

Aus dem  
Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum der Charité  
Direktor: Professor Dr. med. D. Schmitz

## **Habilitationsschrift**

# **Zelluläre und molekulare Aspekte der synaptischen Transmission und Plastizität der hippocampalen Moosfasersynapse**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach  
Physiologie

vorgelegt vor dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Jörg Breustedt

geboren am 15. September 1969 in Giessen

Eingereicht: 24.08.2009

Dekanin: Prof. Dr. A. Grüters-Kieslich  
1. Gutachter: Prof. Dr. J. Rettig/ Homburg, Saar  
2. Gutachter: Prof. Dr. C. Alzheimer/Erlangen

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	3
1.1. Mechanistische und funktionelle Aspekte der synaptischen Kurzzeitplastizität.....	4
1.2. Zelluläre und molekulare Merkmale der synaptischen Langzeitplastizität.....	6
1.3. Anatomische und physiologische Charakteristika der Moosfasersynapse.....	8
2. Ergebnisse.....	12
2.1. Extrinsische Kontrolle der Moosfaser-Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit durch tonische Hemmung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen.....	12
2.2. Differentielle intrinsische Regulation der Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit durch Munc13-2.....	29
2.3. Die Rolle von präsynaptischen Kainatrezeptoren in der Plastizität von Moosfasersynapsen.....	43
2.4. Die Bedeutung spannungsabhängiger Kalziumkanäle bei der Induktion von Moosfaser-Langzeitplastizität.....	51
2.5. Eine präsynaptische Form der Assoziativität an Moosfasersynapsen vermittelt durch Kainatrezeptoren.....	59
2.6. Die Rolle von Protein 4.1 in Transmission und Plastizität an Schaffer-Kollateral Synapsen.....	67
3. Diskussion.....	79
4. Zusammenfassung.....	88
5. Literaturverzeichnis.....	90
6. Danksagung.....	98
7. Eidesstattliche Erklärung.....	99

## Abkürzungsverzeichnis

AC	Assoziational-Kommissural
AMPA	AMPA Rezeptor
KAR	Kainat Rezeptor
LTP	Long-term potentiation
MF	Moosfaser
NMDAR	NMDA Rezeptor
VDCC	Voltage dependent calcium channel (spannungsabhängiger Kalziumkanal)
Pr	Release probability (Freisetzungswahrscheinlichkeit)
SC	Schaffer-Kollateral
STP	Short-term plasticity
TARP	Transmembrane AMPA regulatory protein

# 1. Einleitung

Synapsen sind die zentralen Kontaktstellen zwischen Nervenzellen, an denen ein Großteil der interneuronalen Kommunikation stattfindet. Seit den ersten Hinweisen auf diese spezielle Zone zwischen erregbaren Zellen durch die Experimente von Claude Bernard (Bernard, 1883; Fessard, 1967) und die darauf folgenden physiologischen (Sherrington, 1906) und morphologischen (Ramon y Cajal, 1899) Demonstrationen dieser bedeutsamen Struktur haben Synapsen im Laufe der Zeit mehr und mehr wissenschaftliches Interesse auf sich gezogen. Das liegt zum einen an der sich immer klarer darstellenden enormen Plastizität der Synapsen, die die Grundlage für viele Entwicklungs- und Lernprozesse des Nervensystems bildet. Zum anderen kristallisieren sich immer weitere neuronale pathophysiologische Prozesse als Störungen der synaptischen Kommunikation heraus, so dass sich bereits der Begriff der Synaptopathien herausgebildet hat. In diesem Zusammenhang sei darauf verwiesen, dass eine Reihe von neuronalen Erkrankungen wie etwa der Morbus Alzheimer (Selkoe, 2002) oder die Chorea Huntington (Li *et al.*, 2003) sich als synaptische Dysfunktion manifestieren können, lange bevor es zu morphologisch nachweisbaren Veränderungen wie Ablagerungen von Plaques oder Zelluntergang kommt. Mit diesen Hinweisen soll auch die Bedeutsamkeit des Studiums der Synapsenphysiologie und -plastizität und die Relevanz der Aufklärung der zugrunde liegenden Signalkaskaden und molekularen Komponenten der Synapsen unterstrichen werden. Im folgenden sollen einige wichtige Aspekte der Plastizität und Dynamik von Synapsen eingeführt werden, da diese Phänomene den durchgängigen Bezugspunkt der vorgelegten Arbeiten bilden.

In funktioneller als auch molekular-mechanistischer Hinsicht ist es zweckdienlich Formen der Kurzzeit- und Langzeitplastizität von Synapsen voneinander zu unterscheiden. Auf der zeitlichen Ebene spielt sich die synaptische Kurzzeitplastizität (in Anlehnung an den internationalen Sprachgebrauch wird im folgenden die Abkürzung STP für short-term plasticity verwendet) im Bereich von Millisekunden bis wenigen Minuten ab, wohingegen die Langzeitplastizität (LTP für long-term potentiation) einen Zeitraum von Stunden bis Tagen umfasst.

## ***1.1. Mechanistische und funktionelle Aspekte der synaptischen Kurzzeitplastizität***

Die Kurzzeitplastizität beschreibt die dynamische und reversible Veränderung der synaptischen Übertragungsstärke, die sich bidirektional ausprägen kann. Eine Zunahme der synaptischen Übertragung wird als Fazilitierung bezeichnet (mit den Spezifizierungen Augmentierung und posttetanische Potenzierung je nach zeitlicher Dauer), eine Abnahme hingegen als Depression. Auf zellulärer Ebene ist bei der STP bedeutsam, dass die entscheidenden molekularen Prozesse sich überwiegend auf der präsynaptischen Seite abspielen. Eine wichtige Ausnahme bildet hierbei die postsynaptische Rezeptordesensibilisierung, die zu einer Kurzzeitdepression führen kann (Zucker & Regehr, 2002).

Mechanistisch bedeutsam für die Fazilitierung ist die Hypothese des sogenannten „residualen Kalziums“ (Katz & Miledi, 1968), die besagt, dass die Erhöhung der Kalziumkonzentration nach einem ersten in die Terminale einlaufenden Aktionspotential noch nicht wieder auf das basale Niveau zurückgekehrt ist, während bereits ein zweites Aktionspotential eintrifft, das zu erneutem Kalziuminflux führt. Zwischen der Transmitterfreisetzung und der Kalziumkonzentration in der präsynaptischen Terminale besteht ein ausgeprägter nichtlinearer Zusammenhang (Dodge, Jr. & Rahamimoff, 1967; Schneggenburger & Neher, 2000). Diese Beziehung kann gut über eine Funktion der Art: postsynaptische Antwort =  $[Ca^{2+}]^n$ , mit  $n = 2-4$  beschrieben werden. In Abschnitt 2.1 der vorliegenden Arbeit wird ebenfalls ein derartiger Zusammenhang für die Moosfasersynapse gezeigt. Aus diesem Grunde kann bereits eine geringe Erhöhung der terminalen Kalziumkonzentration zu einer starken Zunahme der Transmission und somit der postsynaptischen Antwort führen.

Ein weiterer Mechanismus der Kurzzeitplastizität besteht in der Aktivierung von Autorezeptoren. Hierbei handelt es sich zumeist um metabotrope Rezeptoren, deren Aktivierung nach einer ersten Freisetzung des jeweiligen Transmitters zu einer Auto-Inhibition beziehungsweise -Depression der weiteren Freisetzung führt. Eine besondere Ausnahme bilden in diesem Zusammenhang präsynaptische ionotrope Kainatrezeptoren wie sie an den Moosfaserterminalen gefunden werden. Diese können in Abhängigkeit von der extrazellulären Kainatkonzentration die Transmission auf biphasisch Weise beeinflussen. Geringe Konzentrationen führen dabei zu einer Fazilitierung, während höhere Konzentrationen zu einer Depression der Transmission führen (Schmitz *et al.*, 2001b) (siehe Abschnitt 2.3 der vorliegenden Arbeit). Der Vollständigkeit halber sei angeführt, dass weitere

Phänomene für die Kurzzeit-Fazilitierung verantwortlich sein können, wie beispielsweise hochaffine Kalzium-Bindungsstellen an Proteinen für die Vesikelfreisetzung oder Proteinkinasen (Zucker & Regehr, 2002).

