrix (85%) und den Striosomen, die wie kleine Felder in die Matrix eingelagert sind. Matrix und

Striosomen unterscheiden sich sowohl in ihrer Faserverbindung als auch in ihrer Funktion (Trepel 2017). Das Striatum ist eine wichtige Schaltstelle im extrapyramidalmotorischen System und bildet die Eingangsstation der Basalganglien (Gerfen und Surmeier 2011; Jin und Costa 2015). Ebenfalls spielt es eine wichtige Rolle bei Motivation, Emotion und Kognition. Seinen Input bekommt das Striatum über die exzitatorischen glutamatergen Fasern des Cortex und den sowohl exzitatorischen als auch inhibitorischen dopaminergen Fasern der Substantia nigra. Es wirkt dann mit seinen Axonen mit Hilfe des Neurotransmitters Gamma-Aminobuttersäure (GABA) inhibitorisch auf das Pallidum und auf die Substantia nigra.

Der häufigste Zelltyp mit ca. 95% des Striatums sind die mittelgroßen dornentragenden Projektionsneurone, die auch Stachelneurone genannt werden. Der Haupttransmitter der Stachelneurone ist GABA, wobei Substanz P und Enkephalin als Kotransmitter verwendet werden. Diese Stachelneurone können nochmal in zwei Subgruppen „die direkt projizierenden Neurone“ und „die indirekt projizierenden Neurone“ unterschieden werden, die sich in ihrem Projektionsziel, ihren Dopaminrezeptoren und den Neurotransmittern unterscheiden (Gerfen und Surmeier 2011; Le Moine et al. 1991; Onn et al. 1994; Plotkin und Goldberg 2018; Smith et al. 2016). Die direkt projizierenden Neurone erregen direkt Strukturen außerhalb der Basalganglien, exprimieren die exzitatorischen Dopaminrezeptoren (D1) und produzieren Substanz P, wohingegen die indirekt projizierenden Neurone auf Strukturen innerhalb der Basalganglien projizieren, inhibitorische Dopaminrezeptoren (D2) exprimieren und als Co-Transmitter Enkephalin produzieren (Gerfen und Surmeier 2011; Gerfen et al. 1990; Kravitz et al. 2012; Kreitzer 2009). Die direkt projizierenden Neurone desinhibieren den Thalamus und fördern damit Bewegung, wohingegen die indirekt projizierenden Neurone den gegenteiligen Effekt haben und Bewegung inhibieren (Prager und Plotkin 2019). Bei den anderen 5% der Zellen des Striatums handelt es sich um große und kleine Interneurone (Assous und Tepper 2019; Luk und Sadikot 2001).

Bei ZNS-Erkrankungen wie der Chorea Huntington als auch beim Morbus Parkinson kommt es zur Reduktion der Funktion bzw. Untergang der Stachelneurone im Striatum. Bei der Chorea Huntington scheint ein Untergang präferentiell der inhibierenden Neurone eine Rolle bei den für die Erkrankung typischen überschießenden Bewegungen zu spielen (Nguyen und Cenci 2015). Beim Morbus Parkinson konnte gezeigt werden, dass Stachelneurone des Striatums ebenfalls durch die Erkrankung beeinflusst werden (Durante et al. 2019).

2.1.3 Primärer somatosensorischer Cortex

Der primäre somatosensorische Cortex befindet sich in beiden Hemisphären im Parietallappen, genauer gesagt im Gyrus postcentralis, der ersten Hirnwindung hinter der Zentralfurche. Er ist vor allem für die Verarbeitung der sensorischen Signale von Haut und Muskeln also von Berührung, Druck, Vibration, Temperatur aber auch Schmerz, verantwortlich. Der Cortex ist die äußere Schale des Gehirns und besteht, wie alle Regionen des Neocortex aus sechs Schichten: *Lamina molecularis*, *Lamina granularis externa*, *Lamina pyramidalis externa*, *Lamina granularis interna*, *Lamina pyramidalis interna*, *Lamina multiformis*. Die Schichten sind je nach Region unterschiedlich stark ausgeprägt (Welsch 2018). Das Besondere am somatosensorischen Cortex ist seine somatotope Organisation. Das bedeutet, dass benachbarte Zonen des Körpers auch hier nebeneinander abgebildet werden. So entsteht ein kleiner, auf dem kopfstehender, stark verzerrter Homunculus, bei dem aufgrund der hohen Rezeptordichte, die daraus folgende starke Empfindlichkeit der Lippen, Fingern und des Gesichts entsteht (Prometheus 2015). Den Input erhalten die Neurone des somatosensorischen Cortex Großteils von der Haut der kontralateralen Körperseite, da die afferenten Bahnen auf dem Weg zum Cortex zur Gegenseite kreuzen (Trepel 2017). Die Neurone des somatosensorischen Cortex geben die Informationen dann an assoziative Areale der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre weiter, sind aber über ihre Axone auch mit dem Thalamus, den Basalganglien und den Pyramidenbahnen verbunden. Die Hauptzellen des somatosensorischen Cortex sind die Pyramidenzellen, die 85% der Cortex Zellen ausmachen. Sie besitzen lange Dendriten, die teilweise bis in die äußerste Rindenschicht reichen können (Welsch 2018). Der Neurotransmitter der Pyramidenzellen ist Glutamat. Die restlichen 15% sind Nicht-Pyramidenzellen, die in Form und Größe variieren, jedoch meist mit ihren Dendriten in ihrer Zellschicht bleiben und inhibierend bzw. modulierend auf Pyramidenzellen einwirken können.

In den Experimenten dieser Arbeit habe ich nur Pyramidenzellen der fünften Schicht, *Lamina pyramidalis interna*, untersucht.

2.2 NMDA-Rezeptoren

Die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren gehören neben AMPA- und Kainat-Rezeptoren zu den drei großen Gruppen der ionotropen Glutamat Rezeptoren. Sie sind ubiquitär im Gehirn von Menschen und Nagetieren vorhanden und spielen eine wichtige Rolle bei Gedächtnisprozessen und synaptischer Plastizität. Die Dysregulation der NMDA-Rezeptoren ist im Prozess der Entstehung neurologischer und psychischer Krankheiten beteiligt. Dabei scheinen bestimmte Rezeptor-Untereinheiten (insbesondere GluN2B) bei der Pathophysiologie von ZNS-Erkrankungen eine besondere Rolle zu spielen.

2.2.1 Aufbau

Der NMDA-Rezeptor ist ein Heterotetramer. Es werden sieben verschiedene Untereinheiten unterschieden. Diese werden in drei Familien gruppiert: die GluN1-Untereinheit, vier verschiedene GluN2-Untereinheiten und zwei GluN3-Untereinheiten. Die Anzahl der Aminosäuren pro Untereinheit variiert zwischen 900 und 1480.

Die GluN1-Untereinheit ist auf einem Gen codiert, hat aber acht verschiedene Isoformen, die teilweise durch alternatives Splicing gebildet werden (Durand et al. 1993). Man unterscheidet zwischen GluN1-1A - 4A und GluN1-1B - 4B. Der Hauptunterschied zwischen diesen beiden Gruppen entsteht dadurch, dass die GluN1-xB-Gruppe noch zusätzlich das Exon 5 enthält. Die Isoformen der GluN1-Untereinheit unterscheiden sich in Strom und pharmakologischen Eigenschaften (Vance et al. 2012; Rumbaugh et al. 2000). Ein weiterer Unterschied ist die Lokalisation der verschiedenen Splice Varianten, da manche Varianten spezifisch für eine Gehirnregion, andere jedoch ubiquitär im adulten Mausgehirn zu finden sind (Laurie und Seeburg 1994). Für den Einbau des NMDA-Rezeptors in die Zellmembran sind zwei GluN1-Untereinheiten obligat (Paoletti et al. 2013). Es wurde aber auch schon zwei verschiedene GluN1 Isoformen innerhalb eines Heterotetramers beobachtet, welche sich in ihren Eigenschaften von den Rezeptoren mit den gleichen Isoformen unterscheiden (Yi et al. 2018).

Die GluN2-Untereinheit ist die Gruppe, die überwiegend zusätzlich zu den GluN1-Untereinheiten in den Rezeptor eingebaut werden. Hier wird zwischen GluN2A, GluN2B, GluN2C und GluN2D unterschieden, welche jeweils von verschiedenen Genen kodiert werden. GluN2A und GluN2B werden vermehrt im Hippocampus, Cortex und Striatum gefunden,

wohingegen GluN2C vornehmlich im Cerebellum eine signifikante Rolle spielt. GluN2D und GluN2C sind vorwiegend in Interneuronen zu finden (Monyer et al. 1994).

Die letzte Gruppe bilden die GluN3-Untereinheiten, die sich aus der GluN3A- und GluN3B-Untereinheit zusammensetzt. GluN3A und GluN3B werden von zwei unterschiedlichen Genen kodiert und sind im adulten Gehirn vor allem in triheteromeren Rezeptoren mit einer GluN2-Untereinheit zu finden. Ihnen wurde früher vornehmlich eine Rolle bei der Synapsenreifung zu geschrieben (Roberts et al. 2009). Inzwischen geraten die GluN3-Untereinheiten immer mehr in den Fokus der Forschung. Es wurde z.B. gezeigt, dass sie wohl auch eine Rolle bei der Reifung von Oligodendrozyten und Myelinscheiden spielen (Salter et al. 2005; Karadottir et al. 2005; Burzomato et al. 2010). Des Weiteren wird vermutet, dass die GluN3A-Untereinheit auch an der Entstehung der Chorea Huntington und Suchterkrankungen, wie z.B. der Kokainsucht beteiligt ist (Marco et al. 2013; Yuan et al. 2013). Andere Studien schreiben der GluN3A-Untereinheit einen neuroprotektiven Effekt u.a. auch bei Schlaganfällen, zu (Nakanishi et al. 2009, Lee et al. 2015).

Je nach Gehirnregion sind die diheteromeren GluN1/GluN2A- oder GluN1/GluN2B-Rezeptoren vorherrschend. Diheteromere Rezeptoren sind Rezeptoren bei welchen zusätzlich zu den zwei obligaten GluN1-Untereinheiten zwei GluN2-Untereinheiten desselben Subtyps einen Rezeptor bilden. Die diheteromeren Rezeptoren sind von den triheteromeren abzugrenzen, die sich zusätzlich zu den zwei obligaten GluN1-Untereinheiten aus zwei verschiedenen GluN2- und/oder GluN3-Untereinheiten zusammensetzen.

Die Familie der Glutamat-Rezeptoren weisen auf Grund ihrer Sequenzähnlichkeit auch strukturelle Ähnlichkeiten auf. Die molekulare Struktur einer Untereinheit der Rezeptorgruppe besteht aus vier voneinander trennbaren semiautonen Einheiten: der extrazellulären N-End Domäne (engl. N-terminal- domain (NTD)), der extrazellulären Liganden-Bindungs-Domäne (engl. Ligand-binding domain (LBD)), der transmembranen Domäne und der intrazellulären Carboxyl-End Domäne (engl. Carboxyl-terminal- domain (CTD)) (Paoletti und Neyton 2007; Sobolevsky et al. 2009). Die NTD sorgt für die Zusammenstellung der Untereinheiten und ist involviert in die allosterische Regulation. Die Liganden-Bindungs-Domäne bindet Glutamat (GluN2-Untereinheit) bzw. die Koagonisten Glycin oder D-Serine (GluN1-Untereinheit). Die transmembrane Domäne ist für die Verankerung des Rezeptors in der Zellmembran verantwortlich und besteht aus drei transmembranen Helices (M1, M3, M4), mit einer Schleife (M2), die gleichzeitig als

Selektivitätsfilter für Ionen dient. Der Selektivitätsfilter funktioniert mit Hilfe eines Asparaginrests, der die Durchlässigkeit für Kalzium bestimmt und die Blockierung des Rezeptors durch Magnesium ermöglicht. Die CTD dient der Interaktion mit der Zelle. Sie besteht aus unterschiedlichen Strukturen, die den intrazellulären und oberflächlichen Export und Import der Zelle kontrollieren (Paoletti et al. 2013).

2.2.2 Entwicklung

Die Komplexität der Expression der NMDA-Rezeptoren mit der Vielzahl von verschiedenen Untereinheiten wird durch ihr räumlich-zeitlich variierendes Expressionsmuster noch weiter verstärkt. Während der Embryonalzeit exprimieren die Neurone die Maus mehrheitlich diheteromere GluN1/GluN2B-Rezeptoren und vereinzelt auch GluN2D- und GluN3B-enthaltende Rezeptoren. GluN2B und GluN2D spielen mit den GluN3A-Rezeptoren eine wichtige Rolle für die Synaptogenese und die Synapsenreifung (Henson et al. 2010; Pachernegg et al. 2012; Roberts et al. 2009). Gleichzeitig ist zu beobachten, dass sich zwischen 50-75% der NMDA-Rezeptoren außerhalb der Synapse befinden. Ab der zweiten postnatalen Woche fällt diese Zahl langsam, bis sie sich im adulten Gehirn auf zwischen 25-50% einpendelt (Tovar und Westbrook 1999, Harris und Pettit 2007).

Ebenso sind entwicklungsabhängige Veränderungen in der Rezeptor-Untereinheitenkonstellation zu beobachten. Ab der zweiten postnatalen Woche erhöht sich die Anzahl der GluN2A-enthaltenden Rezeptoren, bis sie im adulten Gehirn die Hälfte bzw. etwas über die Hälfte aller Untereinheitstypen ausmacht. Dagegen verschwinden die GluN2D-enthaltenden Rezeptoren fast gänzlich, bis nur noch ein kleiner Rest in den kaudalen Hirnstrukturen, wie dem Diencephalon und dem Hirnstamm, zu finden ist. Die GluN2B-Rezeptoranzahl vermehrt sich nach der Geburt zunächst und hat ihren Höhepunkt am zehnten postnatalen Tag, danach reduziert sich der Rezeptortypus auf das Vorderhirn. Zuletzt vermehrt sich der diheteromere GluN2C-Rezeptor im Cerebellum (Watanabe et al. 1992; Akazawa et al. 1994; Monyer et al. 1994; Sheng et al. 1994).

Eine ähnliche Entwicklung machen die GluN3-enthaltenden Rezeptoren durch, während die GluN3A-Rezeptoren zunächst bis zum zehnten postnatalen Tag vermehrt exprimiert werden und sich dann reduzieren, entstehen die GluN3B-enthaltenden Rezeptoren erst langsam und sind im adulten Gehirn in Motoneuronen und anderen Strukturen zu finden (Andersson et al.

2001; Bendel et al. 2005; Henson et al. 2008; Henson et al. 2010; Müller und Meador-Woodruff 2003).

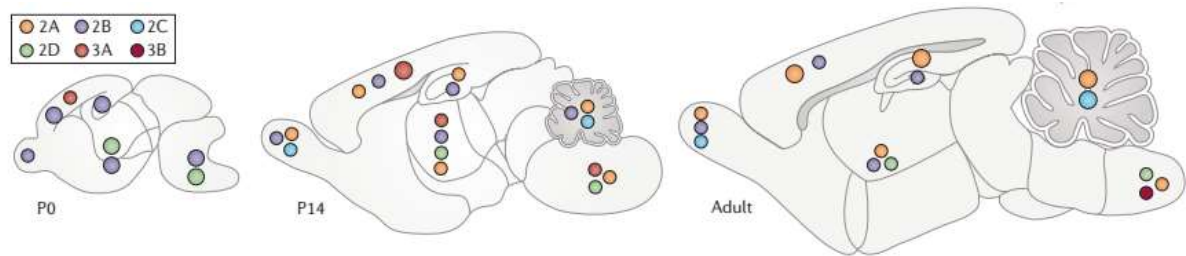


Abbildung 1: Die Entwicklung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten im Mausgehirn dargestellt in 3 Stadien: am Tag der Geburt (postnatal day 0 (P0)), 2 Wochen nach Geburt (P14) und im Erwachsenenalter (adult). (Abbildung aus Paoletti et al. 2013).

Die Fähigkeit neurale Netzwerke umzugestalten ist während der postnatalen Periode verstärkt. Dies liegt zum großen Teil an der veränderten Untereinheitenverteilung im Gehirn. Diheteromere GluN1/GluN2A-Rezeptoren werden vermehrt gebildet. GluN2B-enhaltenden Rezeptoren bleiben dagegen in ihrer Anzahl weitgehend konstant. Während der Anfangsphase der Hochregulation der GluN2A-Untereinheit enthalten Synapsen sowohl diheteromere GluN1/GluN2A- und GluN1/GluN2B-Rezeptoren. Diese Verteilung der NMDA-Rezeptor-Untereinheit während der Entwicklung scheint ein wesentlicher Faktor bei der hohen synaptischen Plastizität und das große Lernvermögen des jungen Gehirns zu sein. Wenn die GluN2A-Produktion dominiert, führt das zu einer Reduktion von synaptischer Plastizität, die Synapsenstruktur wird stabiler. Das Gleichgewicht zwischen Plastizität und Stabilität, das durch die Änderung der Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten gewährleistet wird, ist optimal für Prozessierung und Speicherung von Informationen (Dumas 2005).

Die entwicklungsabhängige Änderung der Expression der GluN2-Untereinheit ist aktivitätsabhängig. So kann die Veränderung der Rezeptor-Untereinheitenkonstellation im visuellen Cortex durch Dunkelheit hinausgezögert werden bzw. durch Lichtstimulation induziert werden (Philpot et al. 2001).

2.2.3 Lokalisation

NMDA-Rezeptor sind typischerweise an der postsynaptischen Seite in einer proteindichten Struktur zu finden, der sogenannten „postsynaptic density“, in welcher sie für die Weiterleitung des Signals und Auslösen weiterer Signalkaskaden zuständig sind. In erwachsenen Mausgehirnen sind an der Postsynapse der Neurone des Vorderhirns NMDA-

Rezeptoren mit den Untereinheiten GluN2A und GluN2B zu finden (Paoletti et al. 2013). Des Weiteren können NMDA-Rezeptoren auch extrasynaptisch z.B. am Soma des Neurons oder perisynaptisch lokalisiert sein, wobei man annimmt, dass die perisynaptischen Rezeptoren durch lateral Diffusion zwischen der extrasynaptischen und der synaptischen Seite des Neurons pendeln, da bis zu 65% der NMDA-Rezeptoren mobil sind (Tovar und Westbrook 2002). Ergebnisse anderer Studien, die mit kompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten durchgeführt wurden, sprechen gegen einen Austausch von extrasynaptischen und synaptischen NMDA-Rezeptoren über laterale Diffusion (Harris und Pettit 2007).

Laut aktueller Literaturmeinung handelt es sich bei den extrasynaptischen Rezeptoren häufig um die diheteromeren GluN1/GluN2B-Rezeptoren (Gladding und Raymond 2011; Stocca und Vinci 1998; Tovar und Westbrook 1999). Andere Studien und Ergebnisse der von Engelhardt Arbeitsgruppe sprechen allerdings gegen die vereinfachte Darstellung, dass sich GluN1/GluN2A-Rezeptoren synaptisch und GluN1/GluN2B-Rezeptoren extrasynaptisch aufhalten (Harris und Pettit 2007; Lopez de Armentia und Sah 2003; Petralia et al. 2010; Thomas et al. 2006).

Eine präferentiell synaptische Lokalisation GluN2A-enthaltender Rezeptoren und präferentiell extrasynaptische Lokalisation GluN2B-enthaltender Rezeptoren könnte an Unterschieden in der Mobilität der Rezeptoren liegen. GluN1/GluN2B-Rezeptoren sind mobiler als GluN1/GluN2A-Rezeptoren, was wohl darauf zurückzuführen ist, dass die Casein Kinase 2 die PDZ-Bindungsstelle der GluN1/GluN2B-Rezeptoren aber nicht die der GluN1/GluN2A-Rezeptoren phosphoryliert. Die Phosphorylierung führt dazu, dass intrazelluläre Gerüstproteine nicht mehr an den Rezeptor binden können, was zu einer erhöhten Mobilität führen könnte (Chung et al. 2004; Paoletti et al. 2013; Sanz-Clemente et al. 2010). Eine weitere Theorie besagt, dass vor allem GluN1/GluN2A-Rezeptoren mit Membranproteine wie PSD-95 eher interagieren, welche die Membran stabilisieren und somit Diffusion von Proteinen in der Membran verringern (Groc et al. 2006). Müller, B.M. et al. 1996 entdeckten zudem, dass die GluN1/GluN2B-Rezeptoren an der Membran bevorzugt mit SAP102 interagieren, ein Protein, das sich vor allem an Gabelungen von Dendriten und ihren Spines aufhält. Die GluN2A-Untereinheit interagiert dagegen wohl eher mit SAP-90 interagiert (auch PSD 95), was sich fast ausschließlich in der postsynaptischen Dichte (PSD), also synaptisch nachweisen lässt (Sans et al. 2000).

NMDA-Rezeptoren konnten fast ubiquitär an der Präsynapse von sowohl exzitatorischen als auch in inhibitorischen Synapsen von z.B. neokortikalen Zellen, entorhinalen Cortex und Purkinje Zellen gefunden werden (Aoki et al. 1994; Beretta und Jones 1996; Bouvier et al. 2015; Corlew et al. 2008). Auch hier variieren die verschiedenen Untereinheiten der NMDA-Rezeptoren je nach Gehirnregion und Reifegrad der Zelle (Bidoret et al. 2009; Braiser und Feldman 2008; Jourdain et al. 2007; Larsen et al. 2011; Paoletti et al. 2013; Woodhall et al. 2001). Sie werden an der präsynaptischen Seite durch Glutamat von Astrozyten oder afferente Signale aktiviert und sollen die Glutamat Freisetzung der Präsynapse erleichtern und eine Rolle in der Langzeit-Depression spielen (Beretta und Jones 1996; Bidoret et al. 2009; Jourdain et al. 2007; Larsen et al. 2011). Es wird auch vermutet, dass sie eine Rolle bei der Entstehung von Krankheiten spielen (Yang et al. 2006; Zeng et al. 2006; Zhou et al. 2013). Dieses Gebiet ist allerdings noch sehr wenig erforscht (Bouvier et al. 2015).

Die Vielfalt der NMDA-Rezeptortypen und deren Lokalisation wird noch weiter erhöht durch einen nicht-neuralen Pool. Auf Oligodendrozyten und Astrozyten wurden atypische NMDA-Rezeptoren gefunden, die GluN2C- und GluN3-Untereinheiten enthalten. Ihre Aktivierung führt zu einer Schädigung der Myelinschicht der Zellen. Die Funktion ist aber weitgehendst noch ungeklärt (Burzomato et al. 2010).

Es konnte zudem gezeigt werden, dass Motoneurone der fünften Schicht im Cortex je nach Erregungseingang unterschiedliche Rezeptor-Untereinheitenkonstellationen bevorzugt ausprägen. So exprimieren Neurone, die ihren Input vom Corpus Callosum erhalten eher GluN2A-enthaltende NMDA-Rezeptoren wohingegen GluN2B-enthaltende Rezeptoren in Synapsen für intrakortikale Kommunikation verwendet werden. (Kumar und Huguenard 2003).

2.2.4 Eigenschaften

Der NMDA-Rezeptor ist ein ionotroper Glutamat-Rezeptor, der im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren seiner Familie die Besonderheit besitzt, eine sehr hohe Permeabilität für Kalziumionen zu haben. Zudem verfügt er über einen spannungsabhängigen Magnesiumblock, der einen Ionendurchfluss bei sehr negativen Potentialen (negativer als -40mV) reduziert. Das führt dazu, dass die Aktivierung des Rezeptors nicht nur die Bindung von Glutamat und einem Co-Agonist, wie Glycin oder D-Serine, sondern auch eine leicht vordepolarisierte Membran

voraussetzt. Bei Aktivierung führt der Kalziumeinstrom in die Zelle zu einer Phosphorylierung von Proteinen oder Freisetzung von Botenstoffen, die die Glutamat Ausschüttung oder die Aktivität von AMPA-Rezeptoren steigern (Traynelis et al. 2010; Paoletti 2011).

Eine weitere Besonderheit der NMDA-Rezeptoren ist die langsame Kinetik, die dem sich nur langsam voneinander lösenden Ligand-Rezeptor-Komplex zu geschrieben wird (Paoletti et al. 2013).

Der NMDA-Rezeptor zeichnet sich vor allem durch seine Vielfalt an unterschiedlichen Untereinheiten aus. Diese unterscheiden sich in ihrer Permeabilität, Kinetik, pharmakologischen Eigenschaften, Funktion und in ihrer Lokalisation (s.o.).

Diheteromere GluN1/GluN2A- oder GluN1/GluN2B-Rezeptoren haben eine hohe Leitfähigkeit (~50 pS), eine hohe Affinität zum Magnesium-Block (halb-maximale Inhibitorkonzentration (IC_{50}) von ~15 μ M bei -70 mV) und eine hohe Kalziumpermeabilität (pCa/pCs von ~7.5). Im Gegensatz dazu haben diheteromere GluN1/GluN2C- oder GluN1/GluN2D-Rezeptoren eine geringere Leitfähigkeit (~37pS), eine geringere Affinität zum Magnesium-Block (IC_{50} von ~80 μ M) und eine schwächere Kalziumpermeabilität (pCa/pCs von ~4.5) (Paoletti et al. 2013). Ähnliche Eigenschaften wurden auch für GluN3-enthaltenden Rezeptoren beobachtet. Diese Eigenschaften werden durch einen kleinen Teil der M3 Einheit auf der GluN2-Untereinheit codiert (Retchless et al 2012). Die geringere Affinität zum Magnesium-Block führt dazu, dass die GluN1/GluN2C- und GluN1/GluN3-Rezeptoren sich auch bei negativeren Potentialen öffnen können, und könnte eine Erklärung dafür sein warum sich GluN2C-Rezeptoren vor allem auf Oligodendrozyten befinden, da diese Zellen nur wenig depolarisieren (Piña-Crespo et al. 2010; Burzomato et al. 2010).

