

Aus dem Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum der Charité

Direktor: Prof. Dr. Dietmar Schmitz

Habilitationsschrift

„Zur synaptischen Transmission und Plastizität
in kortikalen Hirnschnittpräparaten“

Zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Physiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. Christian Wozny

Eingereicht im Juni 2013

Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachterin: Prof. Dr. Marlene Bartos

2. Gutachter: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Inhalt

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | Einleitung – Stand der Forschung | 4 |
| 1.1 | Neuronale Schaltkreise im Neokortex und im Hippokampus..... | 4 |
| 1.2 | Synaptische Transmission | 5 |
| 1.3 | Synaptische Plastizität | 6 |
| 1.4 | Fragestellung | 6 |
| 2 | Eigene Arbeiten..... | 8 |
| 2.1 | Neuronale Schaltkreise im Neokortex..... | 8 |
| 2.2 | Modulation der synaptischen Transmission im Subikulum | 19 |
| 2.3 | Präsynaptische Plastizität..... | 30 |
| 2.4 | Postsynaptische Plastizität..... | 36 |
| 2.5 | Homöostatische Plastizität..... | 47 |
| 3 | Diskussion | 57 |
| 4 | Zusammenfassung | 62 |
| 5 | Literatur | 63 |
| 6 | Danksagung..... | 68 |
| 7 | Eidesstattliche Erklärung | 69 |

Abkürzungen

| | |
|--------|--|
| AC | Adenylylcyclase |
| AMPA | α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat |
| AP | Aktionspotential |
| CA1 | Hippokampale Region Cornu ammonis 1 |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| EPSP | exzitatorisches postsynaptisches Potential |
| GABA | γ -Aminobuttersäure |
| GluA1i | Flip-Form der Glutamatrezeptor-Untereinheit A1 |
| GluA1o | Flop-Form der Glutamatrezeptor Untereinheit A1 |
| L1 | „Layer 1“/Schicht 1 des Neokortex |
| LTP | Langzeitpotenzierung |
| mGluR | metabotrope Glutamatrezeptor |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| NGFC | neurogliaforme Zelle |
| PKA | Proteinkinase A |

1 Einleitung – Stand der Forschung

1.1 Neuronale Schaltkreise im Neokortex und im Hippokampus

Die funktionelle Architektur neuronaler Schaltkreise bildet die Grundlage des heutigen Verständnisses der Funktionsweise des Gehirns. Wahrnehmung, Emotionen, Lernen und Gedächtnis und schließlich bestimmte Verhaltensweisen können verschiedenen Gehirnarealen zugeordnet werden. Der Hippokampus ist unter anderem involviert in räumliche Lernprozesse, der Neokortex beteiligt an der Verarbeitung von visuellen, auditiven als auch sensiblen Wahrnehmungen. Die Verschaltungen der Nervenzellen im Hippokampus sowie im Neokortex sind Gegenstand heutiger Forschung. Dennoch ist es gegenwärtig (noch) nicht möglich aus der Wirkungsweise neuronaler Schaltkreise Verhaltensweisen zu extrapolieren. Nichtsdestotrotz liefern die Untersuchungen zur Verschaltungen verschiedener neuronaler Zelltypen wichtige Hinweise auf die Funktionsweise der entsprechenden Hirnregionen.

Zentrale Elemente neuronaler Schaltkreise sind exzitatorische Projektionsneurone, Pyramidalzellen, und lokale, inhibitorische Interneurone. Dreiviertel der Neurone im Hippokampus und im Neokortex sind exzitatorische Pyramidalzellen, die somit die Hauptgruppe der Nervenzellen stellen. In der Regel zeichnen sich Pyramidalzellen durch ihre stereotypen Eigenschaften aus (Spruston, 2008). Die anatomischen und physiologischen Eigenschaften, wie z.B. die Arborisierung des Dendritenbaumes oder das Entladungsverhalten der Pyramidalzellen, sind in einer bestimmten Hirnregion, wie z.B. in der Area CA1 oder in der Schicht 5 des Neokortex, sehr ähnlich. In der Area CA1 des Hippokampus liegen die Zellkörper (Somata) der Nervenzellen in der sogenannten Pyramidalschicht (Stratum pyramidale). Der Dendritenbaum lässt sich in zwei größere Domänen unterteilen: basale und apikale Dendriten. In der Regel verlässt ein apikaler Dendrit das Soma, der sich bis zur sogenannten Tuft-Region mehrfach aufteilt. Dendriten sind bestückt mit Dornfortsätzen ('Spines'), die Kontakte mit Axonen anderer Nervenzellen eingehen. Biochemische Marker zur Differenzierung bestimmte Typen von Pyramidalzellen sind bislang nicht beschrieben worden.

Inhibitorische Interneurone stellen eine weitaus heterogenere Gruppe von Neuronen dar (Ascoli et al., 2008). Sie lassen sich anhand ihrer

anatomischen, elektrophysiologischen und biochemischen Charakteristika unterscheiden. Durch die Freisetzung des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) hemmen Interneurone in der Regel benachbarte Zellen. Funktionell lassen sich Interneurone in drei größere Gruppen einteilen, abhängig davon, ob sie primär mit dem Zellkörper (im engl. sogenannte ‚perisomatic-targeting interneurons‘), den Dendriten (‚dendrite-targeting interneurons‘) und dem Axon (‚axon-targeting interneurons‘) synaptische Kontakte eingehen.

1.2 Synaptische Transmission

Neurone kommunizieren miteinander auf zwei verschiedene Weisen. Zum einen sind Nervenzellen elektrisch miteinander verbunden über sogenannte Hemichannel, die elektrische Ladung leiten können, zum anderen beruht die neurale Kommunikation auf der chemischen Freisetzung von Botenstoffen, Neurotransmittern. Man unterscheidet exzitatorische und inhibitorische Neurotransmission. Exzitatorische Pyramidalzellen setzen den Neurotransmitter Glutamat frei, welches nach der Freisetzung aus der präsynaptische Terminale an postsynaptische Rezeptoren bindet.

Ionotrope Glutamatrezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle. Durch den Einstrom von Kationen kommt es zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran, einer postsynaptischen Potentialänderung, auch exzitatorisches postsynaptisches Potenzial (EPSP) genannt. Man unterscheidet drei verschiedene Arten von ionotropen Glutamatrezeptoren: AMPA-Rezeptoren (abgekürzt: GluA), NMDA-Rezeptoren (GluN) sowie Kainat-Rezeptoren (GluK) (Traynelis et al., 2010). AMPA-Rezeptoren vermitteln die schnelle exzitatorische Komponente, während GluN-vermittelte Stromantworten deutlich langsamer sind.

Die Familie der AMPA-Rezeptoren besteht aus vier verschiedenen Untereinheiten (GluA1-A4; früher GluR1-4, bzw. GluRA-D). Es ist bekannt, dass AMPA-Rezeptoruntereinheiten sowohl Homomere sowie auch Heteromere bilden können. Die Struktur-Funktionszusammenhänge sind ausführlich an rekombinanten AMPA-Rezeptoren untersucht worden (Hollmann and Heinemann, 1994).