Eine zentrale Größe für die synaptische Transmission und die Kurzzeitplastizität ist die Freisetzungswahrscheinlichkeit für die transmitterhaltigen Vesikel ( $P_r$  für release probability). Dabei lässt sich bezüglich der Dynamik feststellen, dass Synapsen mit einer hohen  $P_r$  zu einer Kurzzeitdepression tendieren und eine niedrige  $P_r$  eher zu einer fazilitierenden Antwort führt. Die Freisetzungswahrscheinlichkeit ist dabei keine statische Größe einer Synapse sondern kann über die Zeit moduliert werden und ist zudem von ausgeprägter Heterogenität von Synapse zu Synapse. So können präsynaptische Terminale, die ein und derselben Ursprungszelle entstammen, unterschiedliche Freisetzungswahrscheinlichkeiten aufweisen. Eine grosse Zahl von Faktoren bestimmen diese Freisetzungswahrscheinlichkeit an einer synaptischen Verbindung (Atwood & Karunanithi, 2002; Xu-Friedman & Regehr, 2004). Dazu gehören die Anzahl der aktiven Zonen pro Synapse, die Größe des Pools freisetzbarer Vesikel, die Typen der spannungsabhängigen Kalziumkanäle in der präsynaptischen Terminale, die räumliche Beziehung zwischen diesen Kalziumkanälen und den Vesikeln und die Proteine, die für das Priming und die Freisetzung der Vesikel verantwortlich sind. Ein Beispiel für letztere Einflussgröße ist das Protein Munc13-2, das in Abschnitt 2.2 untersucht wurde. Neben diesen als intrinsisch zu bezeichnenden Faktoren kann die Freisetzungswahrscheinlichkeit auch durch extrinsische Modulatoren beeinflusst werden. Die Rolle der metabotropen Autorezeptoren ist in diesem Zusammenhang bereits erwähnt worden. Zusätzlich sind die meisten Synapsen mit verschiedenen Heterorezeptoren ausgestattet, wodurch eine Vielzahl neuromodulatorischer Einflüsse auf präsynaptischer Seite integriert werden kann. In Abschnitt 2.1 wird beispielsweise demonstriert, über welchen Mechanismus der Neuromodulator Adenosin an der Moosfasersynapse die synaptische Transmission beeinflusst. Hier trägt eine tonische Aktivierung von Adenosinrezeptoren zu einer niedrigen Freisetzungswahrscheinlichkeit bei, was wiederum entscheidend für die besonderen dynamischen Eigenschaften der Synapse ist (siehe unten bezüglich der Charakteristika der Moosfasersynapse).

Welche funktionelle Relevanz hat nun die Kurzzeitdynamik in Hinsicht auf die Informationsübertragung an den Synapsen? In Analogie zur Nachrichtentechnik können Synapsen gut als Frequenz-Filter beschrieben werden (Abbott & Regehr, 2004; Thomson, 2003). Synapsen mit niedriger initialer Freisetzungswahrscheinlichkeit zeigen meist eine Kurzzeitfazilitierung und fungieren somit als Hochpaß-Filter, das heißt hochfrequente Signale

in Form von Aktionspotentialserien werden auf die postsynaptische Zelle durchgeschaltet (als Beispiele wären hier zu nennen die Moosfasersynapse oder die Parallelfaser des Zerebellums). Umgekehrt kann die Funktion eines Tiefpaß-Filters, der nur niederfrequente Signale durchlässt, durch Synapsen mit hoher Pr, die meist eine Kurzzeitdepression aufweisen, realisiert werden. Synapsen mit intermediärer Freisetzungswahrscheinlichkeit wie beispielsweise die in dieser Arbeit ebenfalls untersuchten hippocampalen Schaffer-Kollateralen weisen hingegen die Eigenschaften eines Bandpaß-Filters auf. Diese unterschiedlichen Filtereigenschaften machen daher auch deutlich, dass ein Aktionspotentialmuster einer Zelle die nachgeschalteten postsynaptischen Zellen in Abhängigkeit der jeweiligen Synapse auf ganz unterschiedliche Weise beeinflussen kann. Die zeitlich dynamischen Eigenschaften der Synapsen bewirken zudem eine Abhängigkeit von der jüngeren Aktivierungsgeschichte einer Verbindung. Die ausschliessliche Beschreibung des Aktionspotentialmusters von Nervenzellen zur Charakterisierung eines neuronalen Netzwerkes ist daher nicht ausreichend, sondern muss um die Analyse des dynamischen Zustandes der jeweiligen Synapsen ergänzt werden.

## ***1.2. Zelluläre und molekulare Merkmale der synaptischen Langzeitplastizität***

Die Langzeitplastizität von Synapsen beschreibt die aktivitätsabhängige Veränderung der Übertragungsstärke zwischen Nervenzellen über einen Zeitraum von Stunden bis Tagen. Dabei kann man wiederum zwischen einer Abnahme, Langzeit-Depression (LTD), und einer Zunahme, Langzeitpotenzierung (LTP), unterscheiden. Die Langzeitplastizität von Synapsen spielt eine bedeutsame Rolle im Rahmen der ontogenetischen Entwicklung, als auch bei pathophysiologischen Prozessen, sowie beim Lernen und der Gedächtnisbildung (Malenka & Bear, 2004). Letzterer Zusammenhang ist Gegenstand intensiver Untersuchungen, der allerdings auch immer wieder grundsätzlich angezweifelt worden ist: Sind synaptische Plastizität und Lernen/Gedächtnis überhaupt ursächlich miteinander verknüpft? Bezüglich dieser Frage haben Martin & Morris einen Katalog von Kriterien entwickelt, die erfüllt sein müssten, wenn die sogenannte Plastizitäts-Gedächtnis Hypothese korrekt wäre (Martin *et al.*, 2000). Mehrere dieser Kriterien haben in den letzten Jahren einen experimentellen Nachweis erfahren und somit ist die besagte Hypothese zumindest bislang nicht falsifiziert worden. Beispielhaft sei hier das Entdeckbarkeits-Kriterium („detectability“) angeführt: Wenn ein Tier etwas Neues gelernt hat, sollte sich eine Veränderung der synaptischen Übertragungsstärke in einer Hirnregion finden lassen, die für das entsprechende Verhalten relevant ist. Das

besondere Problem besteht hierbei darin, unter der ausgesprochen großen Anzahl von synaptischen Verbindungen genau diejenigen ausfindig zu machen, die potenziert worden sind. Mit Hilfe von Multi-Elektroden Arrays ist Whitlock et al. genau dies in der CA 1 Region des Hippokampus gelungen. Ratten erlernten im Zuge eines „inhibitory avoidance tasks“ ein neues Verhalten und zugleich konnte elektrophysiologisch eine Potenzierung von CA1 Synapsen demonstriert werden. Darüber hinaus war die Potenzierung an eben diesen Synapsen weitestgehend saturiert, da zusätzliche elektrische Stimulation zu keiner weiteren Potenzierung führte (Whitlock *et al.*, 2006). Die Erwähnung dieser Befunde soll dazu dienen die Sinnhaftigkeit des Studiums der Langzeitplastizität und der Langzeitpotenzierung im besonderen zu verdeutlichen.