Die Kinetiken der Rezeptoren-Untertypen sind ebenfalls unterschiedlich. Die Deaktivierung ist bei GluN1/GluN2A-Rezeptoren mit einer Zeitkonstante von 40ms schneller als bei GluN1/GluN2B und GluN1/GluN2C-Rezeptoren (Zeitkonstante GluN2B/GluN2C = 250ms). Die langsamste Deaktivierung hat der GluN1/GluN2D-Rezeptor (Zeitkonstante = 2s). Die Wiedererlangung der Erregbarkeit der Rezeptoren nach Desensibilisierung dauert bei GluN1/GluN2B länger als bei den GluN1/GluN2A-Rezeptoren (Paoletti et al. 2013; Vicini et al. 1998; von Engelhardt et al. 2008). Gleichzeitig hat der GluN1/GluN2A-Rezeptor die höchste Offenwahrscheinlichkeit der Rezeptorsubtypen und das, obwohl er die geringste Sensitivität zu Glutamat hat (Erreger et al. 2005). Glutamat hat noch zwei wesentliche Co-Agonisten: D-

Serine und Glycin. D-Serine befindet sich hauptsächlich synaptisch und aktiviert die GluN2A-enhaltende Rezeptoren besser als Glycin, welches Großteils extrasynaptisch lokalisiert ist (Ferreira et al. 2017).

Im ZNS existieren viele endogene Modulatoren der NMDA-Rezeptoren. Jedoch sind viele von diesen nur untereinheitenspezifisch effektiv z.B. inhibieren Protonen vor allem GluN2B- und GluN2D-enhaltende Rezeptoren, wohingegen Polyamine die Funktion von GluN1/GluN2B-Rezeptoren noch verstärken können (Banke et al. 2005; Mony et al. 2011; Paoletti 2011). Es gibt nicht selektive NMDA-Rezeptorantagonisten, wie zum Beispiel 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (APV), die theoretisch alle GluN2-enhaltende Rezeptoren an der Glutamat-Bindungs-Stelle kompetitiv hemmen. Selektive NMDA-Rezeptorantagonisten hemmen mehr oder weniger spezifisch nur bestimmte NMDA-Rezeptoren. So werden Ifenprodil und seine Derivate als selektive Antagonisten der GluN1/GluN2B-Rezeptoren verwendet (Karakas et al. 2011). In weiteren Studien wurde Zink zur Unterscheidung der Untereinheiten verwendet, da die GluN1/GluN2A-Rezeptoren um ein Vielfaches affiner zu Zink sind als die GluN1/GluN2B-Rezeptoren (Paoletti et al. 1997; Rachline et al. 2005). So wurden mit geringen Konzentrationen nur die GluN1/GluN2A-Rezeptoren gehemmt (Erreger und Traynelis 2008; Nozaki et al. 2011). Inzwischen gibt es weitere untereinheitenspezifische Inhibitoren, die präferentiell eine Untereinheit hemmen, wie TCN-201 für die GluN2A-Untereinheit (McKay et al. 2012). Keiner der verwendeten subtyp-spezifischen Antagonisten ist allerdings zu 100% selektiv (William 1993).

Auch im Einbau in die Zellmembran unterscheiden sich GluN2A- und GluN2B-exprimierende Rezeptoren. Während die GluN1/GluN2B-Rezeptoren kontinuierlich in die Zellmembran eingebaut werden, muss der Einbau von diheteromeren GluN1/GluN2A-Rezeptoren durch neuronale Aktivität getriggert werden (Storey et al. 2011).

Die Untereinheiten haben auch gegensätzlichen Einfluss auf andere ionotrope Glutamat-Rezeptoren und die Entwicklung von Synapsen. Die Deletion der GluN2B-Untereinheit führte zu einem Anstieg funktioneller Synapsen der CA1 Pyramidenzellen, wobei morphologische Analysen zeigten, dass sich die Anzahl der Dornfortsätze der Neurone nicht änderte. Dies deutet daraufhin, dass die Deletion der GluN2B-Untereinheit die Anzahl der stillen (silent) Synapsen reduzierte. Die Deletion der GluN2A-Untereinheit hingegen erhöhte die Amplitude synaptischer Ströme, was auf eine gesteigerte Anzahl an AMPA-Rezeptoren hindeutet und der GluN2A-Untereinheit die Funktion einer AMPA-Rezeptordämpfung zu schreiben würde (Gray

et al. 2011). Eine Erhöhung der mEPSC Amplitude konnte auch in neugeborenen Neuronen bei einem Verlust der GluN2B-Untereinheit beobachtet werden, konnte aber durch Wiederholung der Experimente in adulten Mäusen nicht erneut nachgewiesen werden und wurde somit einem Phänomen einzig in neugeborenen Tieren zu geschrieben (von Engelhardt et al. 2008).

2.2.5 Triheteromere NMDA-Rezeptoren

Im Gegensatz zu den diheteromeren NMDA-Rezeptoren weiß man sehr wenig über die Eigenschaften der triheteromeren NMDA-Rezeptoren. Es wird angenommen, dass sie im Hippocampus und Cortex exprimiert werden (Luo et al. 1997; Rauner und Köhr 2011). Studien zeigen, dass triheteromere GluN1/GluN2A/GluN2B-Rezeptoren in ihren kinetischen Eigenschaften eher denen der diheteromeren GluN1/GluN2A-Rezeptoren ähneln, da ihre Deaktivierung fast genauso schnell, wie der der diheteromeren GluN1/GluN2A-Rezeptoren ist (Tovar et al. 2013). Das bedeutet ebenfalls, dass nur eine GluN2A-Untereinheit für eine schnellere Deaktivierungskinetik nötig ist. Die pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden sich von denen der diheteromeren GluN1/GluN2A- und GluN1/GluN2B-Rezeptoren. Triheteromere GluN1/GluN2A/GluN2B-Rezeptoren sind ähnlich affin für Zink wie diheteromere GluN1/GluN2A-Rezeptoren. Sie können durch den selektiven GluN2B-Antagonisten Ifenprodil gehemmt werden, jedoch kann nur eine maximale Inhibition von 20% erreicht werden. Selbst wenn beide Inhibitoren gleichzeitig angewendet werden, sind triheteromere GluN1/GluN2A/GluN2B-Rezeptoren nicht maximal blockiert (Hatton und Paoletti 2005). Dieser Unterschied ist wohl auf eine Veränderung an der Ifenprodil-Bindungsstelle zurückzuführen (Hansen et al. 2014). Synaptische Ströme adulter Neurone sind für Ifenprodil nur gering sensitiv, was an einem postnatalen Austausch von synaptischen GluN1/GluN2B liegen kann. Eine Expression von triheteromeren GluN1/GluN2A/GluN2B-Rezeptoren in Synapsen adulter Neurone könnte die geringe Sensitivität für Ifenprodil allerdings auch erklären (Soares und Lee 2013). Sowohl pharmakologisch unter Verwendung der mehr oder weniger selektiven Antagonisten und aufgrund der beobachteten Kinetik ist es schwierig zu differenzieren, ob triheteromere GluN1/GluN2A/GluN2B-Rezeptoren oder diheteromere GluN1/GluN2A- mit GluN1/GluN2B-Rezeptoren exprimiert werden. Es gibt bisher nur wenige Modelle, mit denen man die triheteromeren Rezeptoren untersuchen kann (Soares und Lee 2013; Yi et al. 2017; Rauner und Köhr 2011). Oftmals wird die

Immunpräzipitation verwendet, hiermit werden die unterschiedlichen Untereinheiten angefärbt und dann quantitativ im Western Blot bestimmt. Jedoch kann hiermit nur insuffizient festgestellt werden, ob die Rezeptoren synaptisch oder extrasynaptisch exprimiert werden. Eine weitere Methode ist die Patch-Clamp Methode in Kombination mit Knockout-Mauslinien. Dabei kann die Quantifizierung der Deaktivierung der NMDA-Rezeptoren in Wildtyp Mäusen (WT) als auch in den jeweiligen Knockout-Mauslinien zur Abschätzung der Expression der NMDA-Rezeptorkomposition beitragen. Hierfür müssen jedoch konditionelle Knockout-Methoden verwendet werden, da ein globaler Knockout der GluN1- oder GluN2B-Untereinheiten für Mäuse perinatal letal ist (Luo et al. 1997; Rauner und Köhr 2011).

2.2.6 Erkrankungen

Synapsendysfunktion spielt bei der Pathophysiologie vieler ZNS-Erkrankungen eine Rolle. Dabei beobachtet man Veränderungen der Aktivität, Anzahl oder Typ der NMDA-Rezeptoren (Endele et al. 2010; Hahn et al. 2006; Mohn et al. 1999; Snyder et al. 2005; Terasaki et al. 2010). Modulatoren der NMDA-Rezeptoren werden in der Therapie einiger ZNS-Erkrankungen, wie zum Beispiel der Schizophrenie, des Morbus Alzheimer oder des Morbus Parkinson, verwendet. Heute weiß man, dass NMDA-Rezeptoren auch beim Schlaganfall oder beim Altern eine wichtige Rolle spielen. Es konnte festgestellt werden, dass Inhibitoren der NMDA-Rezeptoren direkt vor oder kurz nach einem Schlaganfall einen neuroprotektiven Effekt in Nagermodellen haben (Aarts et al. 2002; Lai et al. 2011; Tu et al. 2012). Jedoch konnte man in der Schlaganfalltherapie bisher noch keinen klinischen Erfolg mit Inhibitoren der NMDA-Rezeptoren feststellen, was zum einen an den gravierenden Nebenwirkungen und zum anderen an dem kleinen therapeutischen Fenster (1 Stunde) liegt, in dem therapiert werden muss. (Aarts et al. 2002; Tu et al. 2012). Generell konnte festgestellt werden, dass selektive Inhibitoren besser vertragen werden als unselektive Inhibitoren (Gogas 2006; Chenard und Menniti 1999; Merchant et al. 2006).

Sowohl Über- als auch Unterfunktion der NMDA-Rezeptoren spielen bei der Pathophysiologie von ZNS-Erkrankungen eine Rolle. So ist die verstärkte Aktivierung der NMDA-Rezeptoren aufgrund einer Überaktivität glutamaterger Neurone, z.B. beim Schlaganfall, toxisch. Dabei führt die vermehrte Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zu einem exzessiven Einstrom von Kalzium in das Neuron, sowie konsekutiv zur Aktivierung von Phospholipasen, Proteasen und

Endonucleasen, die den Zelluntergang einleiten (Exzitotoxizität) (Eyo et al. 2014; Marsden 2011). Der Einstrom von Kalzium beeinträchtigt außerdem die Funktion von Mitochondrien, was ebenfalls zur Apoptose führt (Nicholls et al. 2000). Interessanterweise scheint aber der Einstrom von Kalzium durch die synaptischen NMDA-Rezeptoren zu keiner Beeinträchtigung der Mitochondrien zu führen (Hardingham et al. 2002). Zudem spielt die Zusammensetzung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten wohl eine größere Rolle (Liu et al. 2007). Es wird angenommen, dass die GluN2B-enhaltende Rezeptoren proapoptotisch wirken, wohingegen GluN2A-enhaltende Rezeptoren eher einen neuroprotektiven Einfluss haben (Liu et al. 2007; Terasaki et al. 2010; Martel et al. 2009; Soriano et al. 2008). Eine Erklärung für die gegensätzlichen Effekte könnte sein, dass die GluN1/GluN2B-Rezeptoren eine längere Öffnungszeit haben als GluN1/GluN2A-Rezeptoren und dadurch mehr Kalzium in die Zellen fließen kann (Paoletti et al. 2013). Als Schutz vor der Erregungstoxizität werden aktuell Inhibitoren getestet, die die Signalkette nach der Rezeptoraktivierung blockieren und aktuell auch Erfolg versprechend sind (Aarts et al. 2002; Cook et al. 2012; Hill et al. 2012; Tu et al. 2012). Des Weiteren werden Aktivatoren der GluN1/GluN2A-Rezeptoren als Mittel gegen den durch GluN1/GluN2B-Rezeptoren getriggerten Zelltod diskutiert (Martel et al. 2012). Diese wirken durch Aktivierung der CAM-Kinase, Ras-ERK1/2-Kaskade, Akt und RSK2, welches über den Ras-MAPK Weg das proapoptotische Protein BAD phosphoryliert und es somit inaktiviert, was wiederum das Überleben der Zelle fördert (Yano et al. 1998; Bonni et al. 1999).

Beim Morbus Alzheimer führt eine Überaktivität der NMDA-Rezeptoren zum Verlust synaptischer und extrasynaptischer NMDA-Rezeptoren und gleichzeitig damit zur pathologischen Veränderung der Langzeitpotenzierung der Zelle (Rönicke et al. 2011; Li et al. 2011; Hu et al. 2009; Müller, M. K. et al. 2018). Deswegen wird in der aktuellen Therapie der mittelschweren bis schweren Morbus Alzheimer der NMDA-Rezeptorinhibitor Memantine eingesetzt.

Eine Hypoaktivität der NMDA-Rezeptoren wird als pathophysiologischer Mechanismus bei Krankheitsbildern wie der Schizophrenie und anderen kognitiven Störungen diskutiert. Lange Zeit galt ein Überschuss an Dopamin als Erklärung für die Entstehung von Schizophrenie. Da dieser aber die Entstehung der Symptome nicht erklärt, wird heute eher die Reduktion der glutamatergen Synapsen inhibitorischer Neuronen als ein relevanter Mechanismus bei der Entstehung der Schizophrenie diskutiert (Moghaddam et al. 2012). Diese Veränderung in den Synapsen inhibitorischer Neurone führt zu einer dauerhaften Veränderung des neuronalen

Netzwerkes mit Psychosen als Symptom. Diese These wird von Studien gestützt, die zeigen, dass Inhibition von NMDA-Rezeptoren oder verminderte Expression von NMDA-Rezeptoren in Knockout-Mäusen zu Psychose-ähnlichen Symptomen führen können (Belforte et al. 2010; Mohn et al. 1999; Newcomer et al. 1999), bzw. die gesteigerte Aktivierung der NMDA-Rezeptoren zu einer Verbesserung psychotischer Symptome führt (Moghaddam et al. 2012).

Ebenso spielt eine Reduktion der NMDA-Rezeptoren eine wichtige Rolle beim Alterungsprozessen. So wurde beobachtet, dass besonders die diheteromeren GluN1/GluN2B-Rezeptoren im Alter vermindert in Synapsen exprimiert werden, was möglicherweise zu der altersbedingten verminderten Merkfähigkeit beiträgt. Ein therapeutischer Ansatz könnte auch hier die Verhinderung der Reduktion der Expression dieser Rezeptoren sein, aber auch eine Verstärkung der Funktion der diheteromeren GluN1/GluN2A-Rezeptoren wird diskutiert (Cao et al. 2007; Magnusson et al. 2010; Paoletti et al. 2013).

2.3 Ziel der Studie

NMDA-Rezeptoren spielen bei der Pathophysiologie verschiedener ZNS-Erkrankungen, wie zum Beispiel des Morbus Alzheimer oder Chorea Huntington eine wichtige Rolle. Für besseres Verständnis der Bedeutung der verschiedenen NMDA-Rezeptortypen, bzw. Untereinheiten bei ZNS-Erkrankungen ist eine umfassende Analyse ihrer Expression im adulten Gehirn notwendig. Vor allem ist hier die detaillierte Analyse der synaptischen und extrasynaptischen Expression von großer Bedeutung, da die Aktivierung extrasynaptischer NMDA-Rezeptoren degenerative Prozesse fördern, wohingegen die Aktivierung synaptischer NMDA-Rezeptoren neuroprotektiv wirken kann (Hardingham et al. 2002, Hardingham und Bading 2010).

In dieser Studie möchte ich die funktionelle Expression der NMDA-Rezeptoren und die Kontribution der GluN2A- und GluN2B-Untereinheiten im adulten Mausgehirn untersuchen. Das in dieser Studie gewonnene Wissen kann später als Grundlage benutzt werden, um zum Beispiel spezifische medikamentöse Therapieansätze entwickeln zu können. Antagonisten von NMDA-Rezeptoren sind bereits zur Therapie neurodegenerativer Erkrankungen zugelassen. So wird zum Beispiel momentan Memantin zur Therapie des Morbus Alzheimer eingesetzt. Memantin ist ein NMDA-Rezeptorantagonist, welcher vornehmlich offene NMDA-Rezeptoren blockiert, zudem blockiert er etwas spezifischer GluN2B-enhaltende Rezeptoren (Parson et al.

2007; Xia et al. 2010). Allerdings geht die Einnahme von Memantin mit starken Nebenwirkungen einher, da NMDA-Rezeptoren, wie oben beschrieben auch wichtig für die normale Zell-Zell-Kommunikation ist. Ein besseres Verständnis der Verteilung der Untereinheiten kann somit zur Entwicklung noch spezifischerer und nebenwirkungsärmerer Antagonisten führen. Da sich die Pathologie neurodegenerativer Erkrankungen meist auf spezifischen Gehirnregionen fokussiert, beispielsweise das Striatum bei der Chorea Huntington, werde ich in meiner Studie die Regionen untersuchen, welche bei diesen Erkrankungen eine herausragende Rolle spielen. Deshalb fokussiere ich mich auf den Hippocampus (Morbus Alzheimer, Demenz- Erkrankungen), das Striatum (Chorea Huntington) und den Cortex (Morbus Alzheimer, Schlaganfall, traumatische Verletzungen).

Mit meiner Doktorarbeit werde ich als Teilprojekt der Studie zur Aufklärung der synaptischen und extrasynaptischen Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten durch die Untersuchung der synaptischen GluN1/GluN2A-Rezeptoren beitragen. Hierfür wurden ein virusvermittelter konditionierter Knockout in wenigen Neuronen des Mausgehirns durchgeführt, da ein globaler Knockout des NMDA-Rezeptors nicht mit dem Leben vereinbar ist. Zur Analyse der synaptischen NMDA-Rezeptor Ströme wurde die elektrophysiologische Methode der Ganzzellableitung verwendet.

Meine konkreten Fragestellungen:

- Wie ändert sich die Amplitude synaptischer NMDA Rezeptor-vermittelter Ströme in Neuronen 1) des Gyrus dentatus, 2) der CA1 Region, 3) des Striatum und des somatosensorischen Cortex adulter Mäuse mit Knockout der GluN2A-Untereinheit. Zur Beantwortung dieser Frage habe ich evozierte NMDA- und AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme abgeleitet und NMDA/AMPA Ratios analysiert.
- Hat der Knockout der GluN2A-Untereinheit einen Einfluss auf die Kurzzeitplastizität. Zur Beantwortung dieser Frage habe ich Paired-Pulse Messungen durchgeführt und analysiert.
- Wie ändert sich die Kinetik NMDA-Rezeptor-vermittelter Ströme durch den Knockout der GluN2A-Untereinheit. Zur Beantwortung dieser Frage habe ich die Signalabfallzeit gemessen und analysiert.

- Wie ändert sich Anzahl und Stärke der funktionellen Synapsen in Neuronen adulter Mäuse mit Knockout der GluN2A-Untereinheit. Zur Beantwortung dieser Frage habe ich mEPSCs abgeleitet und analysiert.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden adulte Mäuse im Alter von 13-16 Wochen verwendet. Die Versuchstiere entstanden durch Züchtung aus konditionierten NMDA-Rezeptor Knockout-Mauslinien (GluN1^{fl/fl}, GluN2A^{fl/fl} und GluN2B^{fl/fl}), in welchen die *grin1*, *grin2a* und *grin2b* Gene durch loxP Stellen flankiert sind. Diese drei Mauslinien wurden verwendet um die NMDA-Rezeptor-Untereinheitenkonstellation in Gyrus dentatus, CA1, Striatum und somatosensorischen Cortex zu ermitteln. In meiner Arbeit habe ich nur mit der GluN1^{fl/fl} und der GluN2A^{fl/fl} Linie gearbeitet, welche bereits im Labor vorhanden waren (Gray et al. 2011; Niewoehner et al. 2007). Die Tiere wurden mit freiem Zugang zu Futter und Wasser mit bis zu vier weiteren gleichgeschlechtlichen Tieren in „Typ II long“ Käfigen gehalten. Die Käfige sind mit Nistmaterial und Unterschlupfen ausgestattet und stehen in einem Aufbewahrungslager, in welchem $22 \pm 2^\circ\text{C}$ und eine Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 10\%$ herrschen. Die Tiere werden bis zum Zeitpunkt des Experiments in einem 12 Stunden invertiertem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und täglich von geschulten Tierpflegern kontrolliert.

Aufgrund der früh postnatalen Veränderung der Untereinheitenkonstellation, müssen, um als repräsentatives Modell für neurodegenerative Krankheiten und Prozesse zu gelten, adulte Tiere für die Experimente verwendet werden (Monyer et al. 1992). Es wurde die Methode des konditionellen Knockouts gewählt, da die Tiere beim pränatalen, direkten Knockout der GluN2B- bzw. GluN1-Untereinheit nicht lebensfähig sind und der Versuchsaufbau des GluN2A-Knockouts vergleichbar sein sollte.

Um den konditionellen Knockout der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten zu initiieren, wurde in der zehnten bis vierzehnten Lebenswoche der Mäuse ein Cre-Rekombinase-exprimierender Virus in die zu untersuchende Region injiziert (s.u.). Die Cre-Rekombinase „schneidet“ die DNA zwischen den loxP Genen, in diesem Fall die Gene, die für den NMDA-Rezeptor-Untereinheiten kodieren, heraus, sodass die Untereinheiten nicht mehr gebildet werden können. Zwischen Injektion und Experiment wurde eine Zeitspanne von drei Wochen abgewartet, um einen nahezu vollständigen Verlust der Untereinheiten zu erreichen.

3.2 Virusapplikation

Für die Experimente wurden zwei Viren verwendet. Der Cre-Rekombinase-Virus (AAV-Syn-Cre-T2A-GFP), welches mittels der Expression des Enzyms Cre-Rekombinase zur Deletion des „geflochten“ Gens (GluN1, GluN2A oder GluN2B) führt und außerdem das grüne fluoreszierende Protein GFP exprimiert, sowie ein Kontrollvirus (AAV-CaMKII-tdTom), über den das rot fluoreszierende Protein tdTomato exprimiert wird. Es wurde ein Kontrollvirus verwendet, um auszuschließen, dass allein der Vorgang des Einbringens von Fremd-DNA eine Veränderung des Zellverhaltens mit sich bringt. Beide Viren wurden käuflich bei der Firma Vigina (Vigene, USA) erworben und im Zeitraum von Woche 10 bis 14 p.n. in die Versuchstiere eingebracht. Dabei wurde die Maus mit 2% Isofluranlösung anästhesiert und dann in Bauchlage auf einem Heizkissen bei 37°C, über die Ohren an einem Gestell (Stoelting, Irland) befestigt. Die Schnauze ragt in einen Schlauch hinein durch den eine kontinuierliche Zufuhr von 2% Isoflurangas gewährleistet werden kann. Die Augen der Versuchstiere werden auf Grund des reduzierten Lidreflex während der Anästhesie durch Bepanthen Creme (Bayer, Deutschland) feucht gehalten. Das Fell wird mit einer Schere entfernt. Die Kopfhaut wird daraufhin desinfiziert (Cutasep F, Bode Chemie, Deutschland) und mit Xylocain (AstraZeneca, England) lokal betäubt. Nach Abwarten der Einwirkzeit wird mit einer Schere die Kopfhaut geöffnet. Mit Hilfe eines Koordinatensystems werden die Injektionsstellen der beiden Hemisphären vom Bregma aus bestimmt und dort mit einem Bohrer (Foredom, USA) kleine Löcher in die Schädelkalotte gebohrt. Die Koordinaten der Gehirnregionen waren für den Gyrus dentatus: anteroposterior -3.2 mm, mediolateral ± 3 mm, dorsoventral -3 mm und -3.5 mm (für den inneren und äußeren Bereich) vom Bregma; für CA1: anteroposterior - 2.7 mm, mediolateral +3.1 mm, dorsoventral - 2.5 mm und -3.5mm vom Bregma; für das Striatum: anteroposterior -2.5 mm, mediolateral +2.5 mm, dorsoventral -3 mm vom Bregma und für den somatosensorischen Cortex: anteroposterior -2.5 mm, mediolateral +3.5 mm, dorsoventral - 0.5 mm vom Bregma. Dann wird der Virus über eine dünne Glasnadel mit einer Geschwindigkeit von 200nl/min eine Minute lang durch die freigelegten Stellen mit Hilfe von einem Ölhydraulik Mikroinjektor (Narishige, Japan) injiziert. Nach dieser Minute wird eine weitere Minute gewartet, damit verhindert wird, dass sich der Virus in anderen Gehirnregionen verteilt oder an der Glasnadel durch Adhäsionskräfte wieder herausgezogen wird. Danach wird die Glasnadel herausgezogen. Nachdem die Injektion in der zweiten

Hemisphäre erfolgt ist, wird die Kopfhaut wieder zugenäht (Ethicon 4-0, Deutschland) und das Tier zum Erwachen aus der Narkose wieder in seinen Käfig gesetzt.