Metabotrope Glutamatrezeptoren spielen in der Modulation synaptischer Transmission eine bedeutende Rolle. Diese Rezeptoren gehören zu einer Familie von Proteinen, die nach Bindung durch einen Liganden, intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Die Familie der metabotropen Glutamatrezeptoren umfasst derzeit acht verschiedene Subtypen (mGluR 1-8), die wiederum in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden können (mGluR I-III).

1.3 Synaptische Plastizität

Veränderungen der synaptischen Übertragung werden unter dem Begriff synaptische Plastizität subsummiert und dienen als zelluläres Korrelat für Lernen und Gedächtnis (Bliss and Collingridge, 1993).

Wird die synaptische Übertragungsstärke vermindert, spricht man von einer Langzeitdepression, wird sie verstärkt, von einer Langzeitpotenzierung der synaptischen Transmission (LTP). Plastische Veränderungen kommen sowohl auf der präsynaptischen Seite, genauer in der präsynaptischen Endigung, als auch auf der postsynaptischen Seite vor. Präsynaptisch können die Freisetzungswahrscheinlichkeit der synaptischen Vesikel, als auch die Anzahl der Freisetzungsorte variiert werden, postsynaptisch kann z.B. die Anzahl der Rezeptoren verändert werden (Abbott and Regehr, 2004).

Der Begriff homöostatische Plastizität beschreibt Veränderungen neuronaler Schaltkreise, die darauf abzielen die neuronale Exzitabilität zu regulieren. Diese Mechanismen verhindern im Prinzip, dass ein neuronales Netzwerk hypo- oder hyperaktiv wird (Turrigiano, 1999).

1.4 Fragestellung

In den oberflächlichen Schichten des Neokortex sowie den hippokampalen Arealen CA1 und Subikulum sind wir den folgenden Fragestellungen zur synaptischen Transmission und synaptischen Plastizität nachgegangen:

- In den oberflächlichen Schichten des Neokortex fragten wir, ob und wie exzitatorische Pyramidalzellen und bestimmte Typen inhibitorischer Interneurone miteinander kommunizieren.

- Im Subikulum, welches Teil der sogenannten hippocampalen Formation ist, können zwei verschiedene exzitatorische Pyramidalzellen aufgrund ihres Entladungsverhaltens elektrophysiologisch unterschieden werden. Ob diese Zelltypen unterschiedliche Formen synaptischer Plastizität zeigen, war zu Beginn unserer Untersuchungen weitgehend unbekannt, ebenso die präsynaptische Modulation der Eingänge auf diese zwei verschiedenen Pyramidalzellen.

- Die Area CA1 des Hippokampus hingegen ist als eine Art ‚Modellregion‘, in der seit langem die Mechanismen synaptischer Plastizität untersucht werden und wurden. Diese Form der Plastizität ist gekennzeichnet durch die Zunahme von AMPA-Rezeptoren in der synaptischen Membran, die man ‚trafficking‘ bezeichnet. Die genaue Signalkaskade ist Gegenstand hiesiger Untersuchungen. Wir sind der Frage nachgegangen, ob das sogenannte Protein 4.1 als Interaktionspartner des C-Terminus der GluA1-Untereinheit an der Rekrutierung von AMPA-Rezeptoren beteiligt ist.

- Posttranskriptionelle Modifikationen schließen auch das sogenannte ‚alternative Spleißen‘ (engl. ‚alternative splicing‘) der ‚messenger Ribonukleinsäure‘ (kurz ‚mRNA‘) ein. Aus einer RNA-Vorstufe, der ‚prä-mRNA‘ entsteht die reife mRNA. AMPA-Rezeptor bestehen aus verschiedenen Untereinheiten, die in jeweils zwei Formen, den sogenannten ‚Flip‘- und ‚Flop‘-Isoformen, vorkommen können. Sie unterscheiden sich durch die Existenz alternativ gespleißter prä-mRNA Exone. Wir fragten, ob Flip- und Flop-Isoformen der AMPA-Rezeptoruntereinheiten aktivitätsabhängig reguliert werden können.

2 Eigene Arbeiten

2.1 Neuronale Schaltkreise im Neokortex

Seit Ende der Fünfziger Jahre des letzten Jahrhunderts ist bekannt, dass der sechs-schichtige Neokortex funktionell in Kolumnen unterteilt werden kann (Mountcastle, 1957). Die Arbeiten von Mountcastle und Kollegen sowie die Untersuchungen von Hubel und Wiesel konnten demonstrieren, dass die Nervenzellen einer vertikalen Kolumne nur durch eine Sinnesqualität aktiviert werden können (Hubel and Wiesel, 1998; Mountcastle, 1997). Um die Informationsverarbeitung im Neokortex zu verstehen, ist es notwendig die Verschaltung der beteiligten Neuronen in solch einer kortikalen Kolumne zu untersuchen (Douglas and Martin, 2004). Allerdings ist man von einer vollständigen funktionalen Beschreibung der lokalen Verbindungen sowie der Projektionen aus anderen kortikalen und subkortikalen Arealen noch weit entfernt (Helmstaedter et al., 2007).

Die exzitatorische Verschaltung (*„canonical pathway“*) innerhalb einer kortikalen Kolumne kann für sensorische Signale wie folgt beschrieben werden: nachdem periphere sensorische Signale zunächst im Thalamus verarbeitet werden, erregen thalamo-kortikale Fasern Sternzellen (*„spiny stellate cells“*) in Schicht 4 (L4), welche wiederum auf Schicht 2/3 (L2/3) Pyramidenzellen projizieren. Diese erregen Schicht 5 (L5) Projektionsneurone, deren Axone die Großhirnrinde schließlich verlassen (Lubke and Feldmeyer, 2007).

Während die exzitatorischen Verbindungen, wie dargelegt, relativ gut charakterisiert sind, weiß man über die synaptischen Verbindungen zwischen Projektionsneuronen und inhibitorischen Interneuronen relativ wenig. Das liegt zum einen an der Vielzahl der unterschiedlichen Typen inhibitorischer Nervenzellen (Klausberger and Somogyi, 2008; Markram et al., 2004) als auch an der Tatsache, dass sich die Mehrzahl der wissenschaftlichen Untersuchungen über inhibitorischen Neurone auf somatische Inhibition durch sogenannte schnell-feuernde Basketzellen fokussiert (Bartos and Elgueta, 2012) und dendritische Inhibition weitgehend außer Acht gelassen hat.

In der vorliegenden Arbeit haben wir die elektrophysiologischen und anatomischen Eigenschaften der Schicht 1 (L1) Neuronen im somatosensorischen Kortex der Ratte (postnatal Tag 24 - 36) und ihre

synaptischen Konnektivität mit supragranular liegenden Pyramidenzellen (L2/3 Pyramidalzellen) untersucht. Aufgrund der aktiven und passiven elektrischen Eigenschaften wurden die L1 Neurone mit Hilfe des Petilla Klassifikationsschemas in vier Gruppen eingeteilt (Ascoli et al., 2008). Anatomische Rekonstruktionen unterstützten die Existenz von verschiedenen neuronalen Gruppen und eine multiparameterische Cluster-Analyse bestätigte schließlich das Vorliegen von vier Subtypen von inhibitorischen Nervenzellen in L1.