Auf zellulärer und molekularer Ebene ist die Langzeitpotenzierung besonders intensiv untersucht worden (Bliss & Collingridge, 1993; Malenka & Nicoll, 1999; Malenka & Bear, 2004). Zellulär weist die LTP folgende Charakteristika auf: i) Input-Spezifität, d.h. nur die aktivierten Eingänge (Synapsen) werden auch potenziert, ii) Kooperativität, d.h. eine gewisse Anzahl von Eingängen/Fasern muss aktiviert werden, damit die Induktionsschwelle überschritten wird und iii) Assoziativität, d.h. schwache Eingänge können potenziert werden wenn ihre Aktivierung mit der eines zweiten Satzes von unabhängigen synaptischen Eingängen kombiniert wird. Insbesondere das Auffinden der letzteren Eigenschaft war von großem Interesse, da es als ein zelluläres Korrelat für das psychologische Phänomen der Assoziation von Gedanken/Ideen gesehen wurde. Bereits einer der Begründer der Assoziationspsychologie, David Hartley (1705-1757), hatte den Versuch unternommen eine neuronale Grundlage dieser wichtigen psychologischen Funktion zu finden (Hartley, 1749; Allen, 1999).

Auf molekularer Ebene kann zwischen NMDA-Rezeptor (NMDAR) abhängigen und unabhängigen Formen der LTP unterschieden werden. Bei den NMDAR-abhängigen Formen, wie sie an der Mehrzahl der Synapsen des ZNS wie z.B. der hippocampalen Schaffer-Kollateral-Synapse zu finden ist, hat derzeit folgendes Modell die breiteste experimentelle Unterstützung: Zunächst kommt es zu einem postsynaptischen Kalziuminflux, wodurch eine Signalkaskade aktiviert wird, an deren Ende ein vermehrter Einbau von ionotropen AMPA-Rezeptoren (AMPA) erfolgt, welcher die gesteigerte postsynaptische Antwort vermittelt. Die gleichzeitige Spannungs- und Transmitter-Abhängigkeit der NMDAR Aktivierung vermittelt dabei eine Koinzidenzdetektion bzw. Assoziation post- und präsynaptischer Aktivität. Die molekularen Mechanismen des AMPAR Einbaus in die postsynaptische Membran sind derzeit Gegenstand vieler Untersuchungen, in deren Rahmen eine Reihe von



Hilfsproteinen aufgefunden wurden, die diese Aufgabe bewerkstelligen und zudem noch wichtige biophysikalische Merkmale der AMPAR beeinflussen (Nicoll *et al.*, 2006). In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit ein potentiell bedeutsamer neuer Kandidat für den AMPAR Membrantransport untersucht (Protein 4.1 siehe Abschnitt 2.6).

Ein anderer Mechanismus der Langzeitpotenzierung liegt hingegen an Synapsen vor, bei denen die Transmissionsteigerung auf der präsynaptischen Seite vermittelt wird. Für diese Form der LTP darf die Moosfasersynapse klassischerweise als prototypisch gelten, sie findet sich aber daneben auch an Parallelfaser-Synapsen des Kleinhirns (Salin *et al.*, 1996a), Thalamo-Kortikalen Synapsen, sowie an der neuromuskulären Endplatte (Wojtowicz & Atwood, 1986). Bei dieser Variante ist für die Induktion ebenfalls zunächst ein erhöhter Kalziuminflux notwendig, hier nun allerdings auf der präsynaptischen Seite. Über die Vermittlung durch eine Adenylatzyklase-abhängige Signalkaskade kommt es schließlich zu einer gesteigerten präsynaptischen Transmitterausschüttung über eine erhöhte Freisetzungswahrscheinlichkeit der Vesikel. Diese klassische Form der Moosfaser-LTP ist NMDAR unabhängig. Eine wichtige Frage, die sich aufgrund dieses speziellen Induktionsmechanismus stellt ist: Gibt es an der Moosfasersynapse Assoziativität, obgleich der molekulare Hauptkandidat hierfür- der NMDAR- nicht notwendig ist? Auf diesen Aspekt wird in Abschnitt 2.5 der vorliegenden Arbeit eingegangen.

In den NMDAR abhängigen LTP-Formen konnte eben dieser Rezeptor als Hauptquelle für den notwendigen Kalziuminflux (postsynaptisch) identifiziert werden. Bei der Moosfasersynapse hingegen war die Bedeutung eines Anstiegs der Kalziumkonzentration auf der präsynaptischen Seite zwar als entscheidend erkannt worden ((Mellor & Nicoll, 2001) aber siehe auch (Yeckel *et al.*, 1999)), allerdings war die Quelle hierfür noch unbekannt. Einen Schritt hin zu einer Identifikation einer solchen Quelle konnte in Abschnitt 2.4 der vorliegenden Arbeit erbracht werden, wo die Bedeutung eines speziellen Subtyps spannungsabhängiger Kalziumkanäle (R-Typ) herausgearbeitet werden konnte.

### ***1.3. Anatomische und physiologische Charakteristika der Moosfasersynapse***

Zum besseren Verständnis der vorliegenden Arbeit sei auf einige anatomische als auch physiologische Besonderheiten der hippokampalen Moosfasersynapse vorab eingegangen (Henze *et al.*, 2000; Urban *et al.*, 2001; Nicoll & Schmitz, 2005). Die Moosfasern werden durch die Axone der Körnerzellen des Gyrus dentatus gebildet und stellen eine glutamaterge synaptische Verbindung zu vier unterschiedlichen Zielzellen her: i) zu CA3 Pyramidenzellen,

ii) zu Interneuronen, iii) zu Mossy cells im Hilus und iv) zu einigen wenigen Körnerzellen im Gyrus dentatus. Im Fokus dieser Arbeit liegt die erstere Verbindung (i), die im weiteren als Moosfasersynapse verstanden wird. Die Moosfasern enden im stratum lucidum (die nichtmyelinisierten Axone erscheinen lichtmikroskopisch eher transparent), wo sie synaptische Verbindungen mit den proximalen apikalen Dendriten der CA3 Pyramidenzellen herstellen. Die präsynaptischen Terminalen, die Boutons, zeichnen sich durch eine außergewöhnliche Größe aus, sie messen 5-10  $\mu\text{m}$  im Durchmesser. Die wesentlich häufiger vorkommenden en passant boutons (zu finden an Schaffer-Kollateralen, Assoziational-Kommissural Synapsen) sind mit 1-2  $\mu\text{m}$  deutlich kleiner. Die parallele Anordnung der Moosfasern und die Größe ihrer Terminalen macht diese Struktur besonders gut zugänglich für die extrazelluläre Beladung mit ionensensitiven Farbstoffen, eine Technik, die auch in dieser Arbeit mehrfach zum Einsatz kommt. In funktioneller Hinsicht ist weiterhin bedeutsam, dass ein einzelnes Moosfaserbouton eine große Anzahl unabhängiger Freisetzungszonen (release sites) besitzt: 3-80, im Mittel 35. Auch dies steht im Kontrast zu den en passant boutons, die meist nur eine einzige Freisetzungszone besitzen. Diese vielen unabhängigen Freisetzungszonen erklären auch die große Varianz der Antworten der postsynaptischen Amplituden auch bei Einzelfaserstimulation. Hinsichtlich der Transmissions-Dynamik der Moosfasersynapsen ist anzumerken, dass sie eine geringe initiale Freisetzungswahrscheinlichkeit besitzen, woraus wiederum eine starke Kurzzeitfazilitierung resultiert. Der Fazilitierungs-Index ist bei Doppelpulsstimulation recht hoch ( $>2.5$ ). Darüber hinaus zeigen diese Synapsen ein Phänomen, das mit „Frequenzfazilitierung“ bezeichnet wird: ausgehend von einer niedrigen basalen Stimulationsrate (0.05 Hz) wird bei Erhöhung dieser Rate auf beispielsweise 1 Hz für 20 Pulse die postsynaptische Antwort auf 500 - 800 % deutlich gesteigert. Diese Steigerung ist vollkommen reversibel bei Rückkehr zur basalen Stimulationsrate. Diese Frequenzfazilitierung macht man sich auch zur Identifikation von reinen Moosfaser-Antworten in Schnittpräparaten zu Nutze (siehe unten). Eine weitere anatomisch wichtige Tatsache besteht in der geringen Konnektivität (sparse connectivity) zwischen Körnerzellen und CA3 Pyramidenzellen: Eine einzelne Körnerzelle besitzt über ihre Moosfaser nur mit 15 CA3 Pyramidenzellen eine synaptische Verbindung. Aufgrund der Tatsache, dass es knapp fünf mal mehr Körner- als CA3 Pyramidenzellen gibt erhält eine CA3 Pyramidenzelle gleichzeitig Kontakt von ungefähr 70 Körnerzellen. Ein derartiges Verbindungsmuster ist einzigartig im ZNS und funktionell als ideale Voraussetzung für eine Musterseparation durch die Körnerzellen angesehen (Marr, 1971; Rolls & Kesner, 2006) und auch experimentell nachgewiesen worden (McHugh *et al.*, 2007; Leutgeb *et al.*, 2007).