3.3 Lösungen

3.3.1 Sucrose-Lösung

Die Sucrose-Lösung wurde während der Präparation der Schnitte verwendet, um ein optimales Medium für den Zellenerhalt zu schaffen. Die Lösung wurde 15 Minuten vor der Präparation in Eis herunter gekühlt und mit Carbogen (95%O₂/5%CO₂) begast, um eine ausreichende Oxygenierung und einen konstanten pH von 7,2 zu gewährleisten. Diese Bedingungen wurden während der Präparation der Schnitte beibehalten.

Inhaltsstoffe:

Substanz	Konzentration [mM]
CaCl ₂	0.02
d-Glucose	10
NaHCO ₃	26
NaH ₂ PO ₄	1.25
KCl	3
MgCl ₂	7
Sucrose	212

3.3.2 Extrazelluläre Lösung

Die Extrazelluläre Lösung wurde verwendet, um die Zellen während des Experiments lebensfähig zu halten. Sie wurde ab 15 Minuten vor Beginn bis Beendigung des Experiments mit 95%O₂/5%CO₂ oxygeniert. Die Inhaltsstoffe sind in der Tabelle unten aufgeführt, wobei CaCl₂, MgCl₂ und Glucose erst vor Beginn der Messung hinzugefügt wurden. Während des Experiments wurde sie in Raumtemperatur verwendet und vor der Präparation in einem Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Inhaltsstoffe:

Substanz	Konzentration [mM]
CaCl ₂	2
Glucose	25
KCl	2.5
NaCl	125
NaHCO ₃	25
NaH ₂ PO ₄	1.25
MgCl ₂	1

3.3.3 Intrazelluläre Lösungen

Die intrazellulären Lösungen wurden während den Patch-Clamp Messungen in die Aufnahmepipette gegeben.

Für die Ableitung der NMDA-Rezeptor- und AMPA-Rezeptor-vermittelten Ströme habe ich die Intra 1 verwendet und für die spätere morphologische Analyse wurde der Intrazellulären Lösung noch Biocytin hinzugefügt.

Für die Ableitung der aktiven und passiven elektrophysiologischen Eigenschaften der Neurone habe ich Intra 2 verwendet.

	Intra 1	Intra 2
Substanz	Konzentration [mM]	Konzentration [mM]
ATP-Mg-salz	2	4
K-Gluconat	0	130
HEPES	10	10
Phosphokreatin-Na	10	10
Na-Gluconat	0	10
EGTA	0.2	0
GTP	0.3	0.3
NaCl	8	4
Cs-Gluconat	120	0
CsCl	10	0
pH	7.3	7.2
Osmotische Konz.	295 mOsm/l	304 mOsm/l

3.3.4 Zusätze zur extrazellulären Lösung

Für alle Messungen wurde Gabazin (SR-95531) zur extrazellulären Lösung hinzugegeben, da Gabazin als selektiver allosterischer Antagonist die inhibitorischen GABA A-Ströme blockiert.

Für die Messung der Decays NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme wurde neben Gabazin noch der kompetitive AMPA/Kainat-Antagonist 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) hinzugegeben, damit bei dieser Messung nur die reinen NMDA-Rezeptor Ströme erhalten werden.

Für die Messung der miniature EPSC (mEPSCs) wurde neben Gabazin auch noch 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (APV), ein kompetitiver NMDA-Rezeptorantagonist, und Tetrodotoxin (TTX), ein Inhibitor der spannungsabhängigen Natriumkanäle hinzugegeben. Das Blockieren von Aktionspotenzialen ist bei dieser Messung notwendig, da dabei „quantal events“ gemessen werden sollen. Ein mEPSC ist also ein Strom, der durch die aktionspotenzialunabhängige Freisetzung des Glutamats eines Vesikels in einer Synapse zustande kommt. Die Amplitude der mEPSCs gibt dabei Aufschluss über die Zahl der postsynaptischen AMPA-Rezeptoren, während die Frequenz der mEPSCs mit der Zahl der funktionellen Synapsen korreliert.

Substanz	Konzentration [μ M]
Gabazin	10
CNQX	10
APV	50
TTX	1

3.4 Herstellung der Hirnschnitte

Das Versuchstier wird vor der Präparation mit 3% Isofluranlösung anästhesiert. Nach Feststellung des Ausfalls des Schmerzreizes an den Krallen wird das Versuchstier auf einem Styroporstück mit Nadeln an den Krallen fixiert, um mehr Halt während der restlichen Präparation zu gewähren. Danach wird die abdominale Höhle der Maus mit einem 3 cm langen Schnitt geöffnet und bis zum Herzen verlängert. Für die transkardiale Perfusion mit der oxygenierten Sucrose-Lösung wird eine Nadel, die an den Perfusor angeschlossen ist, in die linke Kammer des Herzens geleitet und der rechte Vorhof mit einer Schere aufgetrennt. Nach erfolgter Perfusion wird der Kopf von dem Körper der Maus getrennt und okzipital nach

kranial geöffnet und das Gehirn entnommen. Nach dem Entfernen des Gehirns aus dem Schädelkalotte wird es für den Gyrus dentatus oder CA1 transversal und für Striatum und somatosensorischen Cortex koronal geschnitten. Die Schnitte werden mit einem Gewebeschneider (Leica, Deutschland, Klinge: Persona, USA) mit einer Geschwindigkeit von 10mm/s in 250µm dünne Scheiben geschnitten. Die akuten Hirnschnitte werden in einem Behälter mit künstlicher extrazellulärer Lösung für 15 Minuten in einem Wasserbad (GFL, Deutschland) bei 37°C aufbewahrt. Danach werden die Schnitte langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und vor Beginn des Experiments noch weitere 60 Minuten in extrazellulärer Lösung auf Raumtemperatur inkubiert.

3.5 Elektrophysiologisches Setup

Das Patch-Clamp Verfahren wird an einem elektrophysiologischen Setup durchgeführt. Es besteht aus einem Mikroskop (Olympus, Japan) mit 4x (Plan N, NA 0.1, Olympus, Japan) und 40x Vergrößerung (LUMPlan, FI/IR, NA 0.8w; Olympus, Japan), welches über verschiedene Fluoreszenzfilter verfügt und einem kleinen Auffangbecken, in dem die Schnitte sich während des Experiments befinden. Dort werden sie mit Hilfe eines kleinen Platinhufeisen, welches mit Nylonfäden bespannt ist, befestigt damit sich die Schnitte während den Aufnahmen durch den dauernden Durchfluss von künstlicher extrazellulärer Lösung nicht bewegen. Die künstliche extrazelluläre Lösung wird über ein Perfusionssystem (Watson Marlow, England) bei einer konstanten Geschwindigkeit von 1ml/min in das System eingebracht und auch wieder abgesaugt. Das Mikroskop steht auf einem anti-vibrations Tisch (Newport, USA) und ist von einem Faraday Käfig (Universitäts-Werkstatt, Heidelberg, Deutschland) umgeben, um möglichst viele Störsignale von den Messungen fernzuhalten. Für die Experimente wurden noch zwei Mikromanipulatoren verwendet, an denen die Vorverstärker und Elektroden angebracht sind. Letztere bestehen aus einem chlorierten Silberdraht, über den jeweils die Aufnahmepipette oder die Stimulationspipette, gefüllt mit intrazellulärer Lösung, geschoben wird. Die Mikromanipulatoren und das Mikroskop werden über eine Kontrollbox (Luigs & Neumann, Deutschland) gesteuert.

Das Mikroskop verfügt zudem noch über eine Schwarz-Weiß Kamera, die am Computer über das Programm CellSense (Olympus, Japan) ausgelesen werden kann. Während der Aufnahmen

werden die Signale mit einem HEKA-Verstärker (HEKA, Deutschland) verstärkt und letztlich über das Programm PatchMaster (HEKA, Deutschland) aufgenommen.

3.6. Messtechnik

Bei der Whole-Cell Patch-Clamp Technik wird sich mit Hilfe von Pipetten Zugang zu der Zelle verschafft. Diese Pipetten bestehen aus Borosilikatglas und werden durch Erhitzung und Zug durch einen Pipetten Puller (Sutter, USA) aus Borosilikatglasröhren (Hilgenberg, Deutschland) gezogen. Pipetten, die mit intrazellulärer Lösung gefüllt sind, sollen einen Widerstand zwischen 3-5.5M Ω erreichen. Stimulationspipetten haben eine größere Öffnung und dadurch einen niedrigeren Widerstand.

Zu Beginn der Messung wird mit einer mit luftgefüllten Spritze ein Überdruck von 50-70mbar an die Pipette gelegt, damit beim Vordringen in den Schnitt kein Dreck in die Pipette gelangt und Gewebe um die Zielzelle herum sanft weggeschoben wird. Um den Widerstand der Pipette zu ermitteln, wird ein kontinuierlicher Testimpuls von 5mV für 500ms angelegt. Dieser ist wichtig, um eine stabile Verbindung zwischen Messpipette und Zelle zu kontrollieren. Wenn man sich eine geeignete Zelle ausgesucht hat, steuert man auf sie zu und drückt mit der Pipette leicht auf die Zelle, so dass sich der Widerstand erhöht und sich ein kleiner heller Halbmond um die Pipette bildet. Es wird ein Unterdruck erzeugt, mit dem man versucht den sogenannten „Gigaseal“ zu erreichen, dieser liegt standardgemäß über 2G Ω und zeigt an, dass eine dichte Verbindung zwischen der Öffnung der Glaspipette und der Zellmembran erfolgt ist. Gleichzeitig wird die Spannung von 0mV auf -70mV gesetzt. Ist ein stabiler Gigaseal erreicht, wird mit Hilfe eines starken, kurzen Unterdrucks und eines Spannungsstoß von 1000mV, die Zelle geöffnet, wonach die Messung gestartet werden kann.

3.6.1 NMDA/AMPA Ratios

NMDA-Rezeptor-vermittelte und AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme werden bei Raumtemperatur unter Zugabe von Gabazine aufgenommen. Die AMPA-Rezeptor-vermittelten Ströme wurden bei einem Potential von -70mV aufgenommen und die NMDA-Rezeptor-vermittelten Ströme bei einem Potential von +40mV. Zwischen den beiden Messungen wurde nach Veränderung des Potentials eine Minute gewartet, bevor die

Messung gestartet wurde. Es werden 20 NMDA-Rezeptor-vermittelte und 20 AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme aufgezeichnet und jeweils gemittelt. Die gemittelten Ströme werden für die Quantifizierung des Verhältnisses der Amplitude der NMDA-Rezeptor-vermittelten zur Amplitude der AMPA-Rezeptor-vermittelten Ströme (NMDA/AMPA Ratio) verwendet.

3.6.2 Kurzzeitplastizität (Paired-Pulse Ratio)

Die Aufnahme der Ströme für die Analyse der synaptischen Kurzzeitplastizität wurde bei Raumtemperatur bei einem Haltepotential von -70mV gemacht. Dabei wurden die Axone der präsynaptischen Zellen mit zwei Stimulationen (engl. Paired-Pulse) mit einem Interstimulations-Intervall von 50ms mit Hilfe einer extrazellulären Stimulationselektrode aktiviert.

3.6.3 Messung der kleinen exzitatorischen postsynaptischen Ströme

Die kleinen exzitatorischen Postsynaptischen Ströme (engl. miniature Excitatory-Postsynaptic Current kurz mEPSC) messen die postsynaptischen Antworten der AMPA-Rezeptoren einer Synapse. Hierdurch können Rückschlüsse auf das synaptische Verhalten der AMPA-Rezeptoren als auch auf die Anzahl der AMPA-Rezeptoren und die Anzahl der funktionellen Synapsen gezogen werden. Die mEPSCs werden bei einem Haltepotential von -70mV aufgenommen. Um den Serienwiderstand zu überwachen, wird alle 10 Sekunden eine kurze Spannungsänderung (5mV) induziert, die zur Hyperpolarisation führt. Über die Amplitude des dabei gemessenen Stroms kann der Serienwiderstand abgeschätzt werden. Es wurden nur Messungen verwendet, bei denen der Serienwiderstand unter 25MOhm lag.

3.6.4 Signalabfallzeit (Decay)

Die Signalabfallzeit (decay time), kurz Decay, ist die Zeit, bei der sich 2/3 aller Kanäle nach einem Stimulus wieder geschlossen haben. Für die Analyse der NMDA-Rezeptor-Decays klemmt man die Zelle auf -30mV und stimuliert Axone, die auf die Zelle projizieren, mit Hilfe einer extrazellulären Stimulationselektrode. Das Haltepotential von -30mV gewährleistet, dass NMDA-Rezeptoren nicht durch Mg-Ionen blockiert sind.

3.6.5 Aktionspotenziale und Feuerverhalten

Um passive und aktive Membraneigenschaften von Neuronen zu messen, wird die Zelle mit Stromimpulsen hyper- und depolarisiert. Hierbei können viele Eigenschaften der Zelle untersucht werden zum Beispiel ob das Schwellenpotenzial, bei der die Zelle Aktionspotenziale bildet, die Amplitude oder die Eingangswiderstand sich durch den Knockout verändert haben.

3.7 Statistik

Für die Analyse der elektrophysiologischen Experimente wurden die Programme PatchMaster (HEKA Electronics, Deutschland), Clampfit (Molecular Devices, USA), IGOR Pro (WaveMetrix, USA) und Microsoft Office Excel (Microsoft, USA) verwendet. PatchMaster wurde zur Auswertung von NMDA/AMPA Ratio und der Kurzzeitplastizität verwendet. Mit Clampfit wurden die mEPSCs analysiert. IGOR pro wurde für die Analyse der NMDA-Rezeptor Decays und passive und aktive Membraneigenschaften verwendet. Microsoft Office Excel wurde zur Aufbewahrung und Berechnung von Datensätzen verwendet.

Ob es sich um normalverteilte Daten handelt, wurde mittels Anderson-Darling-Test getestet. Normalverteilte Daten wurden mit T-Test, nicht normalverteilte Daten oder normalverteilte Daten mit unterschiedlicher Varianz mit einem Mann-Whitney Test auf statische Signifikanz überprüft (Graphpad Prism 9, USA). Hierbei wurde ein Stern (*) vergeben für ein Signifikanzniveau unter 0.5, zwei Sterne (**) für ein Signifikanzniveau unter 0.1, drei Sterne (***) ab einem Signifikantsniveau unter 0.01 und vier Sterne (****) für <0.0001 .

4. Ergebnisse

4.1 Synaptische Expression der GluN2A-Untereinheit in Hippocampus, Striatum und somatosensorischem Cortex

Bei vielen verschiedenen ZNS-Erkrankungen spielen die NMDA-Rezeptoren eine wichtige Rolle. Expressionsanalysen haben gezeigt, dass in den meisten exzitatorischen Neuronen des adulten Vorderhirns vor allem die NMDA-Rezeptor-Untereinheiten GluN1, GluN2A und GluN2B exprimiert werden. Bei der Mehrheit der NMDA-Rezeptoren handelt sich demnach vermutlich um diheteromere GluN1/GluN2A- und GluN1/GluN2B-Rezeptoren und um triheteromeren GluN1/GluN2A/GluN2B-Rezeptoren. Um in Zukunft einen besseren therapeutischen Ansatz bieten zu können, untersucht unser Projekt mit elektrophysiologischen Methoden die synaptische und extrasynaptische Expression der GluN2A- und GluN2B-Rezeptoren. Im Hauptteil meiner Arbeit untersuchte ich die synaptische Rolle der NMDA-Rezeptor-Untereinheit GluN2A mit Hilfe von konditionalen GluN2A-Knockout-Mäusen. Um die GluN2A-Untereinheit in einzelnen Neuronen zu deletieren, wurden rekombinante adenoassoziierte Viren (rAAV), die die Cre-Rekombinase exprimieren, in verschiedenen Hirnregionen adulter Mäuse injiziert, bei denen ein Exon des GluN2A Gens von loxP Sequenzen flankiert ist. Die Aktivität der Cre-Rekombinase führt dabei zur Deletion der durch loxP Sequenzen flankierten Sequenz und damit zum Knockout des Proteins. Bei dieser Methode kommt es im Unterschied zum globalen Knockout der GluN2A-Untereinheit, zu einem Fehlen der Untereinheit, nur in mit dem rAAV infizierten Neuronen im postnatalen Gehirn (im folgenden GluN2A^{fl/fl} Neurone). Damit soll das Risiko von Entwicklungsdefekten, die durch das Fehlen der Untereinheit verursacht sind, reduziert werden. Zusätzlich ist die Annahme, dass bei Deletion der Untereinheit in nur wenigen Neuronen die Netzwerkaktivität nicht oder weniger gravierend als bei einer globalen Knockout-Maus verändert ist. Veränderte Netzwerkaktivität kann sekundäre Auswirkungen z.B. auf Neuronenmorphologie und Synapsenfunktion haben, was möglichst verhindert werden soll.

Die elektrophysiologischen Experimente wurden immer mindestens drei Wochen nach Virusinjektion durchgeführt, um sicher zu stellen, dass die GluN2A-Untereinheit nicht mehr exprimiert wird (Nagy 2000). Die infizierten Zellen wurden dann mittels Expression eines fluoreszierenden Proteins (GFP bzw. tdTomato) identifiziert. Virusinjektionen erfolgten in zwei

Regionen des Hippocampus: Gyrus dentatus und CA1, sowie in Striatum und somatosensorischen Cortex.

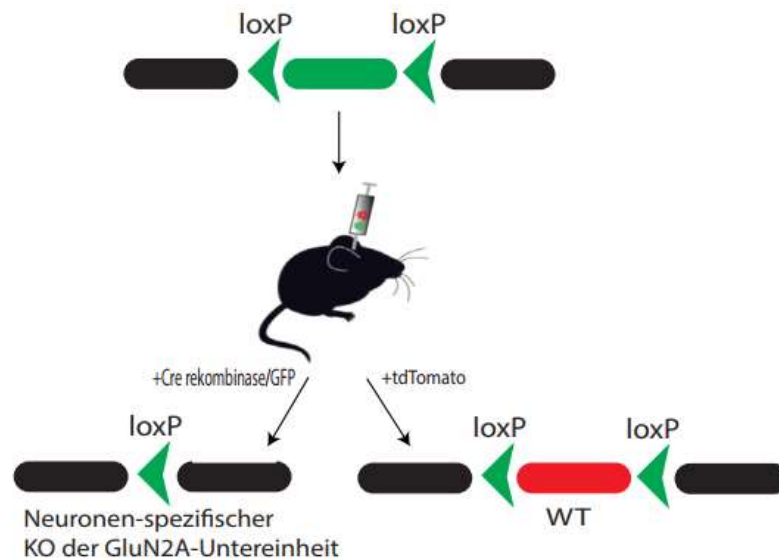


Abbildung 2: Versuchsaufbau. Gen der GluN2A-Untereinheit von loxP Stellen flankiert. Mittels Injektion von Cre-Rekombinase/GFP-exprimierenden Viren kommt es zur Ausschneidung eines Exons der GluN2A-Untereinheit in diesen Neuronen. Injektion von Kontroll-Viren ändert die Sequenz des Gens nicht. Über Expression von GFP bzw. tdTomato können infizierte Neurone identifiziert werden (Maus aus Müller, M.K. 2015).

4.1.1 NMDA/AMPA Ratio

Eine bewährte Untersuchungsart für die Abschätzung der Anzahl der synaptischen NMDA-Rezeptoren stellt die Analyse der NMDA/AMPA Ratios dar. Man geht dabei davon aus, dass die Anzahl der synaptischen AMPA-Rezeptoren durch die Deletion der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten nicht verändert wird. In dem Fall kann eine Veränderung der Zahl der synaptischen NMDA-Rezeptoren durch die Analyse des Verhältnisses der Amplitude der NMDA-Rezeptor-vermittelten Ströme zur Amplitude der AMPA-Rezeptor-vermittelten Ströme (= NMDA/AMPA Ratio) abgeschätzt werden. Die AMPA-Rezeptor-vermittelten Ströme wurden bei einem Haltepotential von -70mV abgeleitet. NMDA-Rezeptor-vermittelten-Ströme wurden bei einem Haltepotential von +40mV gemessen. Die Amplitude der NMDA-Rezeptor-vermittelten-Ströme bei ca. 25ms nach dem Stimulationsartefakt gemessen, da hier die AMPA-Rezeptoren bereits deaktiviert sind.

In den GluN2A^{fl/fl} Neuronen des Gyrus dentatus war das NMDA/AMPA Ratio im Vergleich zum Verhältnis in Wildtyp Neuronen um ca. 25% reduziert (WT = 0.8; GluN2A^{fl/fl} = 0.6). In der benachbarten CA1 Region des Hippocampus konnte eine Reduktion um etwas mehr als die

Hälfte beobachtet werden (WT = 0.49; GluN2A^{fl/fl} = 0.22). Im Striatum reduzierte sich das Verhältnis um etwas mehr als ein Drittel (WT = 0.69; GluN2A^{fl/fl} = 0.43) und im somatosensorischen Cortex konnte eine Reduktion von etwas mehr als die Hälfte beobachten werden (WT= 0.66; GluN2A^{fl/fl} = 0.29). Die Reduktion der NMDA/AMPA Ratios in Neuronen mit GluN2A-Knockout deutet daraufhin, dass ein wesentlicher Anteil der synaptischen NMDA-Rezeptoren in den vier Hirnregionen adulter Mäuse diheteromeren GluN1/GluN2A- und/oder triheteromere GluN1/GluN2A/GluN2B- Rezeptoren sind.

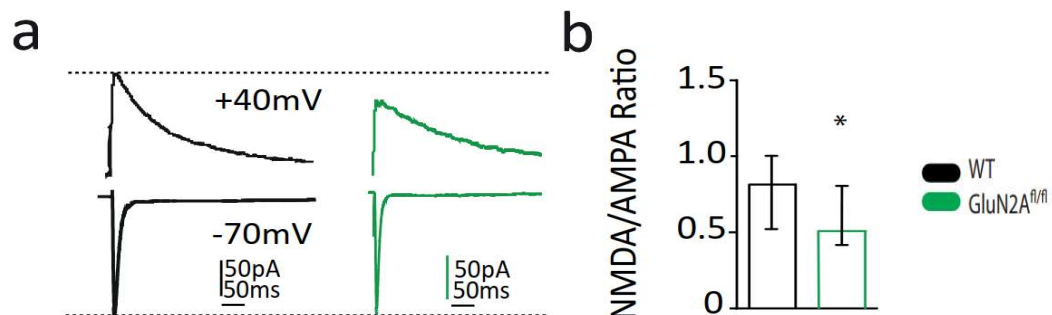


Abbildung 3: NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme in Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Körnerzellen des Gyrus dentatus. A Beispiel Ströme von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Neuronen des Gyrus dentatus. AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme wurden bei einem Haltepotential von -70mV abgeleitet, NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme bei einem Haltepotential von +40mV. B Säulendiagramm der NMDA/AMPA Ratio. Die NMDA/AMPA Ratio ist in GluN2A^{fl/fl} Neuronen signifikant vermindert p = 0.03 (WT n = 45; GluN2A^{fl/fl} n = 25).

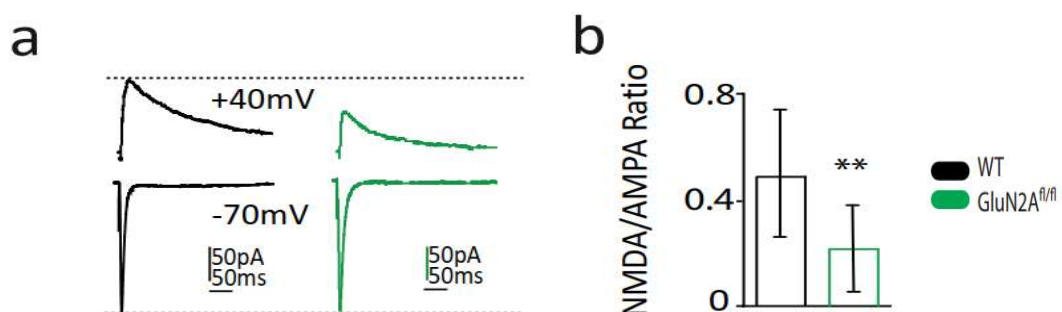


Abbildung 4: NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme in Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Pyramidenzellen von CA1. A Beispiel Ströme von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Neuronen von CA1. AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme wurden bei einem Haltepotential von -70mV abgeleitet, NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme bei einem Haltepotential von +40mV. B Säulendiagramm der NMDA/AMPA Ratio. Die NMDA/AMPA Ratio ist in GluN2A^{fl/fl} Neuronen signifikant vermindert p = 0.003 (WT n = 19; GluN2A^{fl/fl} n = 10).