Synaptisch verbundene L1 Neurone und L2/3 Pyramidenzellen zeigten eine Zielzellspezifität, sowohl in erregenden wie in hemmenden Verbindungen. Mit Ausnahme der neurogliaformen Zellen (NGFCs) erhalten alle Gruppen von L1 Neuronen monosynaptische exzitatorische Eingänge von L2/3 Pyramidalzellen. Allerdings hemmen NGFCs L2/3 Pyramidenzellen langanhaltend mittels einer Aktivierung von ionotropen und metabotropen GABA-Rezeptoren (siehe auch Tamas et al., 2003).

Zusammenfassend belegen diese Daten eine hohe Spezifität von erregenden und hemmenden Verbindungen in den oberflächlichen Schichten des Neokortex und sie erweitern das bestehende Schaltbild der kolumnaren Organisation um weitere bislang unbekannte lokale Verbindungen.

Abstract

Wozny C & Williams SR. Specificity of synaptic connectivity between layer 1 inhibitory interneurons and layer 2/3 pyramidal neurons in the rat neocortex. *Cereb Cortex* 2011, 21: 1818-26. Epub 2011 Jan 10.

Understanding the structure and function of the neocortical microcircuit requires a description of the synaptic connectivity between identified neuronal populations. Here, we investigate the electrophysiological properties of layer 1 (L1) neurons of the rat somatosensory neocortex (postnatal day 24--36) and their synaptic connectivity with supragranular pyramidal neurons. The active and passive properties of visually identified L1 neurons (n = 266) suggested division into 4 groups according to the Petilla classification scheme with characteristics of neurogliaform cells (NGFCs) (n = 72), classical-accommodating (n = 137), fast-spiking (n = 23), and burst-spiking neurons (n = 34). Anatomical reconstructions of L1 neurons supported the existence of 4 major neuronal groups. Multiparameter unsupervised cluster analysis confirmed the existence of 4 groups, revealing a high degree of similarity with the Petilla scheme. Simultaneous recordings between synaptically connected L1 neurons and L2/3 pyramidal neurons (n = 384) demonstrated neuronal class specificity in both excitatory and inhibitory connectivity and the properties of synaptic potentials. Notably, all groups of L1 neurons received monosynaptic excitatory input from L2/3 pyramidal neurons (n = 33), with the exception of NGFCs (n = 68 pairs tested). In contrast, NGFCs strongly inhibited L2/3 pyramidal neurons (n = 12 out 27 pairs tested). These data reveal a high specificity of excitatory and inhibitory connections in the superficial layers of the neocortex.

2.2 Modulation der synaptischen Transmission im Subikulum

Das Subikulum ist die Hauptausgangsstruktur der hippocampalen Formation. Sie liegt zwischen der Area CA1 und dem entorhinalen Kortex und prozessiert hippocampale Informationen, bevor diese in kortikale und subkortikale Areale weitergeleitet werden (O'Mara et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass das Subikulum bei neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen pathologische Veränderungen aufweist (Cohen et al., 2002; Rosoklija et al., 2000; Wozny et al., 2003). Noch ist nicht abschließend geklärt, ob diese pathognomonisch sind. Ihr Auftreten könnte allerdings die besondere Rolle dieser Hirnregion in Erkrankungen wie der Temporallappenepilepsie (Wozny et al., 2005) oder der Schizophrenie (Rosoklija et al., 2000) unterstreichen.

Die Regulation der synaptischen Transmission spielt eine bedeutende Rolle in der neuronalen Signalverarbeitung. Metabotrope GABA-, Glutamat- sowie Neuropeptidrezeptoren regulieren die synaptische Transmission im Sinne einer negativen Rückkopplung. Die pharmakologische Aktivierung dieser Rezeptoren stellt daher eine Behandlungsoption für Erkrankungen dar, die mit einer erhöhten neuronalen Erregbarkeit einhergehen (Rogawski and Loscher, 2004).

Die Familie der metabotropen Glutamatrezeptoren umfasst derzeit acht verschiedene Subtypen (mGluR 1-8), die wiederum in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden können (mGluR I-III). Im Allgemeinen scheinen die Gruppen II und III die exzitatorische Signalübertragung negativ zu modulieren (Schoepp, 2001).

In der vorliegenden Studie haben wir die Rolle der metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe II untersucht. Diese regulieren die synaptische Übertragung durch Hemmung der präsynaptischen Adenylatcyclase-Aktivität. Die Applikation eines Gruppe-II-mGluR-Agonisten (2S, 1'R, 2'R, 3'R)-2-(2, 3-dicarboxycyclopropyl)glycin (DCG-IV) führte zu einer signifikanten Reduktion der exzitatorischen postsynaptischen Ströme in einer der zwei bestehenden Gruppen subikulärer Pyramidalzellen, den sogenannten Bursterzellen (Staff et al., 2000). Werden die Pyramidalzellen depolarisiert, so antwortet eine Neuronenpopulation zu Beginn der Strominjektion mit multiplen Aktionspotentialen, einem sogenannten Burst, während die Zellen, die mit lediglich einem AP antwortet, als regulär-feuernd bezeichnet werden.

Interessanterweise werden synaptische Eingänge auf regulär-feuernde subikuläre Pyramidalzellen hingegen nur gering moduliert.

Des Weiteren wurde mittels verschiedener Stimulationsprotokolle getestet, ob synaptisch freigesetztes Glutamat zur Aktivierung von präsynaptischen mGluRs führt. Zusammenfassend müssen wir konstatieren, dass es pharmakologische Hinweise auf präsynaptisch lokalisierte metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe II gibt, die aber sowohl durch Nieder-, wie Hochfrequenz-Stimulationsprotokolle nicht aktivieren werden konnten.

Abstract

Kintscher M, Breustedt J, Miceli S, Schmitz D & **Wozny C**. Group II metabotropic glutamate receptors depress synaptic transmission onto subicular bursting neurons. *PLoS One* 2012; 7: e45039; Epub 2012 Sept 11.

The subiculum (SUB) is a pivotal structure positioned between the hippocampus proper and various cortical and subcortical areas. Despite the growing body of anatomical and intrinsic electrophysiological data of subicular neurons modulation of synaptic transmission in the SUB is not well understood. In the present study we investigated the role of group II metabotropic glutamate receptors (mGluRs), which have been shown to be involved in the regulation of synaptic transmission by suppressing presynaptic cAMP activity. Using field potential and patch-clamp whole cell recordings we demonstrate that glutamatergic transmission at CA1-SUB synapses is depressed by group II mGluRs in a cell-type specific manner. Application of the group II mGluR agonist (2S,1'R,2'R,3'R)-2-(2, 3-dicarboxycyclopropyl)glycine (DCG-IV) led to a significantly higher reduction of excitatory postsynaptic currents in subicular bursting cells than in regular firing cells. We further used low-frequency stimulation protocols and brief high-frequency bursts to test whether synaptically released glutamate is capable of activating presynaptic mGluRs. However, neither frequency facilitation is enhanced in the presence of the group II mGluR antagonist LY341495, nor a test stimulus given after a high-frequency burst. In summary, we present pharmacological evidence for presynaptic group II mGluRs targeting subicular bursting cells, but both low- and high-frequency stimulation protocols failed to activate presynaptically located mGluRs.