Demgegenüber leistet die CA3 Region selbst eine Musterkomplettierung aufgrund ihrer hohen inneren Konnektivität durch AC-Synapsen (Nakazawa *et al.*, 2002).

In Bezug auf die Langzeitdynamik ist oben bereits erwähnt worden, dass Moosfasern klassischerweise eine präsynaptisch exprimierte Form der LTP aufweisen, deren Induktion NMDAR unabhängig ist (Harris & Cotman, 1986; Zalutsky & Nicoll, 1990; Katsuki *et al.*, 1991; Weisskopf & Nicoll, 1995). Jüngste Arbeiten mit niederschwelligeren Induktionsprotokollen konnten allerdings auch NMDAR abhängigen Formen an dieser Verbindung nachweisen, deren Expression dann allerdings auch auf der postsynaptischen Seite stattfindet (Kwon & Castillo, 2008a). In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die klassische präsynaptische Variante der LTP studiert, um verschiedenste molekulare und zelluläre Vorgänge auf der präsynaptischen Seite aufzuklären.

Das physiologische Studium reiner, isolierter Moosfasereingänge auf postsynaptische CA3 Pyramidenzellen in hippokampalen Schnittpräparaten wird, neben der zuvor erwähnten geringen Konnektivität, durch die Tatsache erschwert, dass die CA3 Pyramidenzellen noch weitere exzitatorische Eingänge erhalten: Zum einen über den perforant path aus dem entorhinalen Kortex und zum anderen über assoziationale-kommissurale Fasern von ipsi- als auch kontralateral gelegenen weiteren CA3 Pyramidenzellen (eine CA3 Pyramidenzelle erhält annähernd 12 000 Eingänge über AC-Synapsen und 4000 über den perforant path, gegenüber den nur ungefähr 70 Kontakten durch Körnerzellen). Daher müssen zur selektiven Stimulation von Moosfasern die extrazellulären Reizelektroden besonders sorgfältig platziert werden, um eine Kontamination mit anderen synaptischen Eingängen zu vermeiden. Zu Beginn eines Experiments wurde daher jeweils das Vorhandensein einer ausreichenden Frequenzfazitierung geprüft, die in unseren Studien mindestens 400 % betragen musste (siehe oben). Des Weiteren können reine Moosfaserantworten durch die Applikation eines Gruppe II metabotropen Glutamatrezeptoragonisten isoliert werden (Kamiya *et al.*, 1996). Die entsprechenden Rezeptoren befinden sich exklusiv an den präsynaptischen Moosfaserterminalen und ihre Aktivierung führt zu einer Unterdrückung der synaptischen Transmission. Dahingegen sind AC-Synapsen nicht sensitiv auf geringe Konzentrationen dieses Agonisten. In all unseren Experimenten forderten wir eine vollständige Unterdrückung der Transmission durch den mGluR Agonisten, damit ein Experiment an der Moosfasersynapse in die Auswertung einbezogen werden konnte. Dieser pharmakologische Nachweis erfolgte am Ende eines jeden Experiments.

Im Rahmen die hier vorgelegten Untersuchungen sollte zu folgenden Fragenkomplexen ein Beitrag geleistet werden:

1. Über welchen zellulären Mechanismus erfolgt die Modulation der Moosfasertransmission durch Adenosin?
2. Hat das Protein Munc13-2 einen Einfluss auf die Freisetzungswahrscheinlichkeit und Plastizität hippocampaler Synapsen?
3. Welche Rolle spielen präsynaptische Kainatrezeptoren in der Moosfasertransmission und welche Kainatrezeptor-Untereinheit ist dabei von Bedeutung?
4. Über welche Quelle erfolgt der präsynaptische Kalziumeinfluss bei der Induktion der Moosfaser-LTP?
5. Existiert eine Assoziativität der LTP an Moosfasersynapsen?
6. Spielen Proteine der 4.1 Familie eine Rolle bei der LTP an Schaffer-Kollateral Synapsen?

## 2. Ergebnisse

### ***2.1. Extrinsische Kontrolle der Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung an der Moosfasersynapse durch tonische Hemmung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen***

A. Gundlfinger, J. Bischofberger, F.W. Jochenning, M. Torvinen, D. Schmitz\* and **J. Breustedt\***. Adenosine modulates transmission via direct inhibition of presynaptic calcium channels. *Journal of Physiology*; 2007, 582: 263-277.

\*equal contribution

Ein besonderes Charakteristikum der hippokampalen Moosfasersynapse ist der große dynamische Bereich der synaptischen Übertragungsstärke. Zu den Voraussetzungen einer solchen Dynamik gehört eine niedrige Freisetzungswahrscheinlichkeit für die transmitterhaltigen Vesikel. Vorhergehende Studien hatten zeigen können, dass eine tonische Aktivierung von präsynaptischen Adenosinrezeptoren an den Moosfaserterminalen für die Kontrolle der Freisetzungswahrscheinlichkeit essentiell ist (Moore *et al.*, 2003). Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Aufklärung der intrazellulären Signalkaskade, über die die Aktivierung von Adenosinrezeptoren zu einer Kontrolle und Modulation der Transmitterfreisetzung an der Moosfasersynapse führt.

In einem ersten Schritt wurde die Präsynapse als Wirkort der adenosinvermittelten Modulation ermittelt. Durch den Einsatz pharmakologischer Werkzeuge konnte im weiteren der Adenosinrezeptor Subtyp A1 als verantwortlich eingegrenzt werden.

Mittels zweier unterschiedlicher Techniken konnte dann gezeigt werden, dass Adenosin die Transmitterfreisetzung durch eine Modulation von spannungsabhängigen Kalziumkanälen bewerkstelligt. Zum einen ergaben mikrofluorometrische Messungen des Kalziuminflux in präsynaptische Moosfaserterminalen eine deutliche Reduktion der Kalziumtransienten durch Adenosin. Zum anderen zeigte die direkte elektrophysiologische Ableitung von individuellen Moosfaser-Boutons, dass Adenosin die Amplitude der gemessenen Kalziumströme in ähnlicher Größenordnung wie bei den Fluoreszenzmessungen reduziert. Zudem konnte durch die geänderte Kalziumstromkinetik in Anwesenheit von Adenosin, als auch durch die Spannungsabhängigkeit dieses Adenosineffekts auf einen G-Protein vermittelten Prozess geschlossen werden. Schließlich konnte durch weitere mikrofluorometrische

Kalziummessungen demonstriert werden, dass zwei Subtypen von Kalziumkanälen, P/Q- und N-, durch Adenosin moduliert werden.