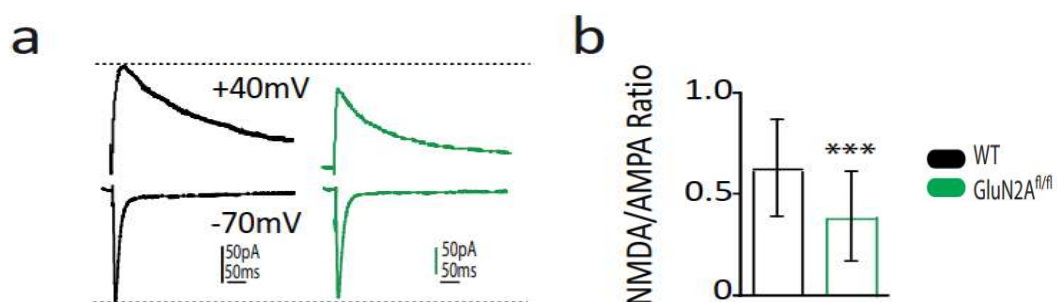


Abbildung 5: NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme in Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Stachelneuronen des Striatums. A Beispiel Ströme von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Neuronen des Striatums. AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme wurden bei einem Haltepotential von -70mV abgeleitet, NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme bei einem Haltepotential von +40mV. B Säulendiagramm der NMDA/AMPA Ratio. Die NMDA/AMPA Ratio ist in GluN2A^{fl/fl} Neuronen signifikant vermindert p = 0.0006 (WT n = 30; GluN2A^{fl/fl} n = 20).

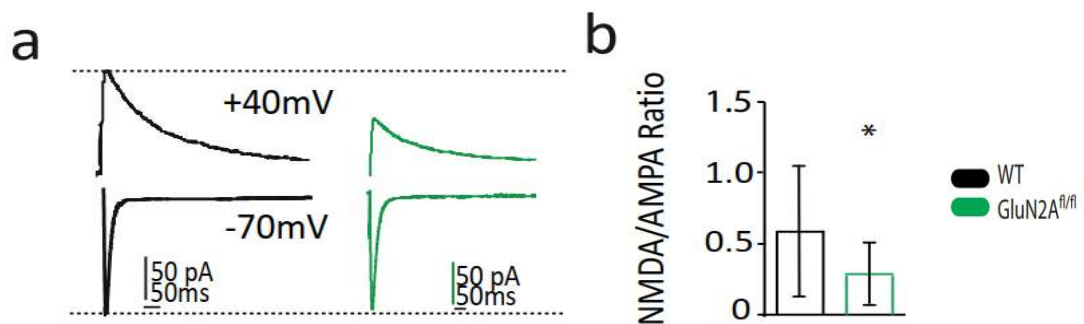


Abbildung 6: NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme in Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Pyramidenzellen der Schicht 5 des somatosensorischen Cortex. A Beispiel Ströme von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Neuronen des somatosensorischen Cortex. AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme wurden bei einem Haltepotential von -70mV abgeleitet, NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme bei einem Haltepotential von +40mV. B Säulendiagramm der NMDA/AMPA Ratio. Die NMDA/AMPA Ratio ist in GluN2A^{fl/fl} Neuronen signifikant vermindert $p = 0.0394$ (WT $n = 18$; GluN2A^{fl/fl} $n = 11$).

4.1.2 mEPSCs

Die Schlussfolgerungen aus der Analyse der NMDA/AMPA Ratios setzt voraus, dass AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme durch Deletion der GluN2A-Untereinheit nicht verändert sind. Das ist aber nicht notwendigerweise der Fall, da NMDA-Rezeptoren eine bedeutende Rolle beim Einbau der AMPA-Rezeptoren in die Synapse spielen (z.B. bei der Induktion von Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression). Außerdem wurde gezeigt, dass die Deletion der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten die Zahl der funktionellen und strukturellen Synapsen beeinflussen kann (Gray et al. 2011). Um die Anzahl synaptischer AMPA-Rezeptoren zu beurteilen, wurden mEPSC Aufnahmen gemacht. AMPA-vermittelte mEPSCs wurden bei einem Haltepotential von -70mV mit Zugabe von APV (NMDA-Rezeptorantagonist), TTX (Blocker von spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen) und Gabazine (GABA_A-Rezeptorantagonist) gemessen.

Eine Veränderung der Anzahl funktioneller Synapsen würde sich durch eine Veränderung in der Frequenz der mEPSC zeigen (Gray et al. 2011). Eine signifikante Veränderung in der Frequenz konnte im Gyrus dentatus, Striatum und Cortex nicht festgestellt werden (Gyrus dentatus: WT = 0.36Hz; GluN2A^{fl/fl} = 0.5Hz; $p = 0.18$; Striatum: WT = 0.94Hz; GluN2A^{fl/fl} = 1.26; $p = 0.22$; somatosensorischer Cortex: WT = 1.93Hz; GluN2A^{fl/fl} = 2.44Hz; $p = 0.58$). Im CA1 hingegen konnte eine signifikant erhöhte mEPSC Frequenz beobachtet werden, was für eine erhöhte Anzahl an funktionellen Synapsen sprechen würde (WT = 0.89Hz; GluN2A^{fl/fl} = 3.19Hz; $p = 0.045$).

Die Amplitude der exzitatorischen postsynaptischen Ströme gibt Auskunft über die Anzahl synaptischer AMPA-Rezeptoren (Gray et al. 2011). Hier konnten sowohl in den Stachelneurone des Striatum als auch in den Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippocampus eine Steigerung der Amplitude beobachtet werden (Striatum: WT = 12.48pA; GluN2A^{fl/fl} = 14.1pA; p = 0.024; CA1: WT = 13.65pA; GluN2A^{fl/fl} = 18.93pA; p = 0.03). Die Amplitude der mEPSCs im Gyrus dentatus und im Cortex war in GluN2A^{fl/fl} Neuronen nicht signifikant verändert. (Gyrus dentatus: WT = 11.3pA; GluN2A^{fl/fl} = 12.2pA; p = 0.07; somatosensorischer Cortex: WT = 18.53pA; GluN2A^{fl/fl} = 16.77pA; p = 0.43). Die Steigerung der Amplitude in CA1 und Striatum deutet auf eine durch den konditionellen Knockout bedingte gesteigerte Anzahl synaptischer AMPA-Rezeptoren hin.

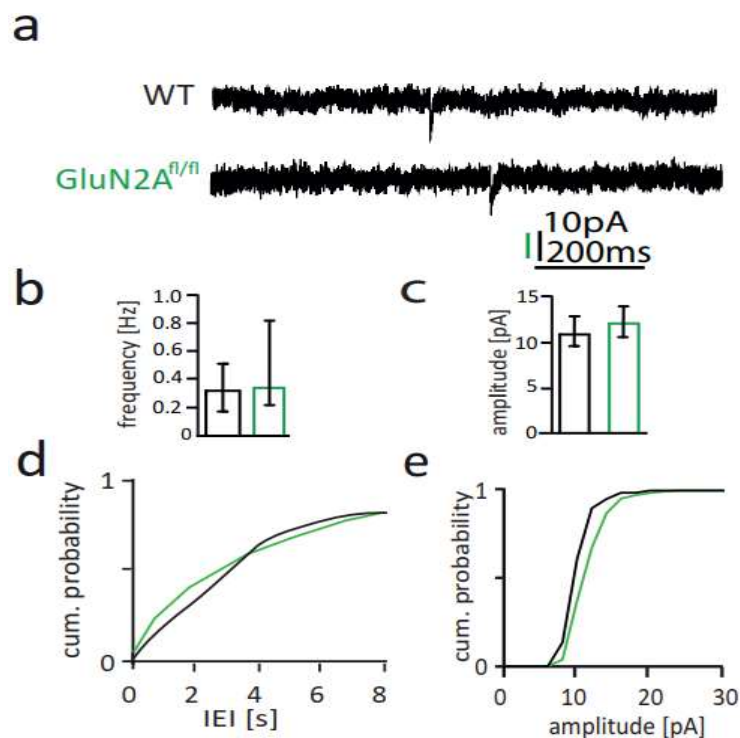


Abbildung 7: mEPSC Aufnahmen von adulten Körnerzellen im Gyrus dentatus von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen. **A** Beispiel Messung von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen. **B** Säulendiagramm der mEPSC Frequenz. Die mEPSC Frequenz ist nicht signifikant erhöht in GluN2A^{fl/fl} Neuronen p = 0.41 (WT n = 19; GluN2A^{fl/fl} n = 19). **C** Säulendiagramm der mEPSC Amplitude. Die Amplitude der mEPSC zeigt keine signifikante Veränderung zwischen WT und GluN2A^{fl/fl} p = 0.07 **D** Kumulative Frequenz Verteilung des Intervalls zwischen den einzelnen mEPSCs (Interevent Interval = IEI) zeigt keine Veränderung zwischen WT und GluN2A^{fl/fl} **E** Kumulative Wahrscheinlichkeitsverteilung der Amplitude zeigt keine Veränderung zwischen WT und GluN2A^{fl/fl}.

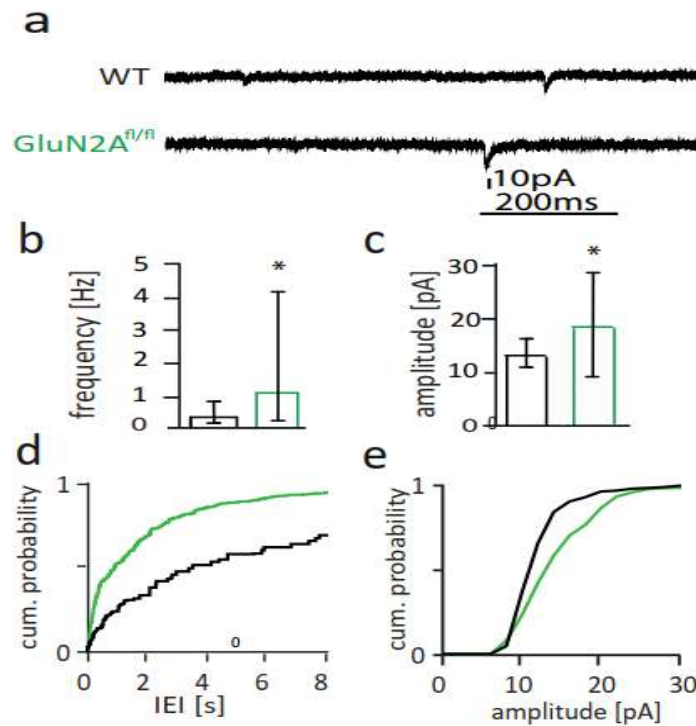


Abbildung 8: mEPSC Aufnahmen von adulten CA1 Neuronen von Wildtyp und $\text{GluN2A}^{\text{fl/fl}}$ Mäusen. A Beispiel Messungen von Wildtyp und $\text{GluN2A}^{\text{fl/fl}}$ Mäusen. B Säulendiagramm der mEPSC Frequenz. Die mEPSC Frequenz ist signifikant erhöht $p = 0.04$ (WT $n = 19$; $\text{GluN2A}^{\text{fl/fl}}$ $n = 14$). C Säulendiagramm der mEPSC Amplitude. Die Amplitude der mEPSC zeigt eine signifikante Erhöhung von $\text{GluN2A}^{\text{fl/fl}}$ im Vergleich zum WT $p = 0.0008$. D Kumulative Frequenz Verteilung des Intervalls zwischen den einzelnen mEPSCs (Interevent Interval = IEI) zeigt eine Veränderung zwischen WT und $\text{GluN2A}^{\text{fl/fl}}$. E Kumulative Wahrscheinlichkeitsverteilung der Amplitude zeigt keine Veränderung zwischen WT und $\text{GluN2A}^{\text{fl/fl}}$.

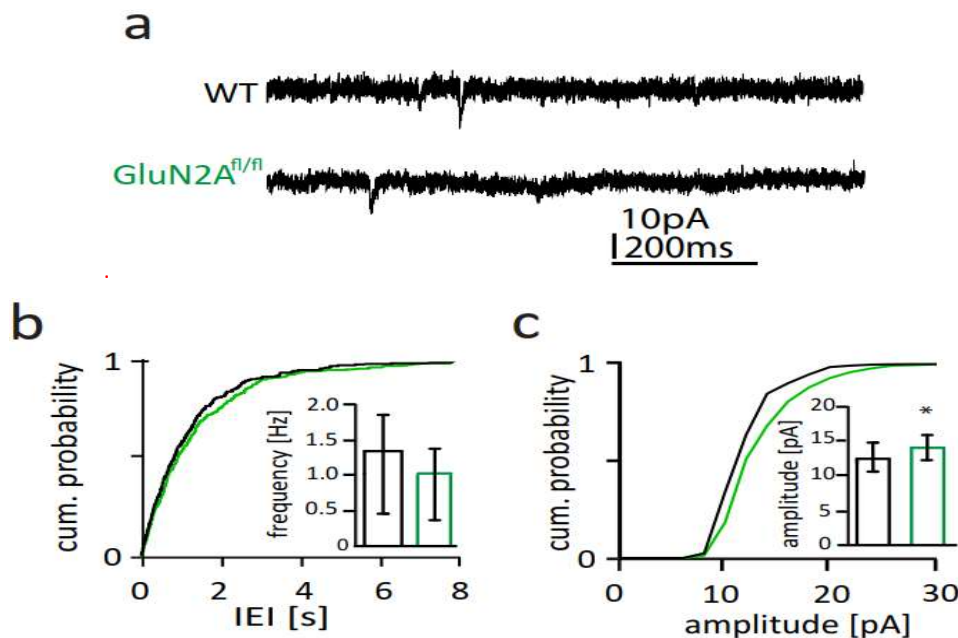


Abbildung 9: mEPSC Aufnahmen von adulten Stachelneuronen des Striatums von Wildtyp und $\text{GluN2A}^{\text{fl/fl}}$ Mäusen. A Beispiel Messungen von Wildtyp und $\text{GluN2A}^{\text{fl/fl}}$ Mäusen. B Säulendiagramm der mEPSC Frequenz mit kumulativer Frequenz Verteilung. Die mEPSC Frequenz ist nicht signifikant erhöht in $\text{GluN2A}^{\text{fl/fl}}$ Neuronen (WT $n = 17$; $\text{GluN2A}^{\text{fl/fl}}$ $n = 17$) $p = 0.29$. Die kumulative Frequenz Verteilung des Intervalls zwischen den einzelnen mEPSCs (Interevent Interval = IEI) zeigt keine Veränderung zwischen WT und $\text{GluN2A}^{\text{fl/fl}}$. C Säulendiagramm der mEPSC Amplitude mit kumulativer Wahrscheinlichkeitsverteilung der Amplitude. Die Amplitude der mEPSC zeigt eine signifikante Erhöhung von $\text{GluN2A}^{\text{fl/fl}}$ im Vergleich zum WT $p = 0.025$. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Amplitude zeigt keine Veränderung zwischen WT und $\text{GluN2A}^{\text{fl/fl}}$.

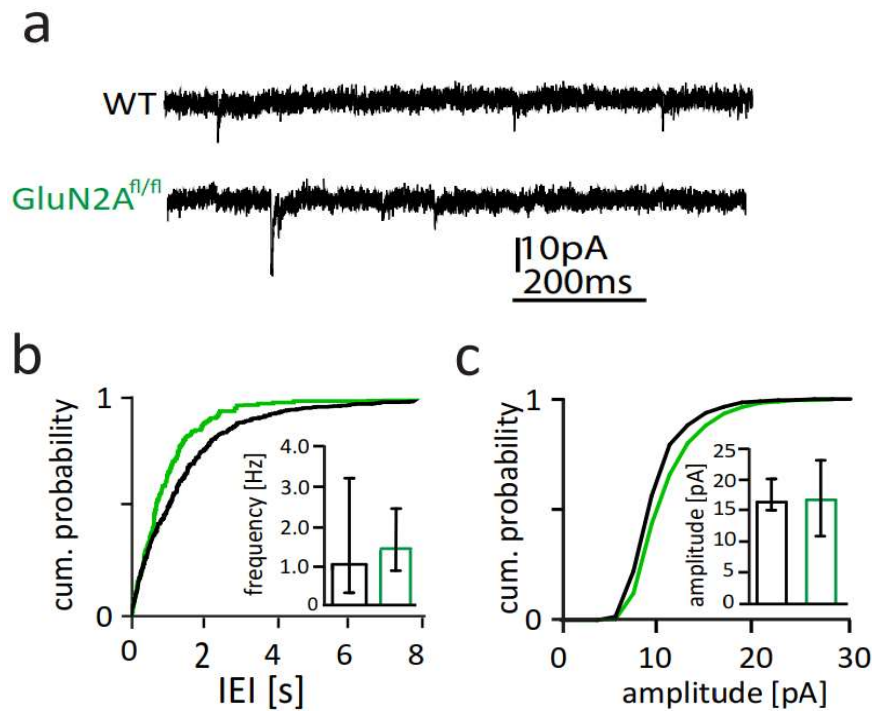


Abbildung 10: mEPSC Aufnahmen von Pyramidenzellen der 5 Schicht des primären somatosensorischen Cortex von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen. A Beispiel Messungen von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen. **B** Säulendiagramm der mEPSC Frequenz mit kumulativer Frequenz Verteilung. Die mEPSC Frequenz ist nicht signifikant erhöht in GluN2A^{fl/fl} Neuronen (WT n = 18; GluN2A^{fl/fl} n = 19) p = 0.37. Die kumulative Frequenz Verteilung des Intervalls zwischen den einzelnen mEPSCs (Interevent Interval = IEI) zeigt keine Veränderung zwischen WT und GluN2A^{fl/fl}. **C** Säulendiagramm der mEPSC Amplitude mit kumulativer Wahrscheinlichkeitsverteilung der Amplitude. Die Amplitude der mEPSC zeigt keine signifikante Veränderung zwischen WT und GluN2A^{fl/fl} p = 0.44. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Amplitude zeigt keine Veränderung zwischen WT und GluN2A^{fl/fl}.

4.1.3 Paired-Pulse Ratio

Die erhöhte mEPSC Frequenz in GluN2A^{fl/fl} Neuronen der CA1 Region deutet darauf hin, dass hier die Deletion der GluN2A-Untereinheit die Zahl der funktionellen Synapsen erhöht. Eine alternative Interpretation könnte eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Freisetzung von Glutamat-Vesikeln sein. In der Tat sind NMDA-Rezeptoren auch präsynaptisch lokalisiert und können somit Einfluss auf die Kurzzeitplastizität ausüben. Das ist bei Injektion der rAAVs in die CA1 Region zwar wenig wahrscheinlich, da die Injektion weitestgehend auf die CA1 Region beschränkt blieb und nur sehr wenige der auf CA1 projizierende Neurone (v.a. in der CA3 Region) infiziert wurden. Dennoch habe ich in Kontrollexperimenten die Kurzzeitplastizität über Messung der Paired-Pulse Ratios von synaptischen Strömen analysiert. Bei einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Freisetzung präsynaptischer Vesikel würde man dabei typischerweise reduzierte Paired-Pulse Ratios beobachten. Für die Analyse der Paired-Pulse Ratios wurden die Axone, die auf infizierte Neurone projizieren extrazellulär mit zwei Pulsen

mit einem Interpuls-Intervall von 50ms stimuliert. Die Messungen zeigten, dass die Deletion von GluN2A in keiner der untersuchten Regionen (Gyrus dentatus, CA1, Striatum und somatosensorischem Cortex) die Paired-Pulse Ratio signifikant veränderte (Gyrus dentatus: WT = 1.35; GluN2A^{fl/fl} = 1.34; p = 0.87; CA1: WT = 1.37; GluN2A^{fl/fl} = 1.48; p = 0.16 ; Striatum: WT = 1.16; GluN2A^{fl/fl} = 1.13; p = 0.44; somatosensorischer Cortex: WT = 1.33; GluN2A^{fl/fl} = 1.47; p = 0.28).

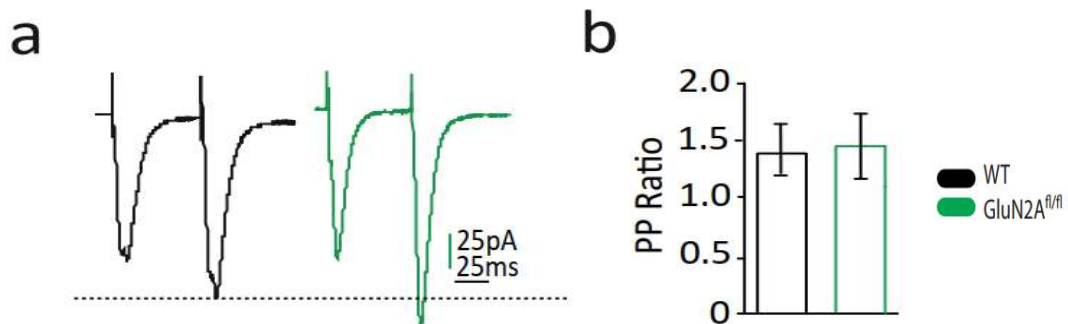


Abbildung 11: Kurzzeitplastizität in Körnerzellen des Gyrus dentatus in Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen während 50 Hz Paired Pulse Stimulation. A Beispiel Ströme von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen. B Säulendiagramm der 50 Hz Paired Pulse Stimulation durch Stimulation des lateral perforant path. Kein signifikanter Unterschied zwischen WT und GluN2A^{fl/fl} p = 0.87 (WT n = 25; GluN2A^{fl/fl} n = 15).

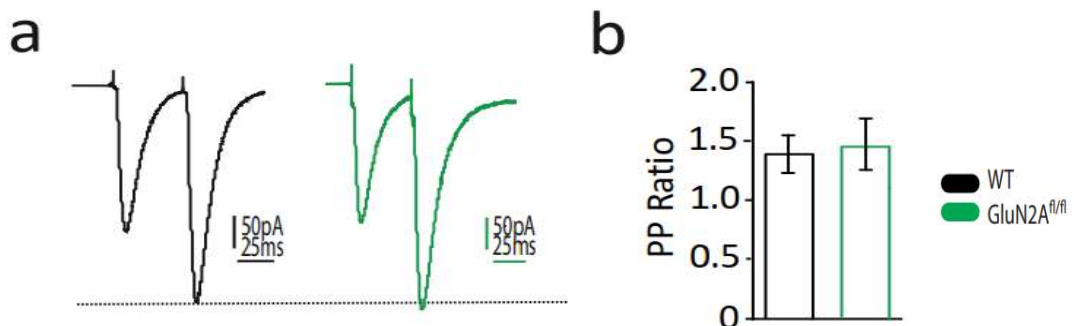


Abbildung 12: Kurzzeitplastizität in CA1 Pyramidenneuronen in Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen während 50 Hz Paired Pulse Stimulation. A Beispiel Messungen von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen. B Säulendiagramm der 50 Hz Paired Pulse Stimulation. Kein signifikanter Unterschied zwischen WT und GluN2A^{fl/fl} p = 0.16 (WT n = 22; GluN2A^{fl/fl} n = 10).

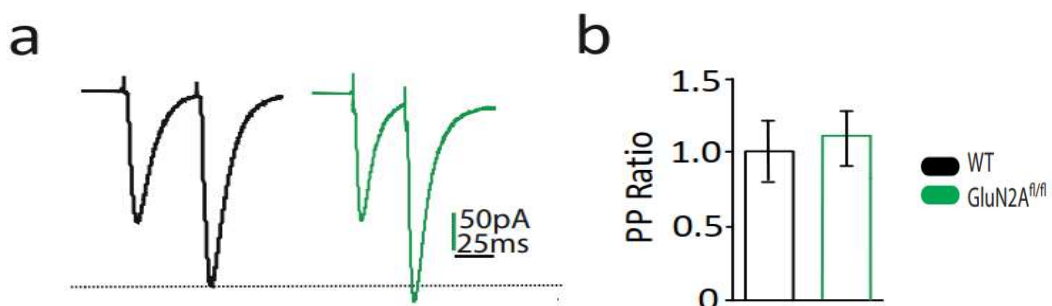


Abbildung 13: Kurzzeitplastizität der Stachelneurone des Striatums in Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen während 50 Hz Paired Pulse Stimulation. A Beispiel Ströme von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen. B Säulendiagramm der 50 Hz Paired Pulse Stimulation. Kein signifikanter Unterschied zwischen WT und GluN2A^{fl/fl} p = 0.44 (WT n = 19; GluN2A^{fl/fl} n = 15).

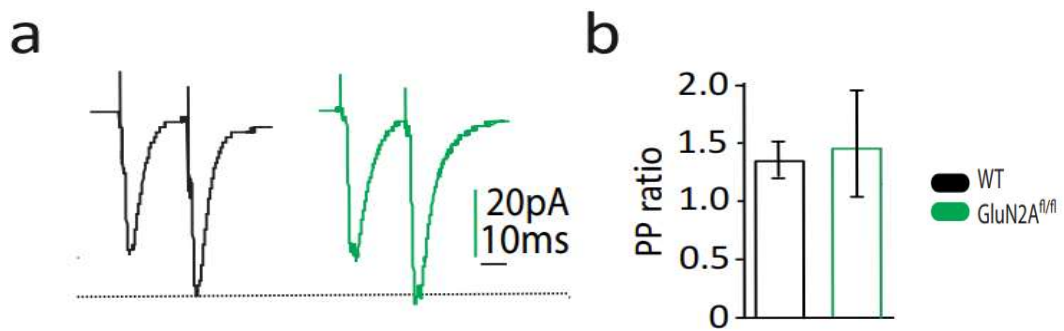


Abbildung 14: Kurzzeitplastizität von Motoneuronen des primären somatosensorischen Cortex von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen während 50 Hz Paired Pulse Stimulation. A Beispiel Ströme von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen. **B** Säulendiagramm der 50 Hz Paired Pulse Stimulation. Kein signifikanter Unterschied zwischen WT und GluN2A^{fl/fl} $p = 0.28$ (WT $n = 18$; GluN2A^{fl/fl} $n = 12$).