2.3 Präsynaptische Plastizität

Langanhaltende Veränderungen der synaptischen Übertragungsstärke können durch Veränderungen auf der prä- wie der postsynaptischen Seite vermittelt werden. Präsynaptische Formen der Langzeitplastizität sind an der hippocampalen Moosfaser-Synapse (Nicoll and Schmitz, 2005; Zalutsky and Nicoll, 1990), an der Parallelfasersynapse des Kleinhirns (Salin et al., 1996), sowie an kortikalen Afferenzen im Thalamus (Castro-Alamancos and Calcagnotto, 1999) und in der Amygdala (Humeau et al., 2003) beschrieben worden.

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist der wohl bekannteste ‚Second Messenger‘. In pharmakologischen wie genetischen Studien konnte gezeigt werden, dass verschiedenste Hormone und Neurotransmitter die intrazelluläre Konzentration von cAMP modulieren können (Nguyen and Woo, 2003). Die G-Protein-aktivierte Adenylcyclase (AC) konvertiert Adenosintriphosphat (ATP) zu cAMP. In hippocampalen Schnittpräparaten führt die Aktivierung der AC durch die Substanz Forskolin (FSK) zu einer vermehrten Transmitterfreisetzung (Chavez-Noriega and Stevens, 1992; Salin et al., 1996). Ebenfalls belegt ist die Rolle der kalzium-abhängigen AC1 und AC8 in hippocampalen Gedächtnistests (Wong et al., 1999; Wu et al., 1995).

An der hippocampalen Moosfasersynapse, der Parallelfasersynapse des Kleinhirns, sowie an kortikalen Afferenzen im Thalamus führt ein hochfrequenter Reiz führt über eine Aktivierung der AC und der Proteinkinase A (PKA) schließlich zu einer langanhaltenden erhöhten Transmitterausschüttung.

Auch an der CA1-subikulären (SUB) Synapse konnte eine präsynaptische Form der Langzeitpotenzierung (LTP) gefunden werden (Wozny et al., 2008b), deren Signalkaskade zu Beginn unsere Untersuchungen noch unbekannt war. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die LTP in subikulären Pyramidalzellen des burstenden Typs im Gegensatz zu regulär-feuernden Zellen abhängig ist von einem Anstieg der präsynaptischen cAMP Konzentration, sowie der Aktivierung von PKA.

Abstract

Wozny C^{*}, Maier N^{*}, Fidzinski P, Breustedt J, Behr J^{*} & Schmitz D^{*}.
Differential cyclic AMP signaling at hippocampal output synapses. *J Neurosci* 2008, 28: 14358-62. (* equal contribution)

cAMP is a critical second messenger involved in synaptic transmission and synaptic plasticity. Here, we show that activation of the adenylyl cyclase by forskolin and application of the cAMP-analog Sp-5,6-DCI-cBIMPS both mimicked and occluded tetanus induced long-term potentiation (LTP) in subicular bursting neurons, but not in subicular regular firing cells. Furthermore, LTP in bursting cells was inhibited by protein kinase A (PKA) inhibitors Rp-8-CPT-cAMP and H-89. Variations in the degree of EPSC blockade by the low-affinity competitive AMPA receptor-antagonist γ -D-glutamyl-glycine (γ -DGG), analysis of the coefficient of variance as well as changes in short-term potentiation suggest an increase of glutamate concentration in the synaptic cleft after expression of LTP. We conclude that presynaptic LTP in bursting cells requires activation of PKA by a calcium-dependent adenylyl cyclase while LTP in regular firing cells is independent of elevated cAMP levels. Our results provide evidence for a differential role of cAMP in LTP at hippocampal output synapses.

2.4 Postsynaptische Plastizität

Wie bereits dargelegt, können langanhaltende Veränderungen der synaptischen Übertragungsstärke durch Veränderungen auf der prä- wie auf der postsynaptischen Seite vermittelt werden. In Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippokampus findet man nach repetitiver Stimulation der Afferenzen eine postsynaptisch induzierte und postsynaptisch exprimierte Form der LTP; die Induktion der LTP ist abhängig von postsynaptisch lokalisierten N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren und die Expression der LTP ist charakterisiert durch einen Anstieg der AMPA Rezeptoren in der postsynaptischen Membran.

Sogenannte Gerüstproteine („scaffolding proteins“) verankern AMPA Rezeptoren in der postsynaptischen Membran. Zu diesen Gerüstproteinen gehört auch das Protein 4.1. Es sind bislang vier verschiedene Isoformen des Protein 4.1 beschrieben worden: B, G, N und R. Es konnte gezeigt, dass die Proteine 4.1G und 4.1N an AMPA Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR4 binden und so die Oberflächenexpression der AMPA Rezeptor-Untereinheiten maßgeblich regulieren können (Coleman et al., 2003; Shen et al., 2000). Aus diesem Grund sind wir (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Brose, MPI, Göttingen) der Frage nachgegangen, ob eine Deletion der 4.1 Proteine G und N die synaptische Transmission und die synaptische Plastizität beeinträchtigt. In Doppel-Knock-Out Tieren haben wir die basale Neurotransmission und die Langzeitpotenzierung in der Area CA1 des Hippokampus untersucht. In Western-Blot Analysen (durchgeführt von der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Brose, MPI, Göttingen) konnte eine moderate Reduktion der Expression der synaptischen AMPA-Rezeptoren festgestellt werden, die allerdings nicht zu einem elektrophysiologischen Phänotyp führte.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, dass die beiden Proteine 4.1G und 4.1N für die Funktion der glutamatergen Synapse entbehrlich zu sein scheinen.

Wozny C*, Breustedt J*, Wolke F*, Varoqueaux F, Boretius S, Frahm J, Schmitz D, Brose N & Ivanovic A. The function of glutamatergic synapses is not perturbed by severe knock-down of 4.1 G and N expression. *Journal of Cell Science* 2009, 122: 735-44. (* *equal contribution*)

Abstract

AMPA-type glutamate receptors mediate fast excitatory synaptic transmission in the vertebrate brain. Their surface expression at synapses between neurons is regulated in an activity-dependent and activity-independent manner. The protein machinery that regulates synaptic targeting, anchoring and turnover of AMPA receptors consists of several types of specialized scaffolding proteins. The FERM domain scaffolding proteins 4.1G and 4.1N were previously suggested to act jointly in binding and regulating synaptic trafficking of the AMPA receptor subunits GluR1 and GluR4. To determine the functions of 4.1G and 4.1N *in vivo*, we generated a mutant mouse line that lacks 4.1G entirely and expresses 4.1N at 22% of wild-type levels. These mice had combined 4.1G and 4.1N protein expression in the hippocampus at 12% of wild-type levels (equivalent to 8-10% of combined GluR1 and GluR4 expression levels). They show a moderate reduction in synaptosomal expression levels of the AMPA receptor subunit GluR1 at 3 weeks of age, but no change in basic glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in the hippocampus. Our study indicates that 4.1G and 4.1N do not have a crucial role in glutamatergic synaptic transmission and the induction and maintenance of long-term plastic changes in synaptic efficacy.