## **Adenosine modulates transmission at the hippocampal mossy fibre synapse via direct inhibition of presynaptic calcium channels.**

Gundlfinger A, Bischofberger J, Jochenning FW, Torvinen M, Schmitz D\*, Breustedt J\*.

Neurowissenschaftliches Forschungszentrum der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Germany.

### **Abstract**

The modulation of synaptic transmission by presynaptic ionotropic and metabotropic receptors is an important means to control and dynamically adjust synaptic strength. Even though synaptic transmission and plasticity at the hippocampal mossy fibre synapse are tightly controlled by presynaptic receptors, little is known about the downstream signalling mechanisms and targets of the different receptor systems. In the present study, we identified the cellular signalling cascade by which adenosine modulates mossy fibre synaptic transmission. By means of electrophysiological and optical recording techniques, we found that adenosine activates presynaptic A1 receptors and reduces Ca<sup>2+</sup> influx into mossy fibre terminals. Ca<sup>2+</sup> currents are directly modulated via a membrane-delimited pathway and the reduction of presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx can explain the inhibition of synaptic transmission. Specifically, we found that adenosine modulates both P/Q- and N-type presynaptic voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels and thereby controls transmitter release at the mossy fibre synapse.

\*authors contributed equally

## ***2.2. Differentielle intrinsische Regulation der Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit durch Munc13-2***

**J. Breustedt**, A. Gundlfinger, F. Varoqueaux, K. Reim, N. Brose and D. Schmitz. Munc13-2 differentially affects hippocampal synaptic transmission and plasticity. *Cerebral Cortex*; 2009, doi:10.1093/cercor/bhp170.

Die Freisetzungswahrscheinlichkeit für transmitterhaltige Vesikel ist eine fundamentale Größe für die Beschreibung der synaptischen Übertragungsstärke. Diese Wahrscheinlichkeit kann je nach Synapsentyp variieren, und sogar Terminalen, die demselben Axon entspringen und dieselbe Zielzelle besitzen, können unterschiedliche Freisetzungswahrscheinlichkeiten aufweisen. Vielfältige Faktoren bestimmen die Freisetzungswahrscheinlichkeit an einer aktiven Zone. Hierzu zählen unter anderem die Anzahl der freisetzungsbereiten Vesikel, die Zahl der spannungsabhängigen Kalziumkanäle, die räumliche Beziehung zwischen Kalziumkanälen und Vesikeln, und nicht zuletzt die spezifischen Proteine, die den Freisetzungsapparat aufbauen. Zu letzterer Gruppe gehören die Proteine der Munc13 Familie. Munc13 Proteine sind für den Priming Prozeß von großer Bedeutung, bei dem Vesikel in den freisetzungsbereiten Zustand überführt werden. Besondere Aufmerksamkeit erregten diese Proteine aufgrund der Befunde, daß in Abhängigkeit des jeweiligen Munc13 Paralogs der Phänotyp der Kurzzeitdynamik einer Synapse bestimmt wird. Eine Munc13-2 betriebene Synapse zeigt einen fazilitierenden Phänotyp, wohingegen Synapsen mit Munc13-1 als alleinverantwortlichem Priming-Faktor eine Kurzzeitdepression aufweisen (Rosenmund *et al.*, 2002).

Aufgrund der besonders stark ausgeprägten fazilitatorischen Eigenschaften der Moosfasersynapse, stellten wir uns die Frage welche besondere Rolle Munc13-2 dabei spielen könnte und ob gar diese Charakteristika zu einem großen Teil von Munc13-2 abhängen. Zur Untersuchung dieser Frage machten wir uns eine Munc13-2 Deletionsmutante zu Nutze (Varoqueaux *et al.*, 2002). Diese weisen gegenüber Munc13-1 defizienten Tieren den Vorteil auf, dass die Tiere nach der Geburt vital sind und somit für die Erstellung akuter Hirnschnittpräparate in voll ausdifferenziertem Zustand zur Verfügung stehen. Wir konnten feststellen, dass die Fazilitierung, entgegen der Erwartung, an der Moosfasersynapse nicht kleiner sondern vielmehr in Abwesenheit von Munc13-2 größer ist. Dies galt spezifisch für die Moosfaser, da andere getestete synaptische Verbindungen, wie Schaffer-Kollateral Synapsen, Assoziational-Kommissural Synapsen und inhibitorische Synapsen auf CA3



Pyramidenzellen keinerlei Veränderungen aufwiesen. Durch eine Reihe unterschiedlicher Experimente und Analysen konnte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis erbracht werden, dass das Fehlen von Munc13-2 an der Moosfaser zu einer deutlichen Reduktion der synaptischen Freisetzungswahrscheinlichkeit führte: In Feldpotentialableitungen war die synaptische Eingangs-Ausgangs Beziehung erniedrigt, Ganzzell patch-clamp Messungen zeigten eine erhöhte Rate von Transmissionsfehlern, die Sensitivität gegenüber dem niederaffinen kompetitiven AMPAR Antagonisten  $\gamma$ -DGG war erniedrigt, sowie die Analyse moosfaserspezifischer Miniatur-EPSCs (mittels Ersatz von Kalzium durch Strontium) ergab eine deutliche Reduktion der Frequenz dieser Ereignisse. Die Erhöhung der Kurzzeitdynamik kann als Folge der reduzierten Freisetzungswahrscheinlichkeit interpretiert werden, da an vielen Synapsen eine inverse Beziehung zwischen Kurzzeitdynamik (d.h. Fazilitierung oder Depression) und Freisetzungswahrscheinlichkeit besteht.

## **Munc13-2 differentially affects hippocampal synaptic transmission and plasticity.**

Breustedt J, Gundlfinger A, Varoqueaux F, Reim K, Brose N, Schmitz D.

Neurowissenschaftliches Forschungszentrum, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany.

### **Abstract**

The short-term dynamics of synaptic communication between neurons provides neural networks with specific frequency-filter characteristics for information transfer. The direction of short-term synaptic plasticity, that is, facilitation versus depression, is highly dependent on and inversely correlated to the basal release probability of a synapse. Amongst the processes implicated in shaping the release probability, proteins that regulate the docking and priming of synaptic vesicles at the active zone are of special importance. Here, we found that a member of the Munc13 protein family of priming proteins, namely Munc13-2, is essential for normal release probability at hippocampal mossy fiber synapses. Paired pulse and frequency facilitation were strongly increased, whereas mossy fiber long-term potentiation was unaffected in the absence of Munc13-2. In contrast, transmission at 3 other types of hippocampal synapses, Schaffer-collateral, associational-commissural, as well as inhibitory synapses onto CA3 pyramidal neurons was unaffected by the loss of Munc13-2.

### ***2.3. Die Rolle von präsynaptischen Kainatrezeptoren in der Plastizität von Moosfasersynapsen***

**J. Breustedt** and D. Schmitz. Assessing the role of GLU<sub>K5</sub> and GLU<sub>K6</sub> at hippocampal mossy fiber synapses. *The Journal of Neuroscience*; 2004, 24: 10093-10098.