4.1.4 NMDA-Rezeptor Kinetik (Decay)

Die verschiedenen NMDA-Rezeptorsubtypen haben einen großen Einfluss auf die Kinetik des Rezeptors. Diheteromere GluN1/GluN2B-Rezeptoren deaktivieren langsamer als diheteromere GluN1/GluN2A-Rezeptoren. Interessanterweise liegt die Deaktivierungszeitkonstante der triheteromeren GluN1/GluN2A/GluN2B-Rezeptoren deutlich näher an der Zeitkonstante der GluN1/GluN2A-Rezeptoren als an der Zeitkonstante der GluN1/GluN2B-Rezeptoren (Deaktivierungszeitkonstante GluN2A = 27,3 - 40ms; GluN2B = 233-315ms; GluN2A/GluN2B = 44ms (Paoletti et al. 2013; Rauner und Köhr 2011, Tovar et al. 2013)). Das bedeutet, dass bei einer Mischung von diheteromeren GluN1/GluN2A-Rezeptoren und GluN1/GluN2B-Rezeptoren eine deutlich langsamere Deaktivierung der NMDA-Rezeptor-vermittelten Ströme als bei reiner Expression von triheteromeren GluN1/GluN2A/GluN2B zu erwarten ist. Um eine Einschätzung der Komposition der synaptischen NMDA-Rezeptoren zu erhalten, habe ich Decays von evozierten synaptischen NMDA-Rezeptor-vermittelten Strömen in Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Neuronen analysiert. Im Prinzip kann sowohl Deaktivierung als auch Desensibilisierung zur Reduktion der Amplitude synaptischer Ströme, also zum Decay nach der Stromspitze (peak), beitragen. Glutamat ist aber nur sehr kurz im synaptischen Spalt vorhanden (wenige Milisekunden), so dass bei den im Verhältnis dazu langsameren NMDA-Rezeptor-vermittelten Strömen der Decay im Wesentlichen über die Deaktivierung bestimmt wird (und demnach ähnliche Zeitkonstanten aufweist). Bei der Ableitung der NMDA-Rezeptor-vermittelten Ströme war das Haltepotenzial -30mV, da bei diesem Potenzial kein Mg-Block der Rezeptoren zu erwarten ist.

Die Deletion der GluN2A-Untereinheit verlangsamte im Gyrus dentatus den Decay von 35ms auf 74ms ($p = <0.0001$). In CA1 Neuronen änderte sich der Decay von 76ms zu 127ms ($p = 0.0014$). Im Striatum stieg der Decay durch den Knockout von 53ms auf 122ms ($p = <0.00001$) und im somatosensorischen Cortex verlängerte sich der Decay von 37ms auf 80ms ($p = 0.001$). Die Ergebnisse zeigen einen langsameren Decay in GluN2A^{fl/fl} Neuronen als in WT Neuronen. Dieser langsame Decay kann durch die Expression von in GluN2A^{fl/fl} Neuronen exprimierten diheteromeren GluN2B-enhaltende-Rezeptoren erklärt werden.

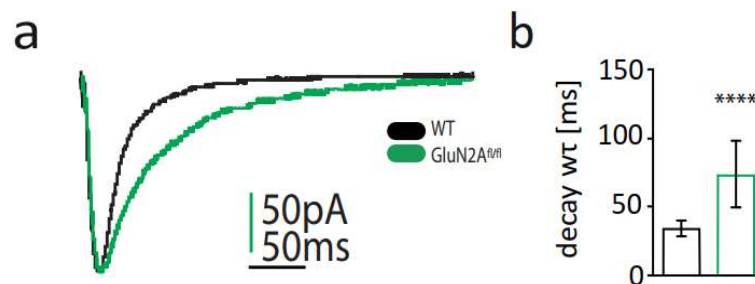


Abbildung 15: NMDA-Rezeptor Decays von Körnerzellen des Gyrus dentatus von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen. **A** Beispiel Ströme von NMDA-Rezeptor-vermittelten Strömen von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen. **B** Säulendiagramm der Decay Zeitkonstanten (τ_{Deca}) mit signifikant erhöhten Werten in GluN2A^{fl/fl} $p = <0.0001$ (WT $n = 21$; GluN2A^{fl/fl} $n = 16$)

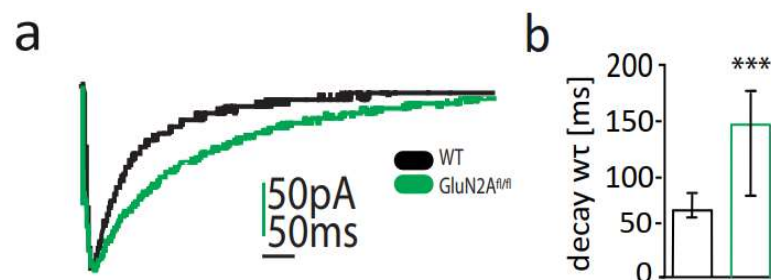


Abbildung 16: NMDA-Rezeptor Decays von Pyramidenzellen des CA1 von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} -Mäusen. **A** Beispiel Messungen von NMDA-Rezeptor-vermittelten Strömen von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl}-Mäusen. **B** Säulendiagramm der Decay Zeitkonstanten (τ_{Deca}) mit signifikant erhöhten Werten in GluN2A^{fl/fl} $p = 0.008$ (WT $n = 15$; GluN2A^{fl/fl} $n = 11$)

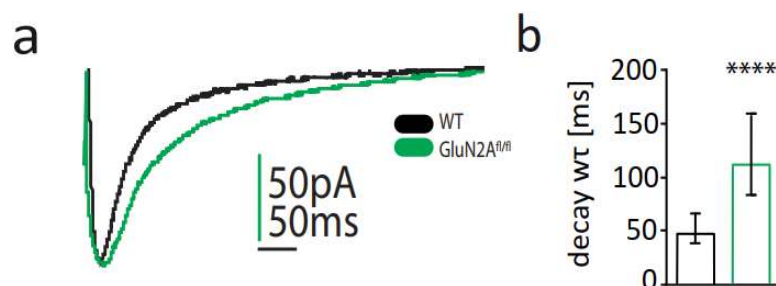


Abbildung 17: NMDA-Rezeptor Decays von Stachelneuronen des Striatums von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen. **A** Beispiel Ströme von NMDA-Rezeptor-vermittelten Strömen von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen. **B** Säulendiagramm der Decay Zeitkonstanten (τ_{Deca}) mit signifikant erhöhten Werten in GluN2A^{fl/fl} $p = <0.0001$ (WT $n = 17$; GluN2A^{fl/fl} $n = 13$).



Abbildung 18: NMDA-Rezeptor Decays von Pyramidenzellen der 5 Schicht des primären somatosensorischen Cortex von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen. **A** Beispiel Ströme von NMDA-Rezeptor-vermittelten Strömen von Wildtyp und GluN2A^{fl/fl} Mäusen. **B** Säulendiagramm der Decay Zeitkonstanten (τ_{Deca}) mit signifikant erhöhten Werten in GluN2A^{fl/fl} $p = 0.0012$ (WT $n = 16$; GluN2A^{fl/fl} $n = 12$).

4.2 Deletion der GluN1-Untereinheit über Cre-Rekombinase Expression

Die Decay Zeitkonstante der synaptischen NMDA-Rezeptor-vermittelten Ströme war nach Deletion der GluN2A-Untereinheit vor allem in den Körnerzellen des Gyrus Dentatus erstaunlich niedrig. Das könnte z.B. über eine unvollständige Deletion der GluN2A-Untereinheit drei Wochen nach rAAV Injektion oder fehlerhafte Selektion von nur vermeintlich rAAV infizierten Neuronen erklärt werden. Die Zeit nach Injektion der rAAVs sollte im Prinzip ausreichend für die erfolgreiche Deletion der Untereinheit sein (Gray et al. 2011). In Kontrollexperimenten habe ich dennoch die Methode der Deletion einer NMDA-Rezeptor-Untereinheit mittels rAAV-vermittelter Expression der Cre-Rekombinase getestet, indem ich mit der gleichen Methode die GluN1-Untereinheit ausgeschaltet habe. Bei erfolgreicher Deletion der GluN1-Untereinheit sollten keine NMDA-Rezeptor-vermittelten Ströme zu messen sein. Für diese Experimente habe ich Cre-Rekombinase exprimierende rAAVs in den Gyrus Dentatus von Mäusen injiziert, bei denen ein Exon des GluN1 Gens mit loxP Sequenzen flankiert ist (GluN1^{fl/fl}). In Kontrollexperimenten wurden Cre-Rekombinase exprimierenden AAV in das Gehirn von Wildtyp Mäusen (WT+rAAV-Cre) injiziert. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass die Injektion der Cre-Rekombinase per se die Expression der GluN1-Untereinheit verändert. In einem weiteren Kontrollexperiment wurde ein tdTomate-exprimierender rAAV in den Gyrus dentatus von GluN1^{fl/+} Mäusen injiziert. Dadurch wurde analysiert, ob die Infektion mit einem rAAV einen Einfluss auf die Expression der GluN1-Untereinheit hat. Die elektrophysiologischen Analysen wurden 3-6 Wochen nach Injektion in den Gyrus dentatus adulter Mäuse durchgeführt. Die erhobenen Daten wurden, mit denen

von nicht infizierten Körnerzellen vergleichen (GluN1 Kontrolle = Control = keine rAAV Injektion).

Um den Einfluss der AAV Injektion bzw. der Expression der Cre-Rekombinase auf die Expression von NMDA-Rezeptoren zu untersuchen, wurden NMDA-Rezeptor und AMPA-Rezeptor-vermittelten Ströme abgeleitet (siehe oben) und die Amplituden der Ströme in ein Verhältnis zueinander gesetzt. Abbildung 18 zeigt den Einfluss der verschiedenen Kondition auf die NMDA/AMPA Ratio. Expression der Cre-Rekombinase für 3 Wochen über die Injektion des rAAV-CRE-GFP führte zu einer signifikanten Reduktion des NMDA/AMPA Ratio (GluN1^{fl/fl}). Injektion des gleichen rAAV-CRE-GFP in Kontrollmäuse (WT+rAAV-Cre) führte zu keiner signifikanten Veränderung des NMDA/AMPA Ratio. Ebenfalls zeigte die Gruppe mit der Injektion des tdTomato exprimierenden Kontrollvirus bezüglich der NMDA/AMPA Ratio keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp (GluN1^{fl/+}+tdTomato). Die Kurzzeitplastizität synaptischer Ströme war in Neuronen mit Deletion der GluN1-Untereinheit nicht verändert. Bei den weiteren Kontrollexperimenten mit Injektion der Cre-Rekombinase in Kontrollmäuse bzw. mit Injektion des tdTomato exprimierenden Kontrollvirus in GluN1^{fl/+} Mäuse war die Kurzzeitplastizität ebenfalls nicht verändert (siehe Abbildung 18).

Schließlich sollte in Kontrollexperimenten ausgeschlossen werden, dass Deletion der NMDA-Rezeptoren, Cre-Rekombinase Expression oder Infektion mit rAAVs aktive und passive elektrophysiologische Eigenschaften von Neuronen beeinflussen. Nach Deletion der GluN1-Untereinheit und auch bei Neuronen beider zusätzlicher Kontrollexperimente waren alle untersuchten Parameter wie zum Beispiel Schwellenpotenzial, Aktionspotenzial Amplitude und Eingangswiderstand von Körnerzellen unverändert (siehe Abbildung 19).

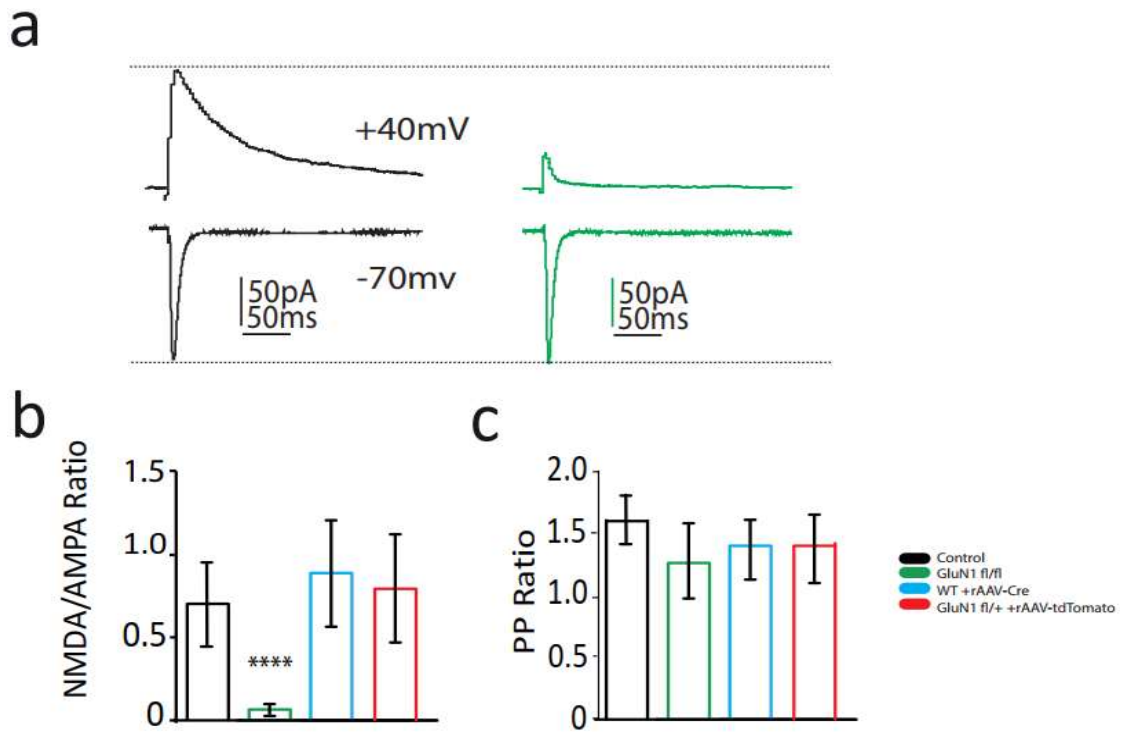


Abbildung 19: NMDA/AMPA Ratio und Kurzzeitplastizität von Körnerzellen des Gyrus dentatus in Control, GluN1^{fl/fl}, WT+rAAV-Cre und GluN1^{fl/+}+tdTomato Mäusen. A Beispiel Messungen von Control und GluN1^{fl/fl}. **B** Säulendiagramm der NMDA/AMPA Ratio. NMDA/AMPA Ratio kein signifikanter Unterschied außer zwischen der GluN1^{fl/fl} und den anderen Gruppen. (Control n = 17; GluN1^{fl/fl} n = 19; , WT+rAAV-Cre n = 18; GluN1^{fl/+}+tdTomato n = 17). **C** Säulendiagramm der Paired-Pulse Ratio. (Control n = 17; GluN1^{fl/fl} n = 18; WT+rAAV-Cre n = 18; GluN1^{fl/+}+tdTomato n = 17). Keine signifikante Veränderung des Paired-Pulse Ratio.

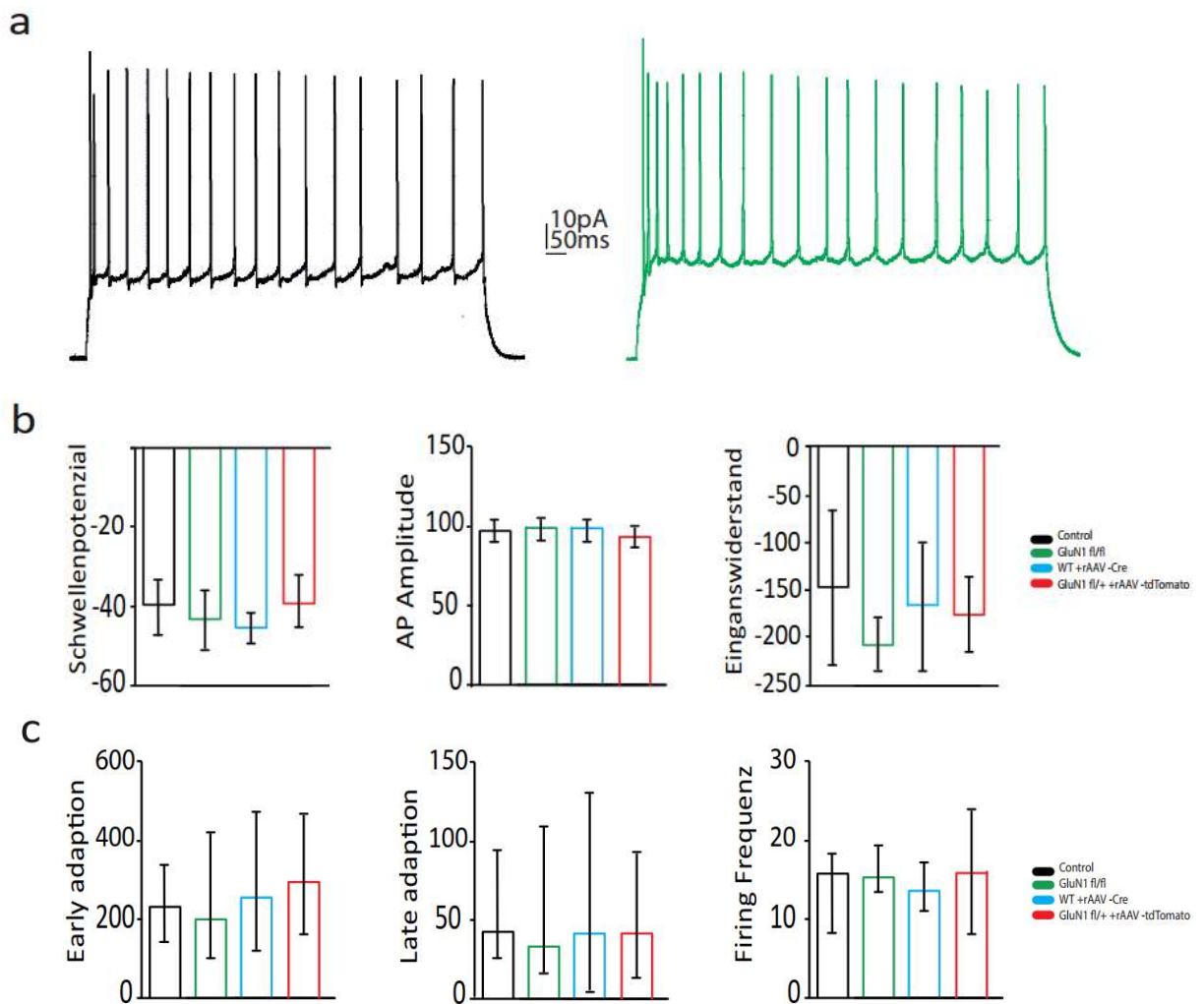


Abbildung 20: Passive und aktive Membraneigenschaften der Körnerzellen des Gyrus dentatus in Control, GluN1^{fl/fl}, WT+rAAV-Cre und GluN1^{fl/fl}+tdTomato Mäusen. A Beispiel Messungen von Control und GluN1^{fl/fl}. **B** Säulendiagramme des Schwellenpotenzials, AP Amplitude und Eingangswiderstands des Firing Pattern (Control n = 17; GluN1^{fl/fl} n = 17; WT+rAAV-Cre n = 19; GluN1^{fl/fl}+tdTomato n = 19). Keine signifikante Veränderung des Schwellenpotenzials, der AP Amplitude und des Eingangswiderstand durch den Knockout. **C** Säulendiagramme der Early adaption, Late adaption und der Firing Frequenz (Control n = 17; GluN1^{fl/fl} n = 17; WT+rAAV-Cre n = 19; GluN1^{fl/fl}+tdTomato n = 19). Keine signifikante Veränderung der der Early adaption, Late adaption und der Firing Frequenz.

5. Diskussion

Meine Doktorarbeit ist ein Teilprojekt einer größeren Studie des Labors, in der die synaptische und extrasynaptische Verteilung der zwei mehrheitlich im Vorderhirn exprimierten Untereinheiten des NMDA-Rezeptors (GluN2A und GluN2B) untersucht wird. Mein Teilprojekt konzentriert sich auf die synaptische Expression der GluN2A-Untereinheit in vier verschiedenen Gehirnregionen. Die bisherigen veröffentlichten Studien zu diesem Thema ließen vermuten, dass die GluN2A-Untereinheit vor allem synaptisch und die GluN2B-Untereinheit mehrheitlich extrasynaptisch lokalisiert ist (Gladding und Raymond 2011, Tovar und Westbrook 1999; Stocca und Vinci 1998). Viele der Studien zur Expression von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten wurden allerdings an Zellkulturen durchgeführt. Das erschwert die Interpretation der Daten, bzw. erlaubt nur in sehr eingeschränktem Maße Rückschlüsse auf die Expression der Untereinheiten im Gehirn adulter Mäuse. Neurone überleben im Allgemeinen nur wenige Wochen in Zellkultur. Die Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten in diesen Neuronen gleicht daher am ehesten der Expression in Neuronen, die sich noch in Entwicklung befinden. Die Ergebnisse von Studien mit kultivierten Neuronen ist demnach für die Einschätzung der Expression der NMDA-Rezeptoren im Gehirn von erwachsenen Mäusen und deren Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wenig aussagefähig (Davies et al. 1988).

NMDA-Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von ZNS-Erkrankungen. Die Kenntnis der Expression und Verteilung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten in Neuronen des erwachsenen Gehirns kann daher von Interesse für die Entwicklung effektiverer und nebenwirkungsärmerer Therapien von ZNS-Erkrankungen sein. Um die Rolle der der GluN2A-Untereinheit in Hippocampus, Striatum und somatosensorischen Cortex ermitteln zu können, habe ich konditionelle GluN2A-Knockout-Mäuse verwendet. Durch Injektion eines Cre-Rekombinase-exprimierenden Virus kommt es zu einer Deletion der GluN2A-Untereinheit in virusinfizierten Neuronen. Mit den Neuronen dieser Versuchstiere wurden elektrophysiologische Messungen durchgeführt. Die Analysen gaben mir Auskunft über 1) die synaptische Expression der GluN2A-Untereinheit, 2) den Einfluss der GluN2A-Untereinheit auf die Kinetik des NMDA-Rezeptors, 3) den Effekt der Deletion der GluN2A-Untereinheit auf Anzahl und Stärke der Synapsen und 4) auf synaptische Kurzzeitplastizität.

5.1 Methodik der Untersuchung von NMDA-Rezeptoren

Die Untersuchung der NMDA-Rezeptoren und insbesondere deren Komposition stellt für die Forschung bislang immer noch eine Herausforderung dar. Es gibt unterschiedliche Methoden, mit denen der NMDA-Rezeptor untersucht werden kann. Hierzu zählen z.B. In Situ-Hybridisierung, Western Blots, Immunhistochemie und die Elektrophysiologie. Jede von ihnen bietet Vor- und Nachteile. Mit in Situ-Hybridisierungen können Kenntnisse über die Expression der mRNA erworben werden, jedoch nicht über Proteine oder deren subzelluläre Lokalisation. Western Blots sind hilfreich für die Untersuchung von Proteinen, jedoch müssen diese gut isolierbar sein, was bei NMDA-Rezeptoren nicht der Fall ist. Zudem geht durch die Extraktion der Proteine die Aussage über die Lokalisation der untersuchten Proteine weitgehend verloren. Immunhistochemie funktioniert mittels Antikörperdetektion. Lokalisationsanalysen sind in Zellkulturen möglich, in Hirnschnitten jedoch schwierig. Insbesondere die Differenzierung synaptischer und extrasynaptischer lokalisierter Strukturen ist schwierig. Auch können intrazelluläre von extrazellulären Epitope in Färbungen an Hirnschnitten nicht sicher unterschieden werden. Mittels Immunhistochemie auf Hirnschnitten können also intrazelluläre Proteine nicht von membranständigen Proteinen differenziert werden. Western Blots und Immunhistochemie haben zudem noch Schwierigkeiten zwischen diheteromere von triheteromeren Rezeptoren zu unterscheiden. Die Elektrophysiologie bietet den Vorteil, individuelle Zellen untersuchen zu können und Erkenntnisse über diese zu gewinnen. Ein Nachteil ist, dass Rezeptortypen nicht mit hoher Spezifität pharmakologisch blockiert werden können. Die Deletion bestimmter NMDA-Rezeptoren ist allerdings mit Knockout-Mäusen möglich. Die Interpretation der elektrophysiologischen Daten wird allerdings aufgrund der Heterogenität der Neuronen in den untersuchten Hirnregionen erschwert. Jedoch kann mittels unterschiedlicher Mess-Methoden zwischen synaptischen und extrasynaptischen NMDA-Strömen unterschieden werden. Obwohl die Patch-Clamp Methode bei von Engelhardt et al. 2008 mit einer konditionierten GluN2B-Knockout-Maus verwendet wurde und hier keine kompensatorischen Hochregulierungen anderer Untereinheiten festgestellt wurde, kann es trotzdem sein, dass der konditionierte Knockout der GluN2A-Untereinheit zu einer kompensatorischen Veränderung geführt hat. Des Weiteren ist zu bedenken, dass es sich bei NMDA-Rezeptoren um mobile Rezeptoren handelt. NMDA-Rezeptoren können sich wie Shuttles zwischen der intra- und extrasynaptischen Seite hin und her bewegen. Deshalb ist

eine Angabe von Rezeptoranzahlen in der Elektrophysiologie nur eine Momentaufnahme (Tovar und Westbrook 2002; Petralia et al. 2010).