2.5 Homöostatische Plastizität

Wie bereits in der Einleitung erwähnt besteht die Familie der AMPA-Rezeptoren aus vier verschiedenen Untereinheiten (GluA1-A4; früher GluR-1-4, bzw. GluRA-D). Es ist bekannt, dass AMPA-Rezeptoruntereinheiten sowohl Homomere sowie auch Heteromere bilden können. Die Struktur-Funktionszusammenhänge sind ausführlich an rekombinanten AMPA-Rezeptoren untersucht worden (Hollmann and Heinemann, 1994). Posttranskriptionelle Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen oder Palmitolylierungen, der Transkripte für AMPA-Rezeptoruntereinheiten können zu veränderten biophysikalischen Eigenschaften, zu veränderten Schaltkinetiken der AMPA-Rezeptoren führen (Lu and Roche, 2012). Neben den genannten reversiblen Proteinmodifikationen kann die Anzahl der Isoformen eines Proteins, der AMPA-Rezeptoruntereinheiten, durch ‚alternatives Spleißen‘ (engl. ‚alternative splicing‘) erhöht werden. Aus einer DNA-Sequenz können mehrere unterschiedliche mRNA-Moleküle und durch deren Translation schließlich verschiedene Peptide, bzw. Proteine gebildet werden. Die Gene der vier AMPA-Rezeptoruntereinheiten enthalten unterschiedliche Exonsequenzen die entsprechend alternativ gespleißt werden können. Die daraus resultierenden Untereinheiten werden als Flip- bzw. Flop-Form der Untereinheit bezeichnet (Sommer et al., 1990).

Das Flip/Flop-Modul beeinflusst ebenfalls die biophysikalischen Eigenschaften der AMPA-Rezeptoren. Flopvarianten zeichnen sich durch schnellere kinetische Eigenschaften als die entsprechenden Flipvarianten aus. Demnach kann durch alternatives Spleißen der AMPA-Rezeptor-Transkripte die Kinetik der postsynaptischen Leitfähigkeitsänderung reguliert werden (Mosbacher et al., 1994).

In der folgenden Studie haben wir hippokampale organotypische Schnittkulturen verwendet, um zu klären, ob alternatives Spleißen aktivitätsabhängig reguliert werden kann. In Schnittkulturen kann durch Zugabe von verschiedenen Substanzen auf eine sehr einfache, aber elegante Art und Weise die neuronale Aktivität dauerhaft erhöht (z.B. durch die Blockade der Inhibition) oder erniedrigt werden (z.B. durch die Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle) (Turrigiano, 1999). Wir konnten zeigen, dass alternatives Spleißen in der Tat aktivitätsabhängig reguliert wird und die kinetischen Eigenschaften synaptischer und

extrasynaptischer AMPA-Rezeptor vermittelter Antworten nach
zweitägiger pharmakologischer Blockade spannungsabhängiger
Natriumkanäle durch Tetrodotoxin nachhaltig verändert sind.

Penn AC^{*}, Balik A^{*}, **Wozny C^{*}**, Cais O, Nemonda Z & Greger IH. Activity-driven homeostatic regulation in hippocampus via AMPA receptor-mediated short-term plasticity. *Neuron* 2012 (* equal contribution).

Abstract

The AMPA-type glutamate receptor (AMPA) subunit composition shapes synaptic transmission at excitatory synapses. Here, we show that chronic activity deprivation gives rise to synaptic AMPAR responses with enhanced fidelity. Extrasynaptic AMPARs exhibited changes in kinetics and pharmacology associated with splicing of the alternative flip/flop exons. AMPAR mRNA exhibited reprogramming of the flip/flop exons for GluA1 and GluA2 subunits in response to activity, selectively in the CA1 subfield. However, the functional changes did not directly correlate with the mRNA expression profiles but result from altered assembly of GluA1/2 subunit splice variants, uncovering an additional regulatory role for flip/flop splicing in excitatory signaling. Our results suggest that activity-dependent AMPAR remodeling underlies changes in short-term synaptic plasticity and provides mechanism for neuronal homeostasis.

3 Diskussion

Im Zentralnervensystem findet man eine Vielzahl unterschiedlicher exzitatorischer und inhibitorischer Nervenzellen, die miteinander auf synaptische, elektrische und parakrine Weise kommunizieren. Elektrophysiologische Untersuchungen zu neuronalen Mikroschaltkreisen von inhibitorischen Interneuronen und exzitatorischen Pyramidalzellen (Wozny and Williams, 2011) sowie zur synaptischen Transmission und synaptischen und homöostatischen Plastizität (Kintscher et al., 2012; Penn et al., 2012; Wozny et al., 2008a; Wozny et al., 2009) liefern wichtige Erkenntnisse zur neuronalen Informationsverarbeitung im Neokortex und Hippokampus. Die unterschiedlichen Aspekte der vorliegenden Arbeit werden im Folgenden separat diskutiert.

Neokortex

Der Neokortex besteht aus sechs Schichten (sogenannte ‚Layers‘). Die Schicht 1 (‚Layer 1‘ – L1) des Neokortex ist eine relative zellarme Schicht, in der sich keine exzitatorische Pyramidalzellen befinden. In der frühen Entwicklung sind Cajal-Retzius Zellen der vorherrschende Neuronentyp. Sie migrieren tangential zur kortikalen Oberfläche und spielen für den Aufbau des Neokortex eine bedeutende Rolle (Soriano and Del Rio, 2005). Wie viele unterschiedliche Gruppen von inhibitorischen Interneuronen gibt es in Schicht 1 des somatosensorischen Kortex der Ratte? In Hirnschnittpräparaten von jungen Ratten (postnataler Tag 7 – 24, P7–24) wurden bislang lediglich zwei Gruppen von inhibitorischen Interneuronen unterschieden (Chu et al., 2003; Hestrin and Armstrong, 1996; Zhou and Hablitz, 1996). Die elektrophysiologischen Eigenschaften von Pyramidalzellen und Interneuronen verändern sich über im Laufe der postnatalen Entwicklung (Atkinson and Williams, 2009; Doischer et al., 2008), ebenso wie die synaptische Übertragungseigenschaften und die Kurzzeitplastizität (Angulo et al., 1999; Reyes and Sakmann, 1999).