Kainatrezeptoren bilden eine Untergruppe der ionotropen Glutamaterezeptoren. Ihre Funktionalität konnte erstmalig zunächst postsynaptisch an CA3 Pyramidenzellen nachgewiesen werden. In der Folge wurde dann durch eine Reihe von Arbeiten ebenfalls demonstriert, dass Kainatrezeptoren an hippocampalen Moosfaserterminalen als präsynaptische Autorezeptoren fungieren können (Kamiya & Ozawa, 1999; Schmitz *et al.*, 2001b; Contractor *et al.*, 2001). Interessanterweise vermittelt die Aktivierung der präsynaptischen Kainatrezeptoren durch den Agonisten einen biphasischen Effekt auf die synaptische Transmission. Geringe Konzentrationen (<100 nM) führen zu einer Fazilitierung der Übertragung, höhere Konzentrationen hingegen zu einer Depression.

Die Frage, welche der jeweiligen Untereinheiten den präsynaptischen Kainatrezeptor an der Moosfasersynapse bilden, ist nach wie vor Gegenstand intensiver Kontroversen und Untersuchungen. Die Untereinheitenkomposition der Kainatrezeptoren ist dabei auch deshalb von besonderer pathophysiologischer Bedeutung, da postuliert worden ist, daß GLU<sub>K5</sub> spezifische Antagonisten in der Lage sind, sowohl die Entstehung als auch die Persistenz epileptiformer Entladungen *in vitro* als auch *in vivo* zu unterbinden (Smolders *et al.*, 2002).

Die vorliegende Arbeit hatte sich die Aufgabe gestellt einen Beitrag zur Aufklärung der Identität der Kainatrezeptoruntereinheiten an den Moosfaserterminalen zu leisten. Zu diesem Zweck kamen sowohl pharmakologische Werkzeuge (LY 382884 als GLU<sub>K5</sub> spezifischer Antagonist) als auch zwei genetische Deletionsmutanten (GLU<sub>K5</sub> und GLU<sub>K6</sub> knock-out Mäuse) zum Einsatz. Mit diesem Arsenal konnte nachgewiesen werden, dass die GLU<sub>K6</sub> Untereinheit für die normale Funktion des präsynaptischen Kainatrezeptors entscheidend ist, und die GLU<sub>K5</sub> Untereinheit hingegen nicht: Sowohl die Kainat-vermittelte Fazilitierung der synaptischen Transmission, als auch verschiedene Parameter der synaptischen Kurzzeitplastizität (5 Pulse mit 25 Hz, Frequenzfazilitierung) waren in Schnittpräparaten von GLU<sub>K6</sub> Mäusen deutlich reduziert. Hingegen war in GLU<sub>K5</sub> Mäusen keinerlei Unterschied gegenüber den Kontrolltieren zu verzeichnen. Desgleichen war der GLU<sub>K5</sub> spezifische Antagonist ohne jeden Einfluß auf die basale synaptische Transmission oder die Kurzzeitdynamik. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass die pharmakologische

Blockade der  $GLU_{K5}$  Untereinheit weder bei starken noch bei schwachen Induktionsprotokollen einen Einfluß auf die Induktion der Moosfaser-LTP ausübt. Dieser Befund bestätigte zusätzlich zuvor erhobene Daten bezüglich der Moosfaser-LTP, die an Deletionsmutanten vorgenommen worden waren und ebenfalls die  $GLU_{K6}$  Untereinheit als verantwortlich für das Setzen der Induktionsschwelle identifiziert hatten (Contractor *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2001a).

Nomenklatorische Zusatzbemerkung: Gemäß der Empfehlung des International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification (NC-IUPHAR) (Collingridge *et al.*, 2009) entsprechen die im Artikel verwendeten Bezeichnungen für die Untereinheiten des Kainatrezeptors den aktualisierten Abkürzungen wie folgt:

Artikel:		NC-IUPHAR 2009	weitere Synonyma
$GLU_{K5}$	=	GluK1	GluR5
$GLU_{K6}$	=	GluK2	GluR6

## **Assessing the role of GLUK5 and GLUK6 at hippocampal mossy fiber synapses.**

Breustedt J, Schmitz D.

Neurowissenschaftliches Forschungszentrum, Charité Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany.

### **Abstract**

It has been suggested recently that presynaptic kainate receptors (KARs) are involved in short-term and long-term synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. Using genetic deletion and pharmacology, we here assess the role of GLU(K5) and GLU(K6) in synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. We found that the kainate-induced facilitation was completely abolished in the GLU(K6)<sup>-/-</sup> mice, whereas it was unaffected in the GLU(K5)<sup>-/-</sup>. Consistent with this finding, synaptic facilitation was reduced in the GLU(K6)<sup>-/-</sup> and was normal in the GLU(K5)<sup>-/-</sup>. In agreement with these results and ruling out any compensatory effects in the genetic deletion models, application of the GLU(K5)-specific antagonist LY382884 [(3S,4aR,6S,8aR)-6-(4-carboxyphenyl)methyl-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahydroisoquinoline-3-carboxylic acid] did not affect short-term and long-term synaptic plasticity at the hippocampal mossy fiber synapses. We therefore conclude that the facilitatory effects of kainate on mossy fiber synaptic transmission are mediated by GLU(K6)-containing KARs.

#### ***2.4. Die Bedeutung spannungsabhängiger Kalziumkanäle bei der Induktion von Moosfaser-Langzeitplastizität***

**J. Breustedt**, K.E. Vogt, R.J. Miller, R.A. Nicoll and D. Schmitz. Alpha1E-containing Ca<sup>2+</sup> channels are involved in synaptic plasticity. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A; 2003, *100*: 12450-12455.

Die Langzeitpotenzierung (LTP) der hippocampalen Moosfasersynapse zeichnet sich durch einige Besonderheiten aus, die sie gegenüber der Mehrzahl der anderen synaptischen Verbindungen im zentralen Nervensystem herausstellt. So ist diese LTP unabhängig von der Aktivierung von ionotropen NMDA-Typ Glutamatrezeptoren und die Expression der LTP erfolgt auf der präsynaptischen Seite über eine Erhöhung der Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit. Zu den Ausgangspunkten dieser Arbeit gehörte desweiteren der Befund, dass eine Erhöhung der Kalziumkonzentration in den präsynaptischen Moosfaserterminalen zur LTP-Induktion notwendig ist. Interessanterweise führte aber eine Blockade der zu diesem Zeitpunkt bekannten Hauptquellen für den Kalziumeinstrom in die präsynaptischen Terminalen, nämlich der spannungsabhängigen Kalziumkanäle vom L-, N- und P/Q-Typ, nicht zu einer Blockade der LTP-Auslösung. Somit stellte sich die Frage welche anderen Quellen den notwendigen Kalziumeinstrom bewerkstelligen könnten.

In dieser Studie konnten wir nun herausfinden, dass ein weiterer spannungsabhängiger Kalziumkanal, der so genannte R-Typ, zum Kalziuminflux an Moosfaserboutons beiträgt und zwar in einer Größenordnung von annähernd 30-40 %. Dieser Kalziuminflux führt allerdings nicht zur synaptischen Freisetzung von Vesikeln bei basaler Stimulation (d.h. bei niedrigen Stimulationsraten von bis zu 1 Hz), im Gegensatz zum Kalziuminflux über N- und P/Q-Typ Kanäle. Nichtsdestoweniger führte aber die Blockade des R-Typ Ionenkanals zu einer klaren Verschiebung der Induktionsschwelle der Moosfaser-LTP, wie wir durch Verwendung unterschiedlicher pharmakologischer Antagonisten (Nickel, SNX-482) zeigen konnten. Eine zusätzlich Bestätigung dieser Tatsache erhielten wir durch das Studium einer genetischen Deletionsmutante (α1E knock-out Mäuse, siehe auch die Anmerkungen zur Nomenklatur der spannungsabhängigen Kalziumkanäle unten) bei der die Expression des R-Typ Kalziumkanals deutlich reduziert ist. In diesem Fall war die LTP-Induktion ebenfalls erschwert. Der R-Typ Kalziumkanal stellte aber keine absolute Notwendigkeit für die LTP Induktion dar, stärkere Induktionsstimuli waren jeweils in der Lage LTP hervorzurufen. Des weiteren konnten wir feststellen, dass die Expression der LTP nicht von R-Typ Kalziumkanälen abhing. Die

Potenzierung führte also nicht zu einer funktionellen Reorganisation der Terminalen dahingehend, dass nach Induktion R-Typ Kanäle an der synaptischen Transmission an der Moosfaser beteiligt wären.