Die Analyse der Decays und der Vergleich mit Kinetiken von NMDA-Rezeptoren aus anderen Studien kann uns Aufschluss darüber geben, ob sich postsynaptisch eher GluN2A- oder GluN2B-enhaltende Rezeptoren aufhalten. Durch den Knockout der GluN2A-Untereinheit kann man die Kinetiken der diheteromeren GluN1/GluN2B-Rezeptoren messen. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss allerdings bedacht werden, dass die GluN1-Isoformen die Kinetiken der NMDA-Rezeptoren ebenfalls beeinflussen. Zum Beispiel haben GluN1 Splice Varianten die Exon 5 enthalten einen schnelleren Decay und zusätzlich auch eine höhere Offenwahrscheinlichkeit als die ohne Exon 5 (Vance et al. 2012; Rumbaugh et al. 2000).

Es muss bedacht werden, dass schon allein innerhalb einer simpel aufgebauten Hirnregion wie CA1 oder Striatum eine Zellvielfalt zu finden ist. Die unterschiedlichen Neuronentypen können mit der Patch-Clamp Methode nicht sicher auseinandergehalten werden (Soltesz und Losonczy 2018; Gerfen und Surmeier, 2011; Le Moine et al. 1991; Onn et al. 1994). Die Morphologie der Zellen kann einen Anhaltspunkt bieten, da es aber beispielsweise im Striatum zwei verschiedene Arten von Stachelneuronen gibt, deren Morphologie sehr ähnlich ist, ist eine klare Zuordnung schwierig. Die Heterogenität der Neuronen sollte also bei Bewertung der Ergebnisse mit in Betracht gezogen werden. Im Gyrus dentatus können sich die kinetischen Eigenschaften der Zellen, schon allein durch die dort fortbestehende Neurogenese, unterscheiden, da junge Zellen andere Rezeptor-Untereinheitenkonstellationen als ältere Neurone aufweisen (Ambrogini et al. 2004; Wang et al. 2000). Diesen Faktor kann man minimieren, indem nur an Zellen der äußeren Schicht innerhalb des Gyrus dentatus elektrophysiologische Analysen durchgeführt werden, da neugeborene Körnerzellen primär in der inneren Schicht lokalisiert sind.

In meiner Studie habe ich vorwiegend Ableitungen durchgeführt, bei denen die Spannung geklemmt wurde („voltage clamp“). Das bedeutet, dass man mit Hilfe seiner Pipette eine bestimmte Spannung anlegt („clamp“), um das Neuron zum Beispiel zu depolarisieren und die dann entstehenden Ströme zu messen. Der Idealfall wäre dabei, dass jeder Punkt innerhalb der Zelle das gewünschte Potential aufweist. Das ist aber insbesondere in distalen Abschnitten der Neuronen nur eingeschränkt möglich. Das bedeutet, dass z.B. bei der Messung von NMDA-Rezeptor Strömen das Potenzial in distalen Abschnitten der Dendriten nicht bei +40mV liegt, sondern weniger positiv. Damit würde der elektrische Gradient kleiner

als vermutet und damit die gemessene Stromamplitude zu klein. Wegen dieses „Space Clamp Problem“ werden demnach z.B. bei den Messungen der NMDA/AMPA Ratios im Prinzip zu kleine NMDA-Rezeptor-vermittelten Ströme gemessen. Da dies allerdings eine systematische Fehlerquelle ist, die in den WT Neuronen und GluN2A^{fl/fl} Neuronen die NMDA/AMPA Ratios gleichermaßen beeinflusst, sollte sie kein Problem für die Interpretation der Ergebnisse darstellen. Damit Größe des „Space Clamp Fehlers“ zwischen den Messungen nicht zu sehr variiert, habe ich für die Analyse von evozierten Strömen die Stimulationselektrode immer in ähnlicher Distanz von der Messelektrode platziert. Die aktivierten Synapsen sollten bei den unterschiedlichen Ableitungen damit immer einen ähnlichen Abstand vom Zellkörper haben.

5.2 Synaptische Expression der GluN2A-Untereinheit

NMDA-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von neuronalen Prozessen und bei der Entstehung von ZNS-Erkrankungen. Die vorherrschenden Rezeptor-Untereinheiten des tetrameren Rezeptors im Telencephalon sind die GluN1-, GluN2A- und GluN2B-Untereinheit. Die Verteilung der GluN2A-Untereinheit innerhalb und außerhalb der Synapsen ist noch nicht bekannt. Durch meine Experimente konnte mittels Analyse der NMDA/AMPA Ratios eine Abschätzung der synaptischen Expression der GluN2A-Untereinheit in Neuronen des Hippocampus, Striatum und somatosensorischem Cortex gewonnen werden. Im Gyrus dentatus zeigte sich eine Reduktion des NMDA/AMPA Ratios von 25%. Durch den Knockout reduzierte sich das NMDA/AMPA Ratio in striatalen Stachelneuronen um etwas mehr als ein Drittel. Sowohl in der CA1 Region des Hippocampus als auch in der fünften Schicht des somatosensorischen Cortex konnte eine Reduktion des NMDA/AMPA Ratios von etwa der Hälfte beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen 1) dass sich in Synapsen der Neurone aller vier Regionen GluN2A-enthaltende Rezeptoren befinden, 2) dass synaptisch auch andere NMDA-Rezeptor-Untereinheiten exprimiert werden und 3) dass sich in CA1 und somatosensorischem Cortex tendenziell mehr GluN2A-enthaltende Rezeptoren befinden als in Gyrus dentatus und Striatum.

5.2.1 Synaptische Expression der GluN2A-Untereinheit im Hippocampus

Meine elektrophysiologischen Daten zeigen, dass in hippocampalen Neuronen adulter Mäuse ein großer Anteil an synaptischen NMDA-Rezeptoren die GluN2A-Untereinheit enthalten. Dies trifft insbesondere auf die CA1 Region zu. Im Gyrus dentatus nimmt NMDA/AMPA Ratio weniger ab als in der CA1 Region, was dafürsprechen würde, dass in der Region synaptisch weniger GluN2A-enthaltende Rezeptoren zu finden sind, wohingegen in der CA1 Region eine stärkere Reduktion des Ratios gemessen wurde, was für einen höheren Anteil an GluN2A-enthaltende Rezeptoren spricht. Die Schlussfolgerung, dass GluN2A-enthaltende Rezeptoren einen wesentlichen Teil der synaptischen NMDA-Rezeptoren in der CA1 Region ausmachen, wird gestützt durch die Beobachtung, dass der Knockout der GluN2B-Untereinheit das NMDA/AMPA Ratios in CA1 Neuronen adulter Mäuse ebenfalls um ca. 50% reduziert (von Engelhardt et al. 2008).

In Neuronen hippocampaler Zellkulturen sind GluN1/GluN2B-Rezeptoren überwiegend extrasynaptisch und GluN1/GluN2A-Rezeptoren vor allem synaptisch lokalisiert (Gladding und Raymond 2011; Tovar und Westbrook 1999; Groc und Choquet 2009). Andere Studien, die auch Zellkulturen des Hippocampus verwendeten, konnten hingegen einen gleich hohen Anteil an GluN2A- und GluN2B-enthaltenden Rezeptoren extrasynaptisch feststellen und konnten ihre Ergebnisse auch in akuten Hirnschnitten bestätigen (Petrálie et al. 2010). Die Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten in kultivierten Neuronen ist allerdings nicht mit der Expression adulter Mäuse vergleichbar. Typischerweise werden kultivierte Neurone ca. 2-3 Wochen nach Aussaat analysiert. Diese jungen Neurone sind bezüglich der Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheit am ehesten mit Neuronen juveniler Mäuse (2-3 Wochen alt) vergleichbar. Es ist bekannt, dass in diesen frühen Entwicklungsstadien die GluN2B-Untereinheit die vorherrschende Untereinheit ist.

Mittels semi-quantitativem Western Blot beobachtete Coultrap et al. 2005, dass die Expression der GluN2A-Untereinheit in allen Regionen des Hippocampus (Gyrus dentatus, CA1, CA3) vergleichbar ist. Im Unterschied dazu war die Expression der GluN2B-Untereinheit in Gyrus dentatus und CA3 halb so hoch wie in der CA1 Region. Dies würde für eine höhere relative Kontribution der GluN2A-Untereinheit in Neuronen des Gyrus dentatus und der CA3 Region als in der CA1 Region sprechen. Meine Daten sprechen gegen diese Schlussfolgerung, da die Reduktion durch den GluN2A-Knockout in Gyrus dentatus geringer als in der CA1 Region war. Da aber in der oben genannten Studie die Lokalisation der Untereinheiten (intrazellulär,

Zellmembran, synaptisch und extrasynaptisch) nicht differenziert wurde, können diese Daten natürlich nicht direkt mit meinen elektrophysiologischen Daten, die sich auf die synaptischen Ströme bezieht, verglichen werden.

Elektrophysiologische Studien, in denen pharmakologische Ansätze und auch Knockout Modelle verwendet wurden, sprechen für ein synaptisches Verhältnis der Untereinheiten in CA1 Neuronen von 65% GluN1/GluN2A-Rezeptoren und 35% GluN1/GluN2B-Rezeptoren (Rauner und Köhr 2011; Gray et al. 2011). Auf ein ähnliches Expressionsmuster sind auch Harris und Pettit 2007 gekommen, die mittels ihres pharmakologischen Ansatzes die Anzahl der synaptischen GluN2A-enthaltenden Rezeptoren auf 55% schätzen. Diese Ergebnisse würden mit meinen Ergebnissen vereinbar sein, da sich in den NMDA/AMPA Ratios eine Reduktion von etwas mehr als der Hälfte durch den Knockout der GluN2A-Untereinheit gezeigt hat. Damit ließe sich der Gehalt an GluN2A-enthaltenden Rezeptoren auf um die 55% synaptisch schätzen.

Interessanterweise zeigte Shinohara et al. 2008, dass die Untereinheitenverteilung der NMDA-Rezeptoren vom Input der Zelle abhing. So enthielten in der CA1 Region Synapsen, die ihren Input von der rechten CA3 Region erhielten, weniger GluN2B-enthaltende Rezeptoren als die Synapsen, die ihr Signal von der linken CA3 Region erhielten. Dies deutet auf eine asymmetrische Verteilung der Rezeptor-Untereinheiten in den beiden Hemisphären hin (Kawakami et al. 2003). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Synapsengröße ebenfalls Einfluss auf die Rezeptor-Untereinheitenkonstellation hatte. Kleinere Synapsen enthielten mehr GluN1/GluN2B-Rezeptoren als große Synapsen. In meinen Experimenten wurde Neurone beider Hemisphären analysiert, somit stellt sich die Frage, ob sich das Ergebnis ändern würde, wenn man nur Neurone einer Hemisphäre untersucht hätte.

Zudem kann durch den alleinigen Knockout der GluN2A-Untereinheit nicht ausgeschlossen werden, dass es nicht noch Rezeptoren mit den GluN2C/D-Untereinheiten in der CA1 Region gibt, welche in manchen Studien auch in geringen Mengen gefunden wurden (Zhong et al. 1995; Kirson et al. 1999). Die Expression dieser Untereinheiten in CA1 Pyramidenzellen scheint sich aber auf frühe Entwicklungsstadien zu beschränken (von Engelhardt et al. 2015)

5.2.2 Synaptische Expression der GluN2A-Untereinheit im Striatum

In situ Hybridisierungsversuche deuten darauf hin, dass die GluN2A-Untereinheit im Striatum deutlich geringer als im Hippocampus oder Kortex exprimiert wird. Das mRNA Signal für die GluN2B-Untereinheit ist im Unterschied dazu in allen Regionen ähnlich hoch (Buller et al. 1994; Monyer et al. 1994). Das mRNA Signal für die GluN2C- und GluN2D-Untereinheit ist im Striatum adulter Mäuse sehr gering (Monyer et al. 1994). Das deutet darauf hin, dass die wesentlichen Untereinheiten im Striatum adulter Mäuse GluN2A und GluN2B sind, wobei die GluN2B-Untereinheit wahrscheinlich eine größere Kontribution im Striatum als in Hippocampus oder Kortex hat. Über die synaptische und extrasynaptische Expression der Untereinheiten und ob es sich bei den Rezeptoren um diheteromere oder triheteromere Rezeptoren handelt, können die In Situ-Hybridisierungen keinen Aufschluss geben. Meine elektrophysiologischen Analysen zeigen, dass mehr als ein Drittel, der NMDA-Rezeptoren striataler Neurone die GluN2A-Untereinheit enthalten. Damit wären die Daten mit der Schlussfolgerung kongruent, dass ein wesentlicher Teil der NMDA-Rezeptoren des Striatums die GluN2B-Untereinheit enthält. Anders als das sehr geringe mRNA Signal für die GluN2A-Untereinheit im Striatum adulter Mäuse (Buller et al. 1994; Monyer et al. 1994) vermuten lässt, wird die GluN2A-Untereinheit aber zumindest synaptisch in Stachelneuronen des Striatums exprimiert.

5.2.3 Synaptische Expression der GluN2A-Untereinheit im somatosensorischen Cortex

In situ Hybridisierungsversuche zeigen, dass die mRNAs der GluN2A- und GluN2B-Untereinheiten in allen Schichten des Kortex adulter Mäuse exprimiert werden. Dabei nimmt die mRNA Expression der GluN2B-Untereinheit mit der Entwicklung des Gehirns ab, die der GluN2A-Untereinheit dagegen zu (Monyer et al. 1994). Das spricht für eine mit der Entwicklung abnehmende Kontribution GluN2B-enthaltender Rezeptoren. Das mRNA Signal für die GluN2C- und GluN2D-Untereinheit ist im gesamten Kortex adulter Mäuse sehr gering (Monyer et al. 1994). Quantifizierung synaptischer NMDA-Rezeptoren mittels Western Blot und Elektronenmikroskopie unterstützen die Hypothese, dass die GluN2B-Untereinheit mit der Entwicklung im somatosensorischen Kortex runterreguliert und die GluN2A-Untereinheit hochreguliert wird (Lui und Murray 2004). Die fünfte Schicht wurde von Balsara et al. 2014 im

medialen präfrontalen Cortex angeschaut. In dieser Studie wurde per Laser Photostimulation spezifische Synapsen aktiviert. Pharmakologische Analysen deuten darauf hin, dass die Verteilung der GluN2A- und GluN2B-Untereinheit an apikalen und basalen Synapsen von Neuronen der fünften Schicht im medialen präfrontalen Cortex gleich ist (Balsara et al. 2014). Es wurde beobachtet, dass sich die beiden Untereinheiten zum selben Anteil an der Zellmembran aufhält, ohne dabei jedoch zwischen extrasynaptisch und synaptisch zu differenzieren. Diese Schlussfolgerungen sind mit meinen vereinbar. Da sich das NMDA/AMPA Ratio durch den konditionierten Knockout der GluN2A-Untereinheit um ungefähr die Hälfte reduziert. Wang et al. 2008 beobachtete, dass im medialen präfrontalen Cortex im Verhältnis zu anderen kortikalen Regionen überproportional viele GluN2B-enthaltende Rezeptoren gefunden wurden. Dies würde wiederum bedeutet, dass im somatosensorischen Cortex weniger GluN1/GluN2B-Rezeptoren enthalten wären als im medialen präfrontalen Cortex.

5.3 Veränderung der Kinetiken in der konditionierten GluN2A-Knockout-Maus

Der Decay wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst wie zum Beispiel der Deaktivierung und der Desensitisierung der NMDA-Rezeptoren und kann somit variieren. Der einflussreichste Faktor ist die Untereinheitenkonstellation des Rezeptors, da diese u.a. für die Öffnungsdauer des Rezeptors zuständig ist (s.o.). Deshalb kann durch Vergleich der Kinetiken in den unterschiedlichen Gehirnregionen der Aufbau der NMDA-Rezeptoren abgeschätzt werden. In meinen Daten variiert der Decay je nach Region, aber auch unter den Knockout-Konditionen sind verschiedene Decays zu beobachten. In den Wildtyp Mäusen konnte im Gyrus dentatus und somatosensorischen Cortex ein Decay von ca. 35ms beobachtet werden. Der Decay in den striatalen Neuronen war mit 53ms langsamer als in Gyrus dentatus und somatosensorischen Cortex, wobei der Decay in der CA1 Region mit 77ms der langsamste Decay der Wildtyp-Mäuse ist. Erstaunlich ist, dass die Decays sehr schnell sind, insbesondere in Gyrus dentatus, Striatum und somatosensorischem Cortex. Die sehr schnellen Kinetiken sprechen für eine große Kontribution der GluN2A-Untereinheit, da reinen GluN2A-Strömen ein Decay von 27,3 - 40ms zu geschrieben wird (Paoletti et al. 2013). In der CA1 Region ist der Decay etwas langsamer, obwohl man aufgrund der größeren Reduktion der NMDA/AMPA Ratio in GluN2A-Knockout Neuronen, eine größere Kontribution der GluN2A-Untereinheit in Wildtyp Neuronen und damit einen schnelleren Decay vermuten würde. Die von mir

beobachtete Decay Kinetik der NMDA-Rezeptoren in Neuronen der CA1 Region von Wildtyp Mäusen ist ähnlich der von Rauner und Köhr 2011 beschriebenen Kinetik.

Ebenso konnten unter Knockout-Bedingungen unterschiedliche Decays in den vier verschiedenen Hirnregionen festgestellt werden. In Gyrus dentatus und somatosensorischer Cortex wurde ein Decay von ca. 75ms gemessen. Die Decays in Striatum und CA1 Region waren mit 120/140ms zwar länger, jedoch deutlich schneller als der Decay, welcher reinen GluN2B-Strömen (250ms) zugeschrieben wird (Rauner und Köhr 2011). Das lässt vermuten, dass noch andere Faktoren Einfluss auf die Kinetik haben. Zudem kann man sagen, dass es schwieriger ist als allgemein vermutet, von den Decays auf die Komposition der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten zu schließen. Wichtiger ist demnach vielleicht die Größe der Änderung der Decays in den Knockout-Mäusen neben der Änderung der Amplituden in den NMDA/AMPA Ratios.

Ein Faktor der ebenfalls Einfluss auf die Kinetik der NMDA-Rezeptoren hat ist die GluN1-Untereinheit. Von dieser gibt es 8 unterschiedliche Splice Varianten, welche den Decay beeinflussen konnten. Es wurde gezeigt, dass GluN1-Untereinheiten, die das Exon 5 enthalten deutlich schnellere Decays hatten als die Splice Varianten, die dieses Exon nicht hatten (Vance et al. 2012; Rumbaugh et al. 2000). Jedoch würde das nicht erklären warum die Decayzeiten nach Knockout der GluN2A-Untereinheit in CA1 Neuronen nicht denselben Decay wie bei Rauner und Köhr 2011 gezeigt haben. Dies könnte jedoch mit dem Alter der Tiere zu tun haben, da die Tiere von Rauner und Köhr mit P27-48 jünger waren als meine und es möglicherweise zu einer entwicklungsbedingten veränderten Expression der Splice Varianten gekommen ist.

Eine weitere Erklärung für die schnellen Decays in den Wildtyp Mäusen könnten die triheteromeren Rezeptoren sein. Triheteromere GluN1/GluN2A/GluN2B-Rezeptoren haben einen schnelleren Decay als diheteromere GluN1/GluN2B-Rezeptoren (Tovar et al. 2013). Somit würden die Daten auf eine wesentliche Kontribution triheteromerer NMDA-Rezeptoren in allen vier Hirnregionen deuten. Dies könnte zum Teil auch erklären warum der Decay in manchen Regionen schneller war als in anderen. Der Cortex soll viele triheteromere Rezeptoren enthalten und hat einen schnelleren Decay als z.B. das Striatum, wo noch nicht bekannt ist, wie hoch die Anzahl triheteromerer Rezeptoren ist (Luo et al. 1997). Die langsamere Kinetik der NMDA-Rezeptoren in der CA1 Region als die Kinetik in den anderen Regionen von Wildtyp Mäusen könnte somit an einer nicht Exon 5-enthaltenden Splice

Variante der GluN1-Untereinheit oder einer geringeren Kontribution triheteromerer Rezeptoren liegen (Al-Hallaq et al. 2007). Des Weiteren ist bisher nicht bekannt ob und wie sich triheteromere Rezeptoren durch den Knockout einer ihrer Untereinheiten verändern. Somit könnte es sein, dass durch den Knockout der GluN2A-Untereinheit, hier nicht reine GluN2B-Ströme gemessen wurden, sondern auch Ströme triheteromerer GluN1/GluN2A/GluN2B-Rezeptoren. Abschließend muss festgehalten werden, dass meine Daten derzeit noch keine genaue Quantifizierung des Anteils der triheteromeren Rezeptoren erlaubt. Hierfür müsste man noch die Kinetik der GluN1/GluN2A-Rezeptoren durch GluN2B^{fl/fl} Mäuse messen und weitere pharmakologische Untersuchungen mit subtypspezifischen Antagonisten durchführen.

Ebenso könnte das „dendritic filtering“ Problem Grund für die langsameren Decay-Ströme der CA1 Region sein. Das „dendritic filtering“ Problem besagt, dass Ströme, die von distalen Synapsen aufgenommen werden, langsamer erscheinen als sie an der Synapse tatsächlich sind. Dies ist vor allem ein Problem, wenn man von großen Neuronen, wie sie in der CA1 Region zu finden sind, ableitet (Magee 2000). Die langsameren Decays in Neuronen der CA1 Region als die der anderen Regionen mag deshalb teilweise an einer stärkeren Auswirkung des „dendritic filterings“ auf die gemessenen Decays in diesen Neuronen sein. Das erklärt, aber sicher nur einen kleinen Teil des Unterschiedes, da „dendritic filtering“ insbesondere eine Auswirkung auf die sehr schnelle Kinetiken hat. Bei den langsamen NMDA-Rezeptor-vermittelten Strömen sollte „dendritic filtering“ ein geringeres Problem sein. Das trifft insbesondere bei den langsamen Kinetiken der GluN1/GluN2B-Rezeptoren zu, bei denen CA1 Neurone ebenfalls wesentlich langsamere Decays hatten als die Neurone der anderen Regionen.

5.4 Triheteromere NMDA-Rezeptoren

Nach aktueller Studienlage sind triheteromere GluN1/GluN2A/GluN2B-Rezeptoren in Gyrus dentatus und Striatum bisher noch nicht untersucht worden. Für die CA1 Region und den somatosensorischen Cortex gibt es bereits eine Vielzahl von Studien, die sich mit den triheteromeren Rezeptoren befassen haben.

Die Mehrheit der Studien sind konsistent mit der Hypothese, dass die vorherrschenden Rezeptortypen in CA1 Neuronen diheteromere GluN1/GluN2A-Rezeptoren, GluN1/GluN2B-

Rezeptoren und triheteromere GluN1/GluN2A/GluN2B-Rezeptoren sind (Garaschuk et al. 1996; Gray et al. 2011; Watanabe et al., 1992). Der Anteil triheteromerer Rezeptoren wird in den Studien unterschiedlich hoch geschätzt. Al-Hallaq et al. 2007 kamen zu dem Ergebnis, dass im Hippocampus adulter Mäuse (6 Monate) je ein Drittel diheteromere GluN1/GluN2A-Rezeptoren, GluN1/GluN2B-Rezeptoren und triheteromere GluN1/GluN2A/GluN2B-Rezeptoren exprimiert werden. In dieser Immunpräzipitations-Studie wurde nicht zwischen synaptischen und extrasynaptischen Rezeptoren unterschieden. Andere Studien verwendeten sowohl Knockoutlinien als auch pharmakologische Ansätze. Der Anteil triheteromerer Rezeptoren wurde hier synaptisch auf über 50% geschätzt (Rauner und Köhr 2011; Gray et al. 2011).

Der Cortex wurde in den meisten Studien, die sich mit der Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten befassen, in seiner Ganzheit betrachtet, somit wurde durch Immunpräzipitation oder Western Blots mittels Antikörper die Expression der Untereinheiten im gesamten Cortex untersucht. Hier wurde beobachtet, dass es sich bei Mehrheit der Rezeptoren um triheteromere GluN1/GluN2A/GluN2B-Rezeptoren handelt und zu kleinem Teil um diheteromere GluN2A- und GluN2B-Rezeptoren (Luo et al. 1997). Weitere Studien, die sich spezifischer mit nur einer Hirnregion befasst hatten, konnten für diese Region andere Ergebnisse beobachten. So wurde gesehen, dass sich in Schicht 2 und 3 des somatosensorischen Cortex nur ein geringer Teil an triheteromeren Rezeptoren befindet (Gray et al. 2011; Lui und Murray 2004). Balsara et al. 2014 untersuchte die fünfte Schicht des medial präfrontalen Cortex und konnte hier ebenfalls nur wenige triheteromere Rezeptoren sehen. Für die fünfte Schicht des somatosensorischen Cortex wurden bislang keine Untersuchungen des Anteils an triheteromeren Rezeptoren durchgeführt. Jedoch könnte man durch den schnellen Decay in meinen Experimenten darauf schließen, dass es sich um einen größeren Anteil an triheteromeren Rezeptoren in der fünften Schicht des somatosensorischen Cortex handelt.