Unsere Analyse ergab, dass es in jung adulten Ratten (P24 – P36) vier verschiedene Gruppen von Neuronen in L1 gibt. Schicht 2/3 (L2/3) Pyramidenzellen erregen L1 Interneurone in einer zielzellspezifischen Weise. Überraschenderweise erhalten neurogliaforme Zellen (NGFCs) keine kolumnaren Afferenzen von L2/3 Pyramidenzellen. Im Gegensatz dazu inhibieren NGFCs L2/3 Pyramidenzellen durch eine kombinierte GABA_A- und GABA_B-vermittelte Antwort (Tamas et al., 2003). Sogenannte ‚classical-

accommodating' L1 Interneurone werden durch L2/3 Pyramidalzellen erregt, hemmen diese allerdings auch in reziproker Weise. Die Kurzzeitplastizität der glutamatergen Transmission auf verschiedene Interneurone ist ebenso abhängig von der entsprechenden postsynaptischen Zielzelle (Angulo et al., 1999; Reyes and Sakmann, 1999). In der anästhesierten Maus scheinen L1 Interneurone durch cholinerge Fasern während eines Fußschocks aktiviert zu werden. Dies führt zu einer Inhibition der Interneurone in L2/3 und damit auch zu einer Disinhibition und erhöhten neuronalen Aktivität der L2/3 Pyramidalzellen (Letzkus et al., 2011). In einer weiteren Studie wurde der Einfluss einer kontralateralen Hinterfußstimulation auf die Entladungsfrequenz von Schicht 5 Pyramidalzellen untersucht. Interessanterweise scheint diese kontralaterale Stimulation eine GABA_B-vermittelte Form der superfiziellen Inhibition zu aktivieren, die die Aktionspotenzialgenerierung in Schicht 5 Pyramidalzellen blockieren kann (Palmer et al., 2012). Um welche Klasse von superfiziellen Interneurone es sich in den beiden genannten Studien handelt, werden zukünftige Untersuchungen zeigen müssen.

Subikulum

Auch in der hippocampalen Formation sind zielzellspezifische Prozesse beschrieben worden. So führt zum Beispiel die Aktivierung von präsynaptisch lokalisierten metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe III zu einer Verringerung der Transmitterausschüttung auf CA1 Interneurone, nicht aber auf CA1 Pyramidenzellen (Scanziani et al., 1998). In der Regel werden Pyramidenzellen in den verschiedenen Arealen des Hippokampus (Areae CA1 und CA3) als eine homogene Gruppe angesehen. Im Subikulum, der Ausgangsstruktur der hippocampalen Formation, können Pyramidalzellen hingegen in zwei Gruppen eingeteilt werden: burstende und regulär-feuernde Projektionszellen (Staff et al., 2000). Werden die beiden Zelltypen depolarisiert, so antwortet eine burstende Zelle mit mehreren kurz aufeinanderfolgenden Aktionspotentialen (APs) zu Beginn der Strominjektion, während die Zelle, die mit lediglich einem AP antwortet, als regulär-feuernd bezeichnet wird. Interessanterweise konnten wir zeigen, dass die synaptischen Eingänge auf burstende, nicht aber auf regulär-feuernde Pyramidalzellen durch präsynaptisch lokalisierte metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe II moduliert werden können

(Kintscher et al., 2012). Allerdings kann auch die intrinsische Exzitabilität dieser beiden Zelltypen durch hochfrequente synaptische Reizung („theta-burst stimulation – TBS“) beeinflusst werden. So führt die postsynaptische Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren der Untergruppe mGluR1 und von metabotropen Acetylcholinrezeptoren zu einem Anstieg des Burst-Index (Moore et al., 2009). Wird eine burstende Pyramidalzelle repetitiv depolarisiert, so antwortet sie mit einem Burst auf die ersten Strominjektionen, auf nachfolgende allerdings nur mit einem einzelnen AP. Nach der hochfrequenten Stimulation feuert das Neuron nun auch Bursts von APs auf Stimuli, die zuvor ein einzelnes APs ausgelöst hatten. Dadurch steigt der Burst-Index. Diese Form der intrinsischen Plastizität beruht in den zwei verschiedenen Pyramidalzellen des Subikulums auf unterschiedlichen Induktionsmechanismen (Graves et al., 2012; Moore et al., 2009).

Auch die synaptischen Eingänge werden nach hochfrequenter (tetanischer) Stimulation zielzellspezifisch potenziert (Wozny et al., 2008b). Die Expression der Langzeitpotenzierung („long-term potentiation“ – kurz „LTP“) wird durch den Anstieg der präsynaptischen Kalziumkonzentration induzierte Aktivierung der Adenylylcyclase (AC) vermittelt. Die AC wiederum stimuliert die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und die Aktivierung der Proteinkinase A. Diese Aktivierung führt schlussendlich zu einer langanhaltenden Erhöhung der Transmitterfreisetzung. Frühere Arbeiten postulierten einen Zusammenhang zwischen dem präsynaptisch lokalisierten Protein Rim1 α , einem Protein der aktiven Zone, und einer erhöhten Freisetzungswahrscheinlichkeit nach LTP Induktion an der hippokampalen Moosfasersynapse, sowie an der Parallelfasersynapse der Purkinje-Zellen des Kleinhirns feststellen (Castillo et al., 2002; Lonart et al., 2003). In einer bislang nicht publizierten Studie konnten wir keinen Zusammenhang zwischen Rim1 α und einer präsynaptisch exprimierten LTP in subikulären Bursterzellen feststellen.

Area CA1 des Hippokampus

Synaptische Langzeitplastizität ist in der Area CA1 des Hippokampus detailliert untersucht und charakterisiert worden. Aufgrund der laminaren Struktur des Hippokampus sind die synaptischen Verschaltungen in Hirnschnittpräparaten gut erhalten. Mit Hilfe extra- und intrazellulärer

elektrophysiologischer Ableitetechniken kann die Langzeitpotenzierung in der Area CA1 studiert werden. Einigkeit besteht darüber, dass die Expression der LTP gekennzeichnet ist durch die Zunahme von AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran (Kerchner and Nicoll, 2008). Der genaue Expressionsmechanismus ist hingegen Gegenstand aktueller Forschung (Granger et al., 2013). Verschiedenste Proteine, wie die sogenannten ‚transmembranösen AMPA-Rezeptor-regulatorischen Proteine (kurz ‚TARPs‘), die ATPase N-ethylmaleimide-sensitiver Faktor (kurz ‚NSF‘), die membran-assoziierten Guanylatkinasen (kurz ‚MAGUKs‘), interagieren mit AMPA-Rezeptoren und beeinflussen deren Oberflächenexpression (Nicoll et al., 2006).

Die beiden Isoformen des Proteins 4.1, 4.1G und 4.1N interagieren mit dem C-Terminus der GluA1-Untereinheit und sind ebenfalls an der Rekrutierung von AMPA-Rezeptoren beteiligt (Coleman et al., 2003; Shen et al., 2000). In Doppel-KO Tieren (4.1G/N DKO) zeigte sich allerdings trotz einer biochemisch nachweisbaren moderaten Reduktion der AMPA-Rezeptor Expression kein elektrophysiologisch nachweisbarer Phänotyp.

In einer nachfolgenden, bislang unveröffentlichten Studie konnten wir in einer Triple-Deletionsmutante eine deutliche Reduktion der synaptischen AMPA-Rezeptoren sowie eine verminderte LTP beobachtet werden. Zusammenfassend lassen die Daten der DKO- sowie der TKO-Studie vermuten, dass die verschiedenen Isoformen des Proteins 4.1 eine Redundanz aufweisen, die, wie in der DKO-Studie gezeigt, kompensiert werden kann.