Zur Nomenklatur der spannungsabhängigen Kalziumkanäle:

Traditionell sind spannungsabhängige Kalziumkanäle nach pharmakologischen und biophysikalischen Gesichtspunkten benannt worden, so beispielsweise der **R**-Typ Kanal nach seiner **R**esistenz gegenüber zu einem bestimmten Zeitpunkt bekannten Antagonisten. Laut aktueller Nomenklatur gemäß IUPHAR (Catterall *et al.*, 2005) ergibt sich der Zusammenhang zwischen der Bezeichnung, dem vermittelten Stromtyp und dem zugrunde liegenden Gen wie folgt:

Bezeichnung (IUPHAR)	Strom	Gen ( $\alpha$ 1 Untereinheit)
Ca <sub>v</sub> 1.1-4	L-	$\alpha$ 1S;C;D;F
Ca <sub>v</sub> 2.1	P/Q-	$\alpha$ 1A
Ca <sub>v</sub> 2.2	N-	$\alpha$ 1B
<b>Ca<sub>v</sub> 2.3</b>	<b>R-</b>	<b><math>\alpha</math>1E</b>
Ca <sub>v</sub> 3.1-3	T-	$\alpha$ 1G;H;I

## **Alpha1E-containing Ca<sup>2+</sup> channels are involved in synaptic plasticity.**

Breustedt J, Vogt KE, Miller RJ, Nicoll RA, Schmitz D.

Neuroscience Research Center at the Charité, Humboldt-University, Schumannstrasse 20/21, 10117 Berlin, Germany.

### **Abstract**

Long-term potentiation (LTP) is the most prominent model for the molecular and cellular mechanisms of learning and memory. Two main forms of LTP have been distinguished. The N-methyl-D-aspartate-receptor-dependent forms of LTP have been studied most extensively, whereas much less is known about N-methyl-D-aspartate-receptor-independent forms of LTP. This latter type of LTP was first described at the mossy fiber synapses in the hippocampus and subsequently at parallel fiber synapses in the cerebellum as well as at corticothalamic synapses. These presynaptic forms of LTP require a rise in the intraterminal calcium concentration, but the channel through which calcium passes has not been identified. By using pharmacological tools as well as genetic deletion, we demonstrate here that alpha1E-containing voltage-dependent calcium channels (VDCCs) shift the threshold for mossy fiber LTP. The channel is not involved in the expression mechanism, but it contributes to the calcium influx during the induction phase. Indeed, optical recordings directly show the presence and the function of alpha1E-containing VDCCs at mossy fiber terminals. Hence, a previously undescribed role for alpha1E-containing VDCCs is suggested by these results.



## ***2.5. Eine präsynaptische Form der Assoziativität an Moosfasersynapsen vermittelt durch Kainatrezeptoren***

D. Schmitz, J. Mellor, **J. Breustedt**, R.A. Nicoll. Presynaptic kainate receptors impart an associative property to hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *Nat Neurosci*; 2003, 6: 1058-1063.

Zu den Hauptcharakteristika der Langzeit-Potenzierung gehören i) Eingangsspezifität, ii) Kooperativität und iii) Assoziativität (zur näheren Begriffserläuterung sei auf die Einleitung verwiesen). In den klassischen Formen der LTP, wie sie beispielsweise an der Schaffer-Kollateralsynapse zu finden ist, wird Assoziativität über den NMDA-Rezeptor (NMDAR) vermittelt. Dieser Rezeptor benötigt (unter anderem) zur Öffnung seiner ionenleitenden Pore sowohl den präsynaptisch ausgeschütteten Transmitter als auch eine Depolarisation der postsynaptischen Zelle zum Lösen des spannungsabhängigen Magnesiumionenblocks. Über diese doppelte Steuerung vermittelt der NMDAR die Koinzidenz und Assoziation von prä- und postsynaptischer Aktivität. Nun ist die LTP an der Moosfasersynapse unabhängig von NMDARs und es stellte sich die Frage, ob es grundsätzlich Assoziativität an dieser Synapse gibt.

Zunächst konnte in Erweiterung vorhergehender Befunde in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden, dass präsynaptische Kainatrezeptoren an der Moosfasersynapse entscheidend zum Setzen der Schwelle für die Induktion der LTP beitragen. Es besteht keine absolute Notwendigkeit für die Aktivierung dieses Rezeptors da mit starken Induktionsprotokollen trotz pharmakologischer Blockade der Kainatrezeptoren (mittels CNQX, siehe unten bezüglich der pharmakologischen Strategie) eine LTP ausgelöst werden konnte.

Der entscheidende experimentelle Ansatz zur Beantwortung der Frage nach der Assoziativität bestand nun darin, mittels koordinierter Stimulation unabhängiger synaptischer Eingänge das Vorhandensein der oben aufgeführten Eigenschaften der LTP (ii +iii) zu testen. In einem ersten Schritt wurde neben der standardmäßigen Stimulationselektrode zur Aktivierung der Moosfasertransmission im stratum granulosum (stim1) eine zweite Stimulationselektrode im stratum lucidum (stim2a) positioniert. Unterschwellige Reizung von stim1 führte zu keiner LTP, wurde diese aber mit einer zusätzlichen Reizung von stim2a kombiniert so ergab sich eine Potenzierung für den stim1-Eingang. Somit konnte zunächst das Phänomen der Kooperativität (ii) an der Moosfasersynapse nachgewiesen werden. Wurde nun die Position

der Reizelektrode stim2 zur Aktivierung von Assoziational-Kommissural Synapsen (AC) verlagert (stim2b), konnte die Kombination unterschwelliger Reizung von stim1 (Moosfasereingang) mit stim2b (AC-Eingang) eine Langzeitpotenzierung der Moosfasersynapse hervorrufen. Mit diesem Experiment konnte somit eine präsynaptische Form der Assoziativität zwischen AC- und Moosfasersynapse demonstriert werden. Abschließend konnte außerdem durch pharmakologische Intervention gezeigt werden, dass dieses präsynaptische Assoziativität durch Kainatrezeptoren (KAR) vermittelt wird.

Die pharmakologische Strategie, die in dieser Arbeit teilweise zum Einsatz kam, sei ergänzend kurz erläutert: In Ermangelung von spezifischen Antagonisten für Kainatrezeptoren (zumindest für die GluR6 Untereinheit, die an den Moosfaserterminalen von entscheidender Bedeutung ist) macht man sich das differentielle Wirkspektrum zweier Pharmaka bezüglich AMPAR und KAR zunutze. So blockiert die Substanz GYKI mit hoher Spezifität nur AMPAR, wohingegen CNQX sowohl AMPAR als auch KAR blockiert. Ein Effekt, der in Anwesenheit von GYKI persistiert, durch CNQX allerdings blockiert wird, lässt den Schluß auf eine Vermittlung durch KAR zu. Bezüglich der KAR Untereinheiten siehe auch die Bemerkungen zur Nomenklatur unter Punkt 2.3

Nat Neurosci. 2003 Oct;6(10):1058-63. Epub 2003 Aug 31.