5.5 Einfluss der GluN2A-Untereinheit auf mEPSC

mEPSC sind kleine exzitatorische postsynaptische Ströme, die durch Öffnung von AMPA-Rezeptoren entstehen. Diese können Auskunft über die Anzahl der Synapsen und die Anzahl der AMPA-Rezeptoren auf diesen geben. In meinen Experimenten wurde in den Knockout-

Zellen einer Erhöhung der Amplitude AMPA-Rezeptor-vermittelter Ströme in der CA1 Region und im Striatum festgestellt. Diese konnte im Gyrus dentatus und somatosensorischem Cortex nicht beobachtet werden. Die Erhöhung der Amplitude der postsynaptischen Ströme deutet auf eine erhöhte Anzahl der postsynaptischen AMPA-Rezeptoren hin. Der Knockout der GluN2A-Untereinheit erhöht demnach die AMPA-Rezeptorzahl in der Postsynapse regionalspezifisch in CA1 und Striatum.

Gray et al. 2011 hatte durch mEPSC in GluN2A-Knockout-Mäusen ebenfalls eine solche Erhöhung der Amplitude der AMPA-Rezeptor-vermittelten Ströme in der CA1 Region beobachtet und vermutete, dass die GluN2A-Untereinheit eine restriktive Rolle bei der AMPA-Rezeptorpotenzierung spielt. Später wurde diese Vermutung noch spezifiziert, dass nicht allein das Vorhandensein der GluN2A-Untereinheit, sondern vor allem die Aktivität dieser Rezeptoren dämpfend auf die AMPA-Rezeptorfunktion wirkt (Lu et al. 2011). Eine Steigerung der Amplitude AMPA-Rezeptor-vermittelter Ströme nach Blockade der NMDA-Rezeptoren wurde im Striatum bisher nicht untersucht.

Da sich die GluN2A-Untereinheit in allen vier Gehirnregionen befindet, würde dies aber nicht erklären, warum die Erhöhung der AMPA-Amplitude nur im Striatum und in CA1 zu beobachten war. Eine Erhöhung der Amplitude in den mEPSC Experimenten konnte in der CA1 Region ebenfalls in GluN1-Knockout-Mäusen und durch pharmakologische Blockierung des NMDA-Rezeptors durch APV nachgewiesen werden. (Adesnik et al. 2008; Hall et al. 2008). Gray et al. 2011 konnte diese Erhöhung der mEPSC Amplitude auch in CA1 Neuronen mit konditioniertem GluN2B-Knockout beobachten. Dies könnte bedeuten, dass die GluN2B-Untereinheit ebenfalls einen Effekt auf die AMPA-Rezeptoranzahl hat. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass es sich um ein Artefakt des jungen Alters der Zellen handeln könnte. Da eine Amplitudenzunahme sowohl bei einem Fehlen der GluN2A-, GluN2B-Untereinheit als auch des gesamten NMDA-Rezeptors gesehen wurde, ist dieser Effekt abschließend nicht einer Untereinheit zuzuordnen.

Die Erhöhung der Amplitude der mEPSC in GluN2A^{fl/fl} Neuronen der CA1 Region und des Striatums erschwert die Interpretation NMDA/AMPA Ratios bezüglich des Verhältnisses der Rezeptor-Untereinheiten. Man muss vermuten, dass die Reduktion der Amplitude der NMDA-Rezeptor-vermittelten Ströme in den NMDA/AMPA Ratios überschätzt wird.

Die Frequenz der mEPSC ist ein Indikator für die Anzahl der funktionellen Synapsen des Neurons (Gray et al. 2011). In meinen Experimenten konnte durch den Knockout eine erhöhte Frequenz der mEPSC in der CA1 Region festgestellt werden. In den anderen Regionen konnte keine Veränderung der Frequenz festgestellt werden. Dies bedeutet, dass sich die Anzahl funktioneller Synapsen in der CA1 Region durch den Knockout erhöht hat. Eine solche Beobachtung wurde bisher nicht gemacht. Bisherige Studien haben eine Veränderung der mEPSC Frequenz vor allem dem Fehlen der GluN2B-Untereinheit zugeschrieben (Gray et al. 2011). Wohingegen dieser Effekt teilweise nicht reproduziert werden konnte und deswegen auch als entwicklungsbedingter Effekt eingeordnet wurde (von Engelhardt et al. 2008).

Ebenso könnten präsynaptische GluN2A-enhaltende NMDA-Rezeptoren durch die Modulation der Neurotransmitterfreisetzung einen Einfluss auf die Frequenz der mEPSC ausüben (Bidoret et al. 2009). Diese Rezeptoren könnten durch den konditionellen Knockout beeinflusst sein und somit die mEPSC Frequenz verändern. Wir haben meistens keine wesentliche Infektion von CA3 Neuronen nach lokaler Injektion der rAAVs in die CA1 Region beobachtet. Man kann also vermuten, dass möglicherweise vorhandene präsynaptische GluN1/GluN2A-Rezeptoren unverändert exprimiert werden.

Durch pharmakologische Ansätze konnte sogar gezeigt werden, dass präsynaptische NMDA-Rezeptoren einen Einfluss auf die mEPSC Frequenz haben. So konnte durch Blockierung der NMDA-Rezeptoren eine Steigerung der mEPSC Frequenz beobachtet werden (Woodhall et al. 2001; Brasier und Feldman 2008; Yang et al. 2006; Beretta und Jones et al. 1996; Li und Han 2007). Des Weiteren wird vermutet, dass präsynaptische NMDA-Rezeptoren die Freisetzung von Neurotransmittern modulieren könnten und so Einfluss auf die Frequenz der mEPSC ausüben könnten (Duguid und Smart 2004).

Dadurch dass die Veränderung der mEPSC Frequenz auch in GluN2B-Knockoutzellen sowie Blockade des gesamten NMDA-Rezeptors zu beobachten war handelt es sich hierbei auch nicht um eine Untereinheiten spezifisches Phänomen. Eine Theorie warum die Veränderung der Frequenz nur in der CA1 Region zu sehen war ist, dass es nur in der CA1 Region GluN2A-enhaltende präsynaptischen NMDA-Rezeptoren gibt. In den anderen Regionen könnte es zu einer dieser präsynaptischen NMDA-Rezeptoren nicht geben und deswegen keine Frequenzveränderung beobachtet werden oder zum anderen könnte es dort postnatal zum Verlust der präsynaptischen NMDA-Rezeptoren kommen (Mameli et al. 2005).

6. Zusammenfassung

NMDA-Rezeptoren haben eine entscheidende Rolle bei neuronaler Kommunikation, synaptischer Plastizität und auch bei der Pathophysiologie von ZNS-Erkrankungen. Der NMDA-Rezeptor ist ein tetramerer Komplex der aus zwei obligaten GluN1-Untereinheiten und entweder zweimal der gleichen anderen Untereinheiten (z.B. GluN2A/GluN2B) oder aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten (z.B. GluN2A und GluN2B) besteht. Aufgrund der diversen Untereinheiten, die sowohl in Aufbau, Lokalisation aber auch Eigenschaften variieren ist es wichtig mehr über ihre synaptische als auch extrasynaptische Expression zu erfahren. Das Wissen über die Expression bestimmter Rezeptortypen oder bestimmte Rezeptorlokalisationen in Neuronen des ZNS kann möglicherweise therapeutisch bei der Entwicklung effektiverer und nebenwirkungsärmerer Therapiemöglichkeiten von Bedeutung sein.

Meine Doktorarbeit beschäftigt sich mit der synaptischen Expression der GluN2A-Untereinheit in drei Hirnregionen, die häufig bei ZNS-Erkrankungen betroffen sind: dem Hippocampus, dem Striatum und dem primär somatosensorischen Cortex. Die GluN2A-Untereinheit ist dabei einer der beiden vorwiegend exprimierten Untereinheiten des NMDA-Rezeptors. Um die synaptische Expression der GluN2A-Untereinheit analysieren zu können, führte ich mittels der Ganzzell-Patch-Clamp Technik elektrophysiologische Messungen Neuronen mit genetischer Deletion der GluN2A-Untereinheit durch.

Die Deletion der GluN2A-Untereinheit reduzierte die NMDA/AMPA Ratios in Körnerzellen des Gyrus Dentatus und in Neuronen des Striatums um lediglich 25-30%, was darauf hindeutet, dass GluN2B-enthaltende NMDA-Rezeptoren einen erheblichen Anteil der synaptischen Ströme in diesen Neuronen ausmachen. Die vergleichsweise schnellen Decays der Ströme lassen vermuten, dass ein Großteil der GluN2B-Untereinheiten als Bestandteil triheteromerer GluN1/GluN2A/GluN2B-Rezeptoren vorhanden sind.

In der CA1 Region des Hippocampus und im somatosensorischen Cortex wurde in GluN2A^{fl/fl} Neuronen eine Reduktion der NMDA/AMPA Ratio um etwas mehr als die Hälfte beobachtet. Obwohl der Anteil der GluN2A-Untereinheit in CA1 Neuronen größer als in Körnerzellen oder Neuronen des Striatums ist, sind die Decays der NMDA-Rezeptor-vermittelten Ströme in CA1 Neuronen langsamer als in den anderen drei Neuronen Typen. Das deutet daraufhin, dass in

der CA1 Region ein größerer Anteil der NMDA-Rezeptoren als diheteromere GluN1/GluN2B-Rezeptoren vorliegt als den anderen analysierten Neuronen Typen.

Die beobachteten Änderungen der mEPSC Amplitude in GluN2A^{fl/fl} Neuronen erschwert die Interpretation insbesondere der NMDA/AMPA Ratios. Außerdem deuten die sehr schnellen Decays der GluN1/GluN2B-Rezeptoren in GluN2A^{fl/fl} Neuronen daraufhin, dass Splice Varianten der GluN1-Untereinheit exprimiert werden, die die Deaktivierung der NMDA-Rezeptoren besonders schnell machen.

Zur weiteren Bestimmung der Untereinheitenverteilung und der Kontribution triheteromerer Rezeptoren wären sowohl Messungen der Neurone mit GluN2B-Knockout als auch ergänzende pharmakologische Methoden mit präferentieller Blockierung von NMDA-Rezeptorsubtypen hilfreich.

7. Literaturverzeichnis

- Aarts, M., Liu, Y., Liu, L., Besshoh, S., Arundine, M., Gurd, J.W., Wang, Y., Salter, M.W., Tymianski, M. (2002). Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor–PSD-95 protein interactions. *Science* 298, 846–850.
- Adesnik, H., Li, G., During, M.J., Pleasure, S.J., Nicoll, R.A. (2008). NMDA receptors inhibit synapse unsilencing during brain development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 5597–5602.
- Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., Mizuno, N. (1994). Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *Journal of Comparative Neurology* 347, 150–160.
- Al-Hallaq, R. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Wenthold, R. J. (2007). NMDA di-heteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience* 27, 8334–8343.
- [Ali, A.B.](#), Bannister, A.P., Thomson, A.M. (1999). IPSPs elicited in CA1 pyramidal cells by putative basket cells in slices of adult rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 5, 1741–53.
- Altman, J., Das, G. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology* 124(3), 319–335.
- Ambrogini, P., Lattanzi, D., Ciuffoli, S., Agostini, D., Bertini, L., Stocchi, V., Santi, S., Cuppini, R. (2004). Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Research* 1017(1-2), 21–31.
- Andersen, P., Bliss, T., Skrede, K. (1971). Lamellar organization of hippocampal pathways. *Experimental Brain Research* 13(2), 222–238.
- Andersson, O., Stenqvist, A., Attersan, A., von Euler, G. (2001). Nucleotide Sequence, Genomic Organization, and Chromosomal Localization of Genes Encoding the Human NMDA Receptor Subunits NR3A and NR3B. [Genomics](#) 78 (3), 178–184
- [Aoki, C.](#), [Venkatesan, C.](#), [Go, C.G.](#), [Mong, J.A.](#), [Dawson, M.T.](#) (1994). Cellular and subcellular localization of NMDA-R1 subunit immunoreactivity in the visual cortex of adult and neonatal rats. *Journal of Neuroscience* 9, 5202–22.
- Assous, M., Tepper, J. M. (2019). Excitatory extrinsic afferents to striatal interneurons and interactions with striatal microcircuitry. *European Journal of Neuroscience*, 49(5), 593–603.
- Balsara, R.D., Ferreira, A.N., Donahue, D.L., Castellino, F.C., Sheets, P.L. (2014). Probing NMDA receptor GluN2A and GluN2B subunit expression and distribution in cortical neurons. *Journal of Neuropharmacology* 79, 542–549
- Banke, T. G., Dravid, S. M., Traynelis, S. F. (2005). Protons trap NR1/NR2B NMDA receptors in a nonconducting state. *Journal of Neuroscience*. 25, 42–51.
- [Bar-Yehuda, D.](#), [Korngreen, A.](#) (2008). Space-Clamp Problems When Voltage Clamping Neurons Expressing Voltage-Gated Conductances. *Journal of Neurophysiology* 99, 1127–1136
- Belforte, J. E., Zsiros, V., Sklar, E.R., Jiang, Z., Yu, G., Li, Y., Quinlan, E.M., Nakazawa, K. (2010). Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nature Neuroscience*. 13, 76–83.
- Bendel, O., Meijer, B., Hurd, Y., von Euler, G. (2005). Cloning and expression of the human NMDA receptor subunit NR3B in the adult human hippocampus. [Neuroscience Letters](#) 377 (1), 31–36.

- Beretta, M., Jones, R. S. (1996). Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic N-methyl-aspartate autoreceptors in the entorhinal cortex. *Neuroscience* 75, 339–344.
- Bidoret, C., Ayon, A., Barbour, B., Casado, M. (2009). Presynaptic NR2A-containing NMDA receptors implement a high-pass filter synaptic plasticity rule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 14126–14131.
- Bode, S (2012). Automatisiertes Zwei-Elektroden Voltage Clamp mit zusätzlicher Stromelektrode zur Erzeugung eines extrazellulären Kompensationsfeldes. *Hochschule Aachen*.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A., Greenberg, M.E. (1999). Cell survival promoted by the Ras - MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286, 1358–1362.
- Brasier, D.J., Feldman, D.E. (2008). Synapse-Specific Expression of Functional Presynaptic NMDA Receptors in Rat Somatosensory Cortex. *Journal of Neuroscience* 28 (9), 2199–2211
- Brenner, R., Chen, Q. H., Vilaythong, A., Toney, G. M., Noebels, J. L., Aldrich, R. W. (2005). BK channel 4 subunit reduces dentate gyrus excitability and protects against temporal lobe seizures. *Nature Neuroscience* 8(12), 1752–1759.
- Buller, A.L., Larson, H.C., Schneider, B.E., Beaton, J.A., Morrisett, R.A., Monaghan, D.T. (1994). The molecular basis of NMDA Receptor subtypes. Native Receptor diversity is predicted by subunit composition. *The Journal of Neuroscience* 14 (9), 5471–5484.
- Burzomato, V., Frugier, G., Perez-Otano, I., Kittler, J. T., Attwell, D. (2010). The receptor subunits generating NMDA receptor mediated currents in oligodendrocytes. *Journal of Physiology* 588, 3403–3414.
- Cao, X., Cui, Z., Feng, R., Tang, Y., Qin, Z., Mei, B., Tsien, J.Z. (2007). Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing. *European Journal of Neuroscience* 25, 1815–1822.
- Chenard B.L., Menniti, F.S. (1999). Antagonists selective for NMDA receptors containing the NR2B subunit. *Current Opinion in Pharmacology* 5 (5), 381–404.
- Chung, H.J., Huang, Y.H., Lau, L., Huganir, R.L. (2004). Regulation of the NMDA Receptor Complex and Trafficking by Activity-Dependent Phosphorylation of the NR2B Subunit PDZ Ligand. *Journal of Neuroscience* 24 (45), 10248–10259.
- Cook, D. J., Teves, L., Tymianski, M. (2012). Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain. *Nature* 483, 213–217.
- Corlew, R., Brasier, D. J., Feldman, D. E., Philpot, B. D. (2008). Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity. *Neuroscientist* 14, 609–625.
- Coultrap, S.J., Nixon, K.M., Alvestad, R.M., Valenzuela, C.F., Browning, M.D. (2005). Differential expression of NMDA receptor subunits and splice variants among the CA1, CA3 and dentate gyrus of the adult rat. *Molecular Brain Research* 135, 104–111.
- Cull-Candy, S.G., Leszkiewicz, D.N. (2004). Role of Distinct NMDA Receptor Subtypes at Central Synapses. *Science's stke* 2004 (255), 16.
- Davies, S.N., Martin, D., Millar, J.D., Aram, J.A., Church, J., Lodge, D. (1988). Differences in results from in vivo and in vitro studies on the use-dependency of N-methylaspartate antagonism by MK-801 and other phencyclidine receptor ligands. *European Journal of Pharmacology* 145 (2), 141–51.
- Dollar, H.J. und Weight F.F. (1982). Perforant pathway activation of hippocampal CA1 striatum pyramidal neurons: electrophysiological evidence for a direct pathway. *Brain Research* 237, 1–13

- Duguid, I. C. und Smart, T. G. (2004). Retrograde activation of presynaptic NMDA receptors enhances GABA release at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *Nature Neuroscience* 7, 525–533.
- Dumas, T. C. (2005). Developmental regulation of cognitive abilities: modified composition of a molecular switch turns on associative learning. *Progress in Neurobiology* 76, 189–211.
- Dunah, W., Standaert, D. (2003) Subcellular segregation of distinct heteromeric NMDA glutamate receptors in the striatum. *Journal of Neurochemistry* 85, 935–943.
- Durand, G.M., Bennett, M.V., Zukin, R.S. (1993). Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 6731–6735.
- Durante, V., de Iure, A., Loffredo, V., Vaikath, N., De Risi, M., Paciotti, S., Quiroga-Varela, A., Chiasserini, D., Mellone, M., Mazzocchetti, P. (2019). Alpha-synuclein targets GluN2A NMDA receptor subunit causing striatal synaptic dysfunction and visuospatial memory alteration. *Brain* 142 (5), 1365–1385.
- Edman, S., McKay, S., Macdonald, L.J., Samadi, M., Livesey, M.R., Hardingham, G.E., Wyllie D.J.A. (2012). TCN 201 selectively blocks GluN2A-containing NMDARs in a GluN1 co-agonist dependent but non-competitive manner. *Journal of Neuropharmacology* 63 (3), 441–9.
- Endele, S., Rosenberger, G., Geider, K., Popp, B., Tamer, C., Stefanova, I., Milh, M., Kortom, F., Fritsch, A., Pientka, F.K., Hellenbroich, Y., Kalscheuer, V.M., Kohlhasse, J., Moog, U., Rappold, G., Rauch, A., Ropers, H.H., von Spiczak, S., Tönnies, H., Villeneuve, N., Villard, L., Zabel, B., Zenker, M., Laube, B., Reis, A., Woeczorek, D., van Maldergem, L., Kutsche, K. (2010). Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nature Genetics* 42, 1021–1026.
- Erreger, K., Dravid, S. M., Banke, T. G., Wyllie, D. J., Traynelis, S. F. (2005) Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *Journal Physiology* 563, 345–358.
- [Erreger, K.](#) und [Traynelis, S.T.](#) (2008). Zinc inhibition of rat NR1/NR2A N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Physiology* 586 (3), 763–78.
- Eyo, U.B., Peng, J., Swiatkowski, P., Mukherjee, A., Bispo, A., Wu, L. (2014). Neuronal Hyperactivity recruits microglial processes via neuronal NMDA Receptors and Microglial P2Y12 Receptors after Status Epilepticus. *Journal of Neuroscience* 34(32), 10528–10540.
- Ferreira, J.S, Papouin, T, Ladepeche, L, Yao, A, Langlais, V.C., Bouchet, D., Dulong, J., Mothet, J., Sacchi, S., Pollegioni, L, Paoletti, P., Oliet, S.H.R., Groc, L. (2017). Co-agonists differentially tune GluN2B NMDA receptor trafficking at hippocampal synapses. *Elife*, 6, e25492.
- Fyhn, M., Molden, S., Witter, M. P., Moser, E. I., and Moser, M. B. (2004). Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science (New York, N.Y.)* 305 (5688), 1258–1264.
- [Garaschuk, O.](#), [Schneggenburger, R.](#), [Schirra, C.](#), [Tempia, F.](#), [Konnerth, A. \(1997\).](#) Fractional Ca²⁺ currents through somatic and dendritic glutamate receptor channels of rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *Journal of Physiology* 491 (3), 757–772.
- Gerfen, C. R. und Surmeier, D. J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 441–466.
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Sibley, D.R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429–32

- Gladding, C. M. und Raymond, L. A. (2011). Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. *Molecular and Cellular Neuroscience* 48, 308–320.
- Gogas, K.R. (2006). Glutamate-based therapeutic approaches: NR2B receptor antagonists. [*Current Opinion in Pharmacology*](#) 6 (1), 68–74
- Graf, P. und Schacter, D. L. (1985). Implicit and explicit memory for new associations in normal and amnesic subjects. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, Cognition* 11, 501–518.
- Gray, J.A., Shi, Y., Usui, H., During, M.J., Sakimura, K., Nicoll, R.A. (2011). Distinct modes of AMPA receptor suppression at developing synapses by GluN2A and GluN2B: single-cell NMDA receptor subunit deletion in vivo. *Neuron* 71, 1085e1101.
- Groc, L. und Choquet, B.D. (2009). Surface trafficking of NMDA receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience* 158, 4–18.
- Groc, L., Heine, M., Cousins, S.L., Stephenson, F.A., Lounis, B., Cognet, L., Choquet, D. (2006). NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18769– 18774.
- Hahn, C., Wang, H., Cho, D., Talbot, K., Gur, E., Berrettini, W.H., Bakshi, K., Kamins, J., Borgmann-Winter, K.E., Siegel, S.J., Gallop, R.J., Arnold, S.E. (2006). Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Nature Medicine* 12 (7), 824–8.
- Hall, B.J. und Ghosh, A. (2008). Regulation of AMPA receptor recruitment at developing synapses. *Trends in Neuroscience* 31, 82–89.
- Hall, B.J., Ripley, B., Ghosh, A. (2007). NR2B signaling regulates the development of synaptic AMPA receptor current. *Journal of Neuroscience* 27, 13446–13456.
- Hansen, K.B., Odgen, K.K., Yuan, H., Traynelis, S.F. (2014). Distinct functional and pharmacological properties of triheteromeric GluN1/GluN2A/GluN2B NMDA receptors. *Neuron* 81 (5), 1084–1096.
- Hardingham, G.E. und Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Review Neuroscience* 11 (10), 682–696.
- Hardingham, G.E., Fukunaga, Y., Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neuroscience* 5, 405–414
- Harris, A. Z. und Pettit, D. L. (2007). Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices. *Journal of Physiology* 584, 509–519.
- Hatton, C. J. und Paoletti, P. (2005). Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron* 46, 261–274.
- Henson, M. A., Roberts, A. C., Perez-Otano, I., Philpot, B. D. (2010). Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Progress in Neurobiology* 91, 23–37.
- [Henson](#), M.A., [Roberts](#), A.C., [Salimi](#), K., Vadlamudi, S., Hamer, R.M., Gilmore, J.H., Jarskog, L.F., Philpot, B.D. (2008). Developmental Regulation of the NMDA Receptor Subunits, NR3A and NR1, in Human Prefrontal Cortex . *Cerebral Cortex* 18 (11), 2560–2573.
- Hill, M. D., Martin, R.H., Mikulis, D., Wong, J.H., Silver, F.L., terBrugge, K.G., Milot, G., Clark, W.M., MacDonald, R.L., Kelly, M.E., Boulton, M., Fleetwood, I., McDougall, C., Gunnarsson, T., Chow, M., Lum, C., Dodd, R., Poublanc, J., Krings, T., Demchuk, A.M. (2012). Safety and efficacy of NA-1 in patients with iatrogenic stroke after endovascular aneurysm repair (ENACT): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurology* 11, 942–950.