Synaptische sowie intrinsische Plastizität sind integraler Bestandteil der Mechanismen zur Kontrolle neuronaler Homöostase (Turrigiano, 2008). Synaptische homöostatische Plastizität ist nicht nur gekennzeichnet durch eine Insertion bzw. eine Elimination von AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran, sondern auch durch eine Umverteilung der Rezeptoruntereinheiten des AMPA-Rezeptors (Penn et al., 2012). Wir konnten zeigen, dass es nach Blockade neuronaler Aktivität zu einer Modifikation von AMPA-Rezeptoren durch alternatives Spleißen kommt. In der Area CA1 verringert sich nach 48-stündiger TTX-Gabe die Expression der AMPA-Rezeptor Untereinheiten A1i und A2i, während sich die Expression von A1o und A2o erhöht. Dies führt zu einem unterschiedlichen

Aufbau der AMPA-Rezeptor Heteromere, welcher einhergeht mit veränderten biophysikalischen Eigenschaften des Rezeptors. Nach repetitiver Stimulation (mittels schneller Glutamatapplikation oder synaptischer Aktivierung) zeigt sich nach chronischer Netzwerkinaktivierung eine gesteigerte AMPA-Rezeptor Antwort im Verlauf der Stimulation im Vergleich zu Kontrollmessungen. Diese Form der Kurzplastizität ist gekennzeichnet durch eine deutlich erhöhte Wiedergabegenauigkeit und eine verringerte Abnahme des Doppelpuls-Indices (,increased response fidelity').

Diese Ergebnisse beschreiben einen gänzlich neuen Mechanismus zur Steigerung der synaptische Transmission nach chronischer Inaktivierung. Nicht nur durch eine reine Zunahme postsynaptischer AMPA-Rezeptoren, sondern auch durch einen veränderten Aufbau der AMPA-Rezeptor Heteromere kann die CA1 Pyramidenzelle die synaptische Übertragung regulieren und kontrollieren.

4 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit umfasst Untersuchungen zur neuronalen Konnektivität und zur synaptischen Übertragung im Hippokampus und im Neokortex. In den oberflächlichen Schichten des Neokortex kommunizieren Interneurone und Pyramidalzellen in einer zielzellspezifischen Weise miteinander. Die genaue Rolle der Schicht 1 Interneurone ist weiterhin Gegenstand heutiger Forschung. Nachfolgende Studien werden neben den kolumnaren Afferenzen auch die kortikokortikalen und subkortikalen Eingänge der Schicht 1 Interneurone untersuchen müssen. Insbesondere neurogliaforme Zellen scheinen im Sinne einer negativen Rückkopplung Informationen aus anderen kortikalen Arealen zu erhalten.

Das Subikulum prozessiert hippokampale Information und leitet diese in verschiedene kortikale und subkortikale Areale. Zwei Typen von Projektionsneurons sind in diesem Kontext in gänzlich verschiedene Mikroschaltkreise eingebunden. Die synaptischen Eingänge aus der Area CA1 werden zielzell-spezifisch von metabotropen Glutamatrezeptoren reguliert. Nach hochfrequenter Stimulation der CA1 Afferenzen zeigen sich in beiden Pyramidalzellen ebenfalls unterschiedliche Formen synaptischer Plastizität, die nahelegen, dass hippokampale Information auf unterschiedliche Art und Weise prozessiert und in unterschiedliche Hirnregionen weitergeleitet wird.

In der Area CA1 des Hippokampus wurde die Rolle verschiedener Isoformen des Proteins 4.1 untersucht. Die Ergebnisse bestätigen frühere Studien, dass das Protein 4.1 mit AMPA-Rezeptoren interagiert und diese rekrutiert. Allerdings weisen die verschiedenen Isoformen eine gewisse Redundanz auf und eine verminderte Expression einer Isoform scheint durch eine andere kompensiert werden zu können.

Ein neuer Mechanismus konnte im Rahmen der homöostatischen Plastizität beschrieben werden. Es wurde gezeigt, dass ein veränderter Aufbau der AMPA-Rezeptor Heteromere in CA1 Pyramidenzellen nach langanhaltender chronischer Netzwerkinaktivierung die synaptische Übertragung und die daraus resultierende Kurzzeitplastizität maßgeblich beeinflussen kann.

5 Literatur

- Abbott LF, Regehr WG (2004) Synaptic computation. *Nature* 431:796-803.
- Angulo MC, Staiger JF, Rossier J, Audinat E (1999) Developmental synaptic changes increase the range of integrative capabilities of an identified excitatory neocortical connection. *J Neurosci* 19:1566-1576.
- Ascoli GA, et al. (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9:557-568.
- Atkinson SE, Williams SR (2009) Postnatal development of dendritic synaptic integration in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 102:735-751.
- Bartos M, Elgueta C (2012) Functional characteristics of parvalbumin- and cholecystokinin-expressing basket cells. *J Physiol* 590:669-681.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Castillo PE, Schoch S, Schmitz F, Sudhof TC, Malenka RC (2002) RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation. *Nature* 415:327-330.
- Castro-Alamancos MA, Calcagnotto ME (1999) Presynaptic long-term potentiation in corticothalamic synapses. *J Neurosci* 19:9090-9097.
- Chavez-Noriega LE, Stevens CF (1992) Modulation of synaptic efficacy in field CA1 of the rat hippocampus by forskolin. *Brain Res* 574:85-92.
- Chu Z, Galarreta M, Hestrin S (2003) Synaptic interactions of late-spiking neocortical neurons in layer 1. *J Neurosci* 23:96-102.
- Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R (2002) On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* 298:1418-1421.
- Coleman SK, Cai C, Mottershead DG, Haapalahti JP, Keinänen K (2003) Surface expression of GluR-D AMPA receptor is dependent on an interaction between its C-terminal domain and a 4.1 protein. *J Neurosci* 23:798-806.
- Doischer D, Hosp JA, Yanagawa Y, Obata K, Jonas P, Vida I, Bartos M (2008) Postnatal differentiation of basket cells from slow to fast signaling devices. *J Neurosci* 28:12956-12968.
- Douglas RJ, Martin KA (2004) Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci* 27:419-451.
- Granger AJ, Shi Y, Lu W, Cerpas M, Nicoll RA (2013) LTP requires a reserve pool of glutamate receptors independent of subunit type. *Nature* 493:495-500.