- Hu, N. W., Klyubin, I., Anwyl, R., Rowan, M. J. (2009). GluN2B subunit-containing NMDA receptor antagonists prevent A β -mediated synaptic plasticity disruption in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20504–20509.
- Iijima, T., Witter, M. P., Ichikawa, M., Tominaga, T., Kajiwar, R., Matsumoto, G. (1996). Entorhinal-hippocampal interactions revealed by real-time imaging. *Science* 272(5265), 1176–1179
- Jin, X. und Costa, R. M. (2015). Shaping action sequences in basal ganglia circuits. *Current Opinion in Neurobiology* 33, 188–196.
- Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V., Volterra, A. (2007). Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nature Neuroscience* 10, 331–339.
- Karadottir, R., Cavelier, P., Bergersen, L. H., Attwell, D. (2005). NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* 438, 1162–1166.
- Karakas, E., Simorowski, N., Furukawa, H. (2011). Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature* 475, 249–253.
- Kawakami, R., Shinohara, Y., Kato, Y., Sugiyama, H., Shigemoto, R., Ito, I. (2003). Asymmetrical Allocation of NMDA Receptor ϵ 2 Subunits in Hippocampal Circuitry. *Science* 300 (5621), 990–994.
- Kesner, R. P., Hopkins, R.O. (2006). Mnemonic functions of the hippocampus: a comparison between animals and humans. *Biological Psychology* 73(1), 3–18
- [Kirson, E.D.](#), [Schirra, C.](#), [Konnerth, A.](#), [Yaari, Y. \(1999\)](#). Early postnatal switch in magnesium sensitivity of NMDA receptors in rat CA1 pyramidal cells. [Journal of Physiology](#). 521 (1), 99–111.
- Knowles, W.D. (1992). Normal Anatomy and Neurophysiology of the Hippocampal Formation. *Journal of Clinical Neurophysiology* 9 (2), 252–263.
- Köhr, G. (2006). NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell and Tissue Research* 326, 439–446
- Kravitz, A. V., Tye, L. D., Kreitzer, A. C. (2012). Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nature Neuroscience* 15 (6), 816–818.
- Kreitzer, A. C. (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annual Review of Neuroscience* 32, 127–147.
- Kumar, S. S. und Huguenard, J. R. (2003). Pathway-specific differences in subunit composition of synaptic NMDA receptors on pyramidal neurons in neocortex. *Journal of Neuroscience*. 23, 10074– 10083.
- Lai, T. W., Shyu, W. C., Wang, Y. T. (2011). Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. *Trends in Molecular Medicine* 17, 266–275.
- Larsen, R. S., Corlew, R.J., Henson, M.A., Roberts, A.C., Mishina, M., Watanabe, M., Lipton, S.A., Nakanishi, N., Perez-Otano, I., Weinberg, R.J., Philpot, B.D. (2011). NR3A-containing NMDARs promote neurotransmitter release and spike timing dependent plasticity. *Nature Neuroscience* 14, 338–344.
- Laurie, D. J. und Seeburg, P. H. (1994). Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *Journal of Neuroscience* 14, 3180–3194.
- Le Moine, C., Normand, E., Bloch, B. (1991). Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (10), 4205–42.

- Lee, J. H., Wei, Z.Z., Chen, D., Gu, X., Wei, L., Yu, S.P. (2015). A neuroprotective role of the NMDA receptor subunit GluN3A (NR3A) in ischemic stroke of the adult mouse. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 308, C570–C577.
- Li, S., Jin, M., Koeglsperger, T., Shepardson, N.E., Shankar, G.M., Selkoe, D.J. (2011). Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *Journal of Neuroscience* 31, 6627–6638.
- Li, Y. H. und Han, T. Z. (2007). Glycine binding sites of presynaptic NMDA receptors may tonically regulate glutamate release in the rat visual cortex. *Journal of Neurophysiology* 97, 817–823.
- Liu, X.B, Murray, K.B., Jones, E.G (2004). Switching of NMDA Receptor 2A and 2B Subunits at Thalamic and Cortical Synapses during Early Postnatal Development. *Journal of Neuroscience* 24 (40), 8885-8895.
- Liu, Y., Wong, T.P., Aarts, M., Rooyackers, A., Liu, L., Lai, T.W., Wu, D.C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A.M., Wang, Y.T. (2007). NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *Journal of Neuroscience* 27, 2846–2857.
- Lopez de Armentia, M. und Sah, P. (2003). Development and subunit composition of synaptic NMDA receptors in the amygdala: NR2B synapses in the adult central amygdala. *Journal of Neuroscience* 23, 6876–6883.
- Lozovaya, N.A., Grebenyuk, S.E., Tsintsadze, T., Feng, B., Monaghan, D.T., Krishtal, O.A. (2004). Extrasynaptic NR2B and NR2D subunits of NMDA receptors shape “superslow” afterburst EPSC in rat hippocampus. *Journal of Physiology* 558, 451–463
- [Lü W, Du J, Goehring A, Gouaux E. \(2017\).](#) Cryo-EM structures of the triheteromeric NMDA receptor and its allosteric modulation. *Science* 355 (6331), eaal3729
- Lu, W., Gray, J.A., Granger, A.J., During, M.J., Nicoll, R.A. (2011). Potentiation of synaptic AMPA receptors induced by the deletion of NMDA receptors requires the GluA2 subunit. *Journal of Neurophysiology* 105, 923–928.
- Luk, K.C. und Sadikot, A.F (2001). GABA promotes survival but not proliferation of parvalbumin-immunoreactive interneurons in rodent neostriatum: an in vivo study with stereology. [Neuroscience 104 \(1\)](#), 93-103
- Luo, J., Wang, Y., Yasuda, R.P, Dunah, A.P., Wolfe, B.B. (1997). The Majority of N-Methyl-d-Aspartate Receptor Complexes in Adult Rat Cerebral Cortex Contain at least Three Different Subunits (NR1/NR2A/NR2B). *Molecular Pharmacology* 51 (1), 79-86
- Magee, J.C. (2000). Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nature Reviews Neuroscience* 1, 181-190
- Magnusson, K. R., Brim, B. L., Das, S. R. (2010). Selective vulnerabilities of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors during brain aging. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2, 11.
- Mameli, M., Carta, M., Partridge, L. D., Valenzuela, C. F. (2005). Neurosteroid-induced plasticity of immature synapses via retrograde modulation of presynaptic NMDA receptors. *Journal of Neuroscience* 25, 2285–2294.
- Marco, S., Giralto, A., Petrovic, M.M., Pouladi, M.A., Martinez-Turrillas, R., Martinez-Hernandez, J., Kaltenbach, L.S., Torres-Peraza, J., Graham, R.K., Watanabe, M., Luján, R., Nakanishi, N., Lipton, S.A., Lo, D.C., Hayden, M.R., Alberch, J., Wesseling, J.F., Pérez-Otano, I. (2013). Suppressing aberrant GluN3A expression rescues synaptic and behavioral impairments in Huntington’s disease models. *Nature Medicine* 19, 1030–1038.
- Marsden, W.N. (2011). Stressor-induced NMDAR dysfunction as a unifying hypothesis for the aetiology, pathogenesis and comorbidity of clinical depression. *Medical Hypotheses* 77(4), 508-528.

- Martel, M. A., Ryan, T.J., Bell, K.F.S., Fowler, J.H., McMahon, A., Al-Mubarak, B., Komiyama, N.H., Horsburgh, K., Kind, P.C., Grant, S.G.N., Wyllie, D.J.A., Hardingham, G.E. (2012). The subtype of GluN2 C-terminal domain determines the response to excitotoxic insults. *Neuron* 74, 543–556.
- Martel, M.A., Wyllie, D.J.A., Hardingham, G.E. (2009). In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death. *Neuroscience* 158 (1), 334–43.
- McKay, S., Griffith, N.H., Butters, P.A., Thubron, E.B., Hardingham, G.E., Wyllie, D.J.A. (2012). Direct pharmacological monitoring of the developmental switch in NMDA receptor subunit composition using TCN 213, a GluN2A-selective, glycine-dependent antagonist. *British Journal of Pharmacology* 166, 924–937.
- Merchant, R.E., Bullock, M.R., Carmack, C.A., Shah, A.K., Wilner, K.D., Ko, G., Willams, S.A. (2006). A Double-Blind, Placebo-Controlled Study of the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of CP-101,606 in Patients with a Mild to Moderate Traumatic Brain Injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*
- Moghaddam, B. und Javitt, D. (2012). From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology* 37, 4–15.
- Mohn, A. R., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., Koller, B. H. (1999). Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 98, 427–436
- Mohn, A.R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Koller, B.H., (1999). Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to Schizophrenia. *CellPress* 98(4), 427–436
- Mony, L., Zhu, S., Carvalho, S., Paoletti, P. (2011). Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO Journal* 30, 3134–3146.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529–540.
- Moser, E. I., Kropff, E., Moser, M.B. (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annual Review of Neuroscience* 31, 69–89.
- Mueller, H.T. und Meador-Woodruff, J.H. (2003). Expression of the NR3A subunit of the NMDA receptor in human fetal brain. *Annals of New York Academy of Science* 1003, 448–451.
- Müller B.M., Kistner, U., Kindler, S., Chung, W.J., Kuhlendahl, S., Fenster, S.D., Lau, L.F., Veh, R.W., Huganir, R.L., Gundelfinger, E.D., Garner, C.C. (1996). SAP 102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron* 2, 255–65.
- Müller, M.K., Jacobi, E., Sakimura, K., Malinow, R., von Engelhardt, J. (2018). NMDA receptors mediate synaptic depression, but not spine loss in the dentate gyrus of adult amyloid Beta (A β) overexpressing mice. *Acta Neuropathologica Communications* 6, 110
- Müller, M.K. (2015). NMDA Receptor-Dependent Amyloid Beta Toxicity in the Context of Alzheimer's Disease. *Combined Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics of the Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany*.
- Nagy, A. (2000). Cre Recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring. *Genesis* 26, 99–109.
- Nakanishi, N., Vergnano, A.M., Filliol, D., Ouagazzal, A.-M., Le Goff, A., Carvalho, S., Reiss, D., Gaveriaux-Ruff, C., Neyton, J., Paoletti, P., Kieffer, B.L. (2009). Neuroprotection by the NR3A subunit of the NMDA receptor. *Journal of Neuroscience* 29, 5260–5265.
- Newcomer, J.W., Farber, N.B., Jevtovic-Todorovic, V., Selke, G., Melson, A.K., Hershey, T., Craft, S., Olney, J.W. (1999). Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology* 20, 106–118.

- [Neyton, J.](#) und [Paoletti, P. \(2006\)](#). Relating NMDA Receptor Function to Receptor Subunit Composition: Limitations of the Pharmacological Approach. *Journal of Neuroscience* 26 (5), 1331–1333.
- Nguyen, H.H.P., Cenci, M.A. (2015). Behavioral Neurobiology of Huntington's Disease and Parkinson's Disease. *Springer Verlag* ISBN-13 : 978-3662463437
- Nicholls, D.G. und Budd, S.L. (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiological Review* 80, 315–360.
- Nozaki, C., Vergnano, A.M., Filliol, D., Ouagazzal, A-M., Le Goff, A., Carvalho, D., Reiss, D., Gaveriaux-Ruff, C., Neyton, J., Paoletti, P., Kieffer, B.L. (2011). Zinc alleviates pain through highaffinity binding to the NMDA receptor NR2A subunit. *Nature Neuroscience* 14, 1017–1022.
- [Olsen](#), R.K., Moses, S.N., [Riggs](#), L., Olsen, Ryan, J.D. (2012). The hippocampus supports multiple cognitive processes through relational binding and comparison. *Frontiers in Human Neuroscience* 25 (6), 146.
- Onn, S. P., Berger, T. W., Grace, A. A. (1994). Identification and characterization of striatal cell subtypes using in vivo intracellular recording in rats: I. Basic physiology and response to corticostriatal fiber stimulation. *Synapse* 16(3), 161–180.
- Pachernegg, S., Strutz-Seebohm, N., Hollmann, M. (2012). GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends in Neuroscience* 35, 240–249.
- Paoletti P., Bellone C., Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Review in Neuroscience* 4 (6), 383-400.
- Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *European Journal of Neuroscience* 33, 1351–1365.
- Paoletti, P. und Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. [Current Opinion in Pharmacology](#) 7 (1), 39-47.
- Paoletti, P., Ascher, P., Neyton, J. (1997). High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1–NR2A receptors. *Journal of Neuroscience* 17, 5711–5725.
- Parsons, C. G., Stoffler, A., Danysz, W. (2007). Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system - too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology* 53, 699–723.
- Pernia-Andrade, A. J. und Jonas, P. (2014). Theta-gamma-modulated synaptic currents in hippocampal granule cells in vivo define a mechanism for network oscillations. *Neuron* 81(1), 140–152.
- Petralia, R. S., Wang, Y., Hua, F., Yi, Z., Zhou, A., Ge, L., Stephenson, F.A., Wenthold, R.J. (2010). Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations. *Neuroscience* 167, 68–87.
- Philpot, B. D., Sekhar, A. K., Shouval, H. Z., Bear, M. F. (2001). Visual experience and deprivation bidirectionally modify the composition and function of NMDA receptors in visual cortex. *Neuron* 29, 157–169.
- Pineiro, P.S. und Mulle, C. (2008). Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanism of action. *Nature Review Neuroscience* 9 (6), 423-36.
- [Piña-Crespo](#), J.C., Talantova, M., Micu, I., States, B., Chen, H.S.V., Tu, S., Nakanishi, N., Tong, Zhang, D., Heinemann, S.F., Zamponi, G.W., Stys, P.K., Lipton, S.A. (2010). Excitatory Glycine Responses of CNS Myelin Mediated by NR1/NR3 “NMDA” Receptor Subunits. [Journal of Neuroscience](#) 30 (34), 11501–11505.
- Plotkin, J. L. und Goldberg, J. A. (2018). Thinking outside the box (and arrow): Current themes in striatal dysfunction in movement disorders. *Neuroscientist* 4, 359-379.
- Prager E.M. und Plotkin J.L. (2019). Compartmental function and modulation of the striatum. *Journal of Neuroscience Research* 97, 1503-1514.

- Rauner, C. und Köhr, G. (2011). Triheteromeric NR1/NR2A/ NR2B receptors constitute the major N-methylD-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses. *Journal of Biological Chemistry* 286, 7558–7566.
- Retchless, B.S., [Gao](#), W., Johnson, J.W. (2012). A single GluN2 subunit residue controls NMDA receptor channel properties via intersubunit interaction. *Nature Neuroscience* 15(3), 406-13, S1-2.
- Riou, M., Stroebel, D., Edwardson, J. M., Paoletti, P. (2012). An alternating GluN1-2-1-2 subunit arrangement in mature NMDA receptors. *PLOS ONE* 7, e35134.
- Roberts, A. C., Diez-Garcia, J., Rodriguez, R.M., Lopez, I.P., Lujan, R., Martinez-Turrillas, R., Pico, E., Henson, M.A., Bernardo, D.R., Jarrett, T.M., Clendeninn, D.J., Lopez-Mascaraque, L., Feng, G., Lo, D.C., Wesseling, J.F., Wetsel, W.C., Philpot, B.D., Perez-Otano, I. (2009). Downregulation of NR3A-containing NMDARs is required for synapse maturation and memory consolidation. *Neuron* 63, 342–356.
- Rodenas-Ruano, A., Chavez, A. E., Cossio, M. J., Castillo, P. E., Zukin, R. S. (2012). REST-dependent epigenetic remodeling promotes the developmental switch in synaptic NMDA receptors. *Nature Neuroscience* 15, 1382–1390.
- Rönicke, R., Mikhaylova, M., Rönicke, S., Meinhardt, J., Schröder, U.H., Fändrich, M., Reiser, G., Kreutz, M.R., Reymann, K.G. (2011). Early neuronal dysfunction by amyloid β oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiology of Aging* 32, 2219–2228.
- Rumbaugh G. und Vicini S. (1999). Distinct synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons. *Journal of Neuroscience* 19, 10603–10610.
- Rumbaugh, G., Prybylowski, K., Wang, J. F., Vicini, S. (2000). Exon 5 and spermine regulate deactivation of NMDA receptor subtypes. *Journal of Neurophysiology* 83, 1300–1306.
- Salter, M. G. und Fern, R. (2005). NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature* 438, 1167–1171.
- Salussolia, C. L., Prodromou, M. L., Borker, P., Wollmuth, L. P. (2011). Arrangement of subunits in functional NMDA receptors. *Journal of Neuroscience* 31, 11295–11304.
- [Sannino](#), S., [Russo](#), F., Torromino, G., Pendolino, G., Calabresi, P., De Leonibus, E. (2012). Role of the dorsal hippocampus in object memory load. *Learning and Memory* 19, 211-218.
- Sans, N., Petralia, R.S., Wang, Y.X., Blahos 2nd, J., Hell, J.W., Wenthold, R.J. (2000). A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *Journal of Neuroscience* 20, 1260–1271.
- Sanz-Clemente, A., Matta, J. A., Isaac, J. T., Roche, K. W. (2010). Casein kinase 2 regulates the NR2 subunit composition of synaptic NMDA receptors. *Neuron* 67, 984–996.
- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., Wesker, K.H. Prometheus Der Lernatlas der Anatomie – Kopf, Hals und Neuroanatomie. 5. Auflage, *Thieme* ISBN: 978 – 3 – 132 – 42091 – 5.
- Scoville, W. B. und Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, Psychiatry* 20, 11–21.
- Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L. A., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (1994). Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368, 144–147.
- Shinohara, Y., Hirase, H., Watanabe, M., Itakura, M., Takahashi, M., Shigemoto, R. (2008). Left-right asymmetry of the hippocampal synapses with differential subunit allocation of glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 105 (49), 19498-19503.
- Sidman, M., Stoddard, L. T., and Mohr, J. P. (1968). Some additional quantitative observations of immediate memory in a patient with bilateral hippocampal lesions. *Neuropsychologia* 6, 245–254.

- Smith, J. B., Klug, J. R., Ross, D. L., Howard, C. D., Hollon, N. G., Ko, V. I., Hoffman, Hilary, Callaway, E.M., Gerfen, C.R., Jin, X. (2016). Genetic-based dissection unveils the inputs and outputs of striatal patch and matrix compartments. *Neuron* 91 (5), 1069–1084
- Soares, C. und Lee, K.F.H. (2013). A Prominent Role for Triheteromeric GluN1/GluN2A/GluN2B NMDARs at Central Synapses *The Journal of Neuroscience* 33 (38),14975–14977.
- Sobolevsky, A.I., Rosconi, M.P., Gouaux, E. (2009). X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462, 745–756
- Soltesz, I. und Losonczy, A. (2018). CA1 pyramidal cell diversity enabling parallel information processing in the hippocampus. *Nature Neuroscience* 21 (4), 484–493.
- Soriano, F.X., Martel, M.A., Papadia, S., Vaslin, A., Baxter, P., Rickman, C., Forder, J., Tymianski, M., Duncan, R., Aarts, M., Clarke, P.G.H., Wyllie, D.J.A., Hardingham, G.E. (2008). Specific targeting of pro-death NMDA receptor signals with differing reliance on the NR2B PDZ ligand. *Journal of Neuroscience* 28, 10696–10710
- [Stocca, G., Vicini, S. \(1998\).](#) Increased contribution of NR2A subunit to synaptic NMDA receptors in developing rat cortical neurons. *Journal of Physiology* 507 (1), 13–24.
- Storey, G., Opitz-Araya, X., Barria A. (2011). Molecular Determinants Controlling NMDA Receptor Synaptic Incorporation. *Jornal of Neuroscience* 31 (17), 6311-6
- Sun, W., Wong, J.M., Gray, J.A., Carter, B.C. (2018). Incomplete block of NMDA receptors by intracellular MK-801. *Journal of Neuropharmacology* 143, 122-129
- Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y., Nairn, A.C., Salter, M.W., Lombroso, P.J., Gouras, G.K., Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nature Neuroscience* 8, 1051-8.
- Terasaki, Y., Sasaki, T., Yagita, Y., Okazaki, S., Sugiyama, Y., Oyama, N., Omura-Matsouka, E., Sakoda, S., Kitagawa, K. (2010). Activation of NR2A Receptors Induces Ischemic Tolerance through CREB Signaling. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 81441-9.
- Thomas, C.G., Miller, A.J., Westbrook, G.L. (2005). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology* 95 (3), 1727-34.
- Tóth, K, Gulyas, A.I., Hajos, N., Freund, T.F. (1996). Differences between Somatic and Dendritic Inhibition in the Hippocampus. *Neuron* [16 \(4\)](#), 815-823.
- Tovar, K. R. und G. L. Westbrook (2002). Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 34 (2), 255-264.
- Tovar, K. R., McGinley, M.J., Westbrook G.L. (2013). Triheteromeric NMDA receptors at hippocampal synapses. *Journal of Neuroscience* 33 (21), 9150-9160.
- Tovar, K.R und Westbrook, G.L. (1999). Incorporation of NMDA Receptors with a distinct subunit compopsition at nascent hippocampal synapses in vitro. *Journal of Neuroscience* 19 (10), 4180-4188.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews* 62, 405–496.
- Trepel, M. (2017). Neuroanatomie. 7. Auflage, *Elsevier*. ISBN: 978 – 3 – 437 – 41288 – 2
- Tsodyks, M. und Markram, H. (1997). The neural code between neocortical pyramidal neurons depends on neurotransmitter release probability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA* 94 (2), 719–723

- Tu, W., Xu, X., Peng, L., Zhong, X., Zhang, W., Soundarapandian, M.M., Balel, C., Wang, M., Jia, N., Zhang, W., Lew, F., Chan, S.L., Chen, Y., Lu, Y. (2010). DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke. *Cell* 140, 222–234.
- Ultanir, S.K., Kim, J.E., Hall, B.J., Deerinck, T., Ellisman, M., Ghosh, A. (2007). Regulation of spine morphology and spine density by NMDA receptor signaling in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 19553–19558.
- Vance, K. M., Hansen, K. B., Traynelis, S. F. (2012). GluN1 splice variant control of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *Journal of Physiology* 590, 3857–3875.
- Varela, J.A., Sen, K., Gibson, J., Fost, J., Abbott, L.F., Nelson, S.B. (1997). A quantitative description of short-term plasticity at excitatory synapses in layer 2/3 of rat primary visual cortex. *Journal Neuroscience* 17 (20), 7926–40.
- Vicini, S., Wang, J.F., Li, J.H., Zhu, W.J., Wang, Y.H., Luo, J.H., Wolfe, B.B., Grayson, D.R. (1998). Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal Neurophysiology* 79, 555–566.
- Von Engelhardt, J., B. Doganci, [Jensen, V.](#), [Hvalby, Ø.](#), [Göngrich, C.](#), [Taylor, A.](#), [Barkus, C.](#), [Sanderson, D.J.](#), [Rawlins, J.N.P.](#), [Seeburg, P.H.](#), [Bannerman, D.M.](#), [Monyer, H.](#) (2008). Contribution of hippocampal and extrahippocampal NR2B-containing NMDA receptors to performance on spatial learning tasks. *Neuron* 60 (5), 846–860.
- Von Engelhardt, J., Bocklisch, C., Tönges, L., Herb, A., Mishina, M., Monyer, H. (2015). GluN2D-containing NMDA receptors mediate synaptic currents in hippocampal interneurons and pyramidal cells in juvenile mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9, 95.
- Wang, H., Stradtman, G.G., Wang, X.J., Gao, W.J. (2008). A specialized NMDA receptor function in layer 5 recurrent microcircuitry of the adult rat prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (43), 16791–16796.
- Wang, S., Scott, B., Wojtowicz, J. (2000). Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *Journal of Neurobiology* 42 (2), 248–257.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., Mishina, M. (1992). Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3, 1138–1140.
- Welsch, U., Kummer, W., Deller, T. (2018). Histologie, das Lehrbuch. 5. Auflage, Elsevier. ISBN: 978 – 3 – 437 – 44434 – 0.
- [Wenzel, A.](#), [Fritschy, J.M.](#), [Mohler, H.](#), [Benke, D.](#) (1997). NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *Journal of Neurochemistry* 68 (2), 469–78.
- [Williams, K](#) (1993). Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Molecular Pharmacology* 44 (4), 851–9.
- Woodhall, G., Evans, D. I., Cunningham, M. O., Jones, R. S. (2001). NR2B-containing NMDA autoreceptors at synapses on entorhinal cortical neurons. *Journal of Neurophysiology* 86, 1644–1651.
- Xia, P., Chen, H. S., Zhang, D., Lipton, S. A. (2010). Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses. *Journal of Neuroscience* 30, 11246–11250.
- Yang, J., Woodhall, G. L., Jones, R. S. (2006). Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic NR2B-containing NMDA receptors is increased in the entorhinal cortex of chronically epileptic rats. *Journal of Neuroscience* 26, 406–410.

- Yano, S., Tokumitsu, H., Sodeling T.R. (1998). Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 396, 584–587.
- Ye, G., Yi, S., Gamkelidze, G., Pasternak, J.F., Trommer, B.L. (2005). AMPA and NMDA receptor-mediated currents in developing dentate gyrus granule cells. *Developmental Brain Research* 155, 26-32.
- Yeckel, M.F. und Berger T.W. (1990). Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 5832-6.
- [Yi F., Traynelis S.F., Hansen K.B. \(2017\).](#) Selective Cell-Surface Expression of Triheteromeric NMDA Receptors. *Methods Molecular Biology* 1677, 145-162.
- [Yi F., Zachariassen L.G., Dorsett K.N., Hansen K.B. \(2018\).](#) Properties of Triheteromeric N-Methyl-d-Aspartate Receptors Containing Two Distinct GluN1 Isoforms. *Molecular Pharmacology* 93 (5), 453-467.
- Yuan, T., [Mameli, M.](#), [O'Connor, E.C.](#), [Dey, P.N.](#), [Verpelli, C.](#), [Sala, C.](#), [Perez-Otano, I.](#), [Lüscher, C.](#), [Bellone, C.](#) (2013). Expression of cocaine-evoked synaptic plasticity by GluN3A-containing NMDA receptors. *Neuron* 80, 1025–1038.
- [Zhong, J., Carrozza, D.P., Williams, K., Pritchett, D.B., Molinoff, P.B. \(1995\).](#) Expression of mRNAs Encoding Subunits of the NMDA Receptor in Developing Rat Brain. *Journal of Neurochemistry* 64, 531-539.

8. Danksagung

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

9. Lebenslauf von Mariel Hanna Braunbeck

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]