- Graves AR, Moore SJ, Bloss EB, Mensh BD, Kath WL, Spruston N (2012) Hippocampal pyramidal neurons comprise two distinct cell types that are countermodulated by metabotropic receptors. *Neuron* 76:776-789.
- Helmstaedter M, de Kock CP, Feldmeyer D, Bruno RM, Sakmann B (2007) Reconstruction of an average cortical column in silico. *Brain Res Rev* 55:193-203.
- Hestrin S, Armstrong WE (1996) Morphology and physiology of cortical neurons in layer I. *J Neurosci* 16:5290-5300.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Hubel DH, Wiesel TN (1998) Early exploration of the visual cortex. *Neuron* 20:401-412.
- Humeau Y, Shaban H, Bissiere S, Luthi A (2003) Presynaptic induction of heterosynaptic associative plasticity in the mammalian brain. *Nature* 426:841-845.
- Kerchner GA, Nicoll RA (2008) Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat Rev Neurosci* 9:813-825.
- Kintscher M, Breustedt J, Miceli S, Schmitz D, Wozny C (2012) Group II metabotropic glutamate receptors depress synaptic transmission onto subicular burst firing neurons. *PLoS One* 7:e45039.
- Klausberger T, Somogyi P (2008) Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321:53-57.
- Letzkus JJ, Wolff SB, Meyer EM, Tovote P, Courtin J, Herry C, Luthi A (2011) A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. *Nature* 480:331-335.
- Lonart G, Schoch S, Kaeser PS, Larkin CJ, Sudhof TC, Linden DJ (2003) Phosphorylation of RIM1alpha by PKA triggers presynaptic long-term potentiation at cerebellar parallel fiber synapses. *Cell* 115:49-60.
- Lu W, Roche KW (2012) Posttranslational regulation of AMPA receptor trafficking and function. *Curr Opin Neurobiol* 22:470-479.
- Lubke J, Feldmeyer D (2007) Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex. *Brain Struct Funct* 212:3-17.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793-807.
- Moore SJ, Cooper DC, Spruston N (2009) Plasticity of burst firing induced by synergistic activation of metabotropic glutamate and acetylcholine receptors. *Neuron* 61:287-300.

Mosbacher J, Schoepfer R, Monyer H, Burnashev N, Seeburg PH, Ruppertsberg JP (1994) A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science* 266:1059-1062.

Mountcastle VB (1957) Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol* 20:408-434.

Mountcastle VB (1997) The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 (Pt 4):701-722.

Nguyen PV, Woo NH (2003) Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog Neurobiol* 71:401-437.

Nicoll RA, Schmitz D (2005) Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci* 6:863-876.

Nicoll RA, Tomita S, Brecht DS (2006) Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors. *Science* 311:1253-1256.

O'Mara SM, Commins S, Anderson M, Gigg J (2001) The subiculum: a review of form, physiology and function. *Prog Neurobiol* 64:129-155.

Palmer LM, Schulz JM, Murphy SC, Ledergerber D, Murayama M, Larkum ME (2012) The cellular basis of GABA(B)-mediated interhemispheric inhibition. *Science* 335:989-993.

Penn AC, Balik A, Wozny C, Cais O, Greger IH (2012) Activity-mediated AMPA receptor remodeling, driven by alternative splicing in the ligand-binding domain. *Neuron* 76:503-510.

Reyes A, Sakmann B (1999) Developmental switch in the short-term modification of unitary EPSPs evoked in layer 2/3 and layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex. *J Neurosci* 19:3827-3835.

Rogawski MA, Loscher W (2004) The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci* 5:553-564.

Rosoklija G, Toomayan G, Ellis SP, Keilp J, Mann JJ, Latov N, Hays AP, Dwork AJ (2000) Structural abnormalities of subicular dendrites in subjects with schizophrenia and mood disorders: preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry* 57:349-356.

Salin PA, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron* 16:797-803.

Scanziani M, Gahwiler BH, Chazotte S (1998) Target cell-specific modulation of transmitter release at terminals from a single axon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12004-12009.

- Schoepp DD (2001) Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 299:12-20.
- Shen L, Liang F, Walensky LD, Huganir RL (2000) Regulation of AMPA receptor GluR1 subunit surface expression by a 4. 1N-linked actin cytoskeletal association. *J Neurosci* 20:7932-7940.
- Sommer B, Keinänen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Kohler M, Takagi T, Sakmann B, Seeburg PH (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 249:1580-1585.
- Soriano E, Del Rio JA (2005) The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron* 46:389-394.
- Spruston N (2008) Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci* 9:206-221.
- Staff NP, Jung HY, Thiagarajan T, Yao M, Spruston N (2000) Resting and active properties of pyramidal neurons in subiculum and CA1 of rat hippocampus. *J Neurophysiol* 84:2398-2408.
- Tamas G, Lorincz A, Simon A, Szabadics J (2003) Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science* 299:1902-1905.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62:405-496.
- Turrigiano GG (1999) Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci* 22:221-227.
- Turrigiano GG (2008) The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* 135:422-435.
- Wong ST, Athos J, Figueroa XA, Pineda VV, Schaefer ML, Chavkin CC, Muglia LJ, Storm DR (1999) Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron* 23:787-798.
- Wozny C, Breustedt J, Wolk F, Varoqueaux F, Boretius S, Zivkovic AR, Neeb A, Frahm J, Schmitz D, Brose N, Ivanovic A (2009) The function of glutamatergic synapses is not perturbed by severe knockdown of 4.1N and 4.1G expression. *J Cell Sci* 122:735-744.
- Wozny C, Kivi A, Lehmann TN, Dehnicke C, Heinemann U, Behr J (2003) Comment on "On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro". *Science* 301:463.

Wozny C, Knopp A, Lehmann TN, Heinemann U, Behr J (2005) The subiculum: a potential site of ictogenesis in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 46 Suppl 5:17-21.

Wozny C, Maier N, Fidzinski P, Breustedt J, Behr J, Schmitz D (2008a) Differential cAMP signaling at hippocampal output synapses. *J Neurosci* 28:14358-14362.

Wozny C, Maier N, Schmitz D, Behr J (2008b) Two different forms of long-term potentiation at CA1-subiculum synapses. *J Physiol* 586:2725-2734.

Wozny C, Williams SR (2011) Specificity of synaptic connectivity between layer 1 inhibitory interneurons and layer 2/3 pyramidal neurons in the rat neocortex. *Cereb Cortex* 21:1818-1826.

Wu ZL, Thomas SA, Villacres EC, Xia Z, Simmons ML, Chavkin C, Palmiter RD, Storm DR (1995) Altered behavior and long-term potentiation in type I adenylyl cyclase mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:220-224.

Zalutsky RA, Nicoll RA (1990) Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science* 248:1619-1624.

Zhou FM, Hablitz JJ (1996) Layer I neurons of rat neocortex. I. Action potential and repetitive firing properties. *J Neurophysiol* 76:651-667.

6 Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dietmar Schmitz danken für seine stete Unterstützung und die Möglichkeit die vorliegende Arbeit zu schreiben und fertigzustellen.

Des Weiteren möchte ich den Herrn Prof. Stephen R. Williams und Dr. Ingo H. Greger danken, sowie den Mitglieder der Labore im Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum (NWFZ) an der Charité, sowie dem Laboratory of Molecular Biology – MRC LMB in Cambridge, GB.

Herrn Prof. Joachim Behr und Herrn Prof. Uwe Heinemann, die mich über die Jahre wissenschaftlich begleitet haben, möchte ich ebenfalls danken.

'Last but not least' danke ich meiner Familie: 'Thank you so much'.

7 Eidesstattliche Erklärung

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 18.06.2013

Christian Wozny