## **Presynaptic kainate receptors impart an associative property to hippocampal mossy fiber long-term potentiation.**

Schmitz D, Mellor J, Breustedt J, Nicoll RA.

Neuroscience Research Center, Charité, Humboldt-University Berlin, Schumannstr. 20/21, 10117 Berlin, Germany.

### **Abstract**

Hippocampal mossy fiber synapses show an unusual form of long-term potentiation (LTP) that is independent of NMDA receptor activation and is expressed presynaptically. Using receptor antagonists, as well as receptor knockout mice, we found that presynaptic kainate receptors facilitate the induction of mossy fiber long-term potentiation (LTP), although they are not required for this form of LTP. Most importantly, these receptors impart an associativity to mossy fiber LTP such that activity in neighboring mossy fiber synapses, or even associational/commissural synapses, influences the threshold for inducing mossy fiber LTP. Such a mechanism greatly increases the computational power of this form of plasticity.

## **2.6. Die Rolle von Protein 4.1 in Transmission und Plastizität an Schaffer-Kollateral Synapsen**

C. Wozny \*, **J. Breustedt\***, F. Wolk \*, F. Varoquaux , S. Boretius, A.R. Zivkovic, A. Neeb, J. Frahm, D. Schmitz, N. Brose and A. Ivanovic. The function of glutamatergic synapses is not perturbed by severe knockdown of 4.1N and 4.1G expression. *Jornal of Cell Science*; 2009, 122: 735-744.

\* equal contribution

Das derzeit führende Modell für die Expression der NMDAR abhängigen Form der Langzeit-Potenzierung macht einen aktivitätsabhängigen vermehrten Einbau von ionotropen AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran ursächlich verantwortlich (Collingridge *et al.*, 2004). Bei diesem Vorgang werden die Rezeptoren von einer Reihe von Proteinen unterstützt. Besonders gut untersucht ist in diesem Zusammenhang Stargazin ( $\gamma$ -2), das zur Gruppe der Transmembran AMPA regulatorischen Proteine (TARPs, oder auch  $\gamma$ 2-4 und 8) gehört. Diese Proteine beeinflussen nicht nur den Transport der Rezeptoren in die Zellmembran, sondern bestimmen auf ganz entscheidende Art und Weise die biophysikalischen Eigenschaften des Rezeptors wie Einzelkanalleitfähigkeit, Affinität zu Agonisten oder Desensitisierung (Nicoll *et al.*, 2006).

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die mit AMPAR Untereinheiten (GluR1) als auch mit dem Zytoskelett zu assoziieren scheinen, sind die Mitglieder der so genannten Protein 4.1 Familie, denen daher ebenfalls eine Rolle beim Membrantransport der Rezeptoren zugeschrieben wird. Welche funktionelle Bedeutung diese Proteine in der synaptischen Transmission und Plastizität haben könnten war bislang allerdings noch nicht untersucht worden. Diese Familie besteht aus vier Proteinen, 4.1R, 4.1N, 4.1G und 4.1B, von denen insbesondere für 4.1N und 4.1G eine Interaktion mit den AMPAR Untereinheiten GluR1 und GluR4 (Shen *et al.*, 2000) als auch eine zerebrale Expression gezeigt worden war (Yamakawa & Ohara, 2000). In der vorliegenden Studie wurde daher eine Doppeldeletionsmutante untersucht, bei der die Proteine 4.1G und N ausgeschaltet wurden.

Auf synaptischer Ebene wurde in dieser Studie die Schaffer-Kollateral Synapse untersucht, da sie als modellhaft für die oben erwähnte NMDAR abhängige Form der LTP angesehen werden kann. Zunächst konnte in der Doppeldeletionsmutante eine Expression einer kurzen Variante des Proteins 4.1N festgestellt werden, die allerdings auch auf knapp 30 % gegenüber

dem Wildtyp Niveau reduziert war. In morphologischer Hinsicht ließen sich keine Auffälligkeiten auf der Ebene der Synapsen feststellen. In unterschiedlichen Membranfraktionen konnte hingegen eine moderate Reduktion der AMPAR Untereinheiten GluR1 (Synaptosomen) sowie GluR1 und GluR2/3 (Präparation der postsynaptischen Density, PSD) in den 4.1N/G KO-Mäusen detektiert werden. Erstaunlicherweise ließen sich mit unterschiedlichen elektrophysiologischen Ableittechniken (Feldpotential- sowie Ganzzell-Messungen) keinerlei Unterschiede bei den untersuchten Parametern der synaptischen Transmission oder auch extrasynaptischen AMPAR vermittelten Antworten nachweisen: Das input-output Verhalten, die Doppel-Puls Plastizität, das Verhältnis der AMPAR-vermittelten zur NMDAR vermittelten Antwort oder die Frequenz und Amplitude der Miniatur-EPSCs an Schaffer-Kollateral Synapsen beziehungsweise CA1 Pyramidenzellen zeigten keinerlei Unterschiede zwischen Wildtyp und Doppel-knock-out Tieren. Ebenso wenig waren biophysikalische Parameter der AMPAR vermittelten Ströme, wie der Rektifizierungsindex, oder die Ganzzell-Stromantwort auf AMPA Applikation, als Test für extrasynaptische AMPAR, verändert. Schließlich zeigte sich auch in der Langzeitpotenzierung keinerlei Veränderung.

Der Mangel eines elektrophysiologisch nachweisbaren Phänotyps lässt vermuten, dass die 4.1 Isoformen eine funktionelle Redundanz aufweisen. Aus diesem Grunde haben wir in einer bislang unveröffentlichten Untersuchung eine Trippel-Deletionsmutante von 4.1 N, G und B studiert. In der Tat konnte in diesem Mausmodell eine starke Reduktion der LTP-Expression und somit die bedeutende Rolle der 4.1 Proteine demonstriert werden.

## **The function of glutamatergic synapses is not perturbed by severe knockdown of 4.1N and 4.1G expression.**

Wozny C\*, Breustedt J\*, Wolk F\*, Varoqueaux F, Boretius S, Zivkovic AR, Neeb A, Frahm J, Schmitz D, Brose N, Ivanovic A.

Neuroscience Research Center, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, D-10117 Berlin, Germany.

### **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.

\* authors contributed equally

### 3. Diskussion

Die synaptische Transmission unterliegt vielfältigen modulatorischen Einflüssen. Insbesondere auf der präsynaptischen Seite führt die Existenz von Auto- und Heterorezeptoren zu einer Integration verschiedenster Signale bei der Weiterleitung von Aktionspotentialmustern auf das postsynaptische Element. An den hippocampalen Moosfaserboutons konnte beispielsweise die Existenz von Dynorphin- und Adenosin-Rezeptoren funktionell nachgewiesen werden (Weisskopf *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 2003). In Abschnitt 2.1 der vorliegenden Schrift wurde nun der zelluläre und molekulare Wirkmechanismus der adenosinvermittelten Modulation der synaptischen Transmission einer detaillierten Analyse unterzogen. Der Hauptbefund dieser Untersuchung bestand darin, dass diese Modulation ausschließlich über spannungsabhängige Kalziumkanäle erfolgte (engl.: voltage dependent calcium channels, VDCC), wobei sowohl P/Q-Typ als auch N-Typ VDCC beteiligt waren. Dahingegen wurden R-Typ VDCC durch Adenosin nicht beeinflusst, obgleich sie deutlich zum Kalziuminflux in die Terminalen beitragen. Eine Beteiligung an der basalen synaptischen Transmission war für den R-Typ VDCC allerdings ebenfalls nicht nachweisbar (siehe Abschnitt 2.4). Mit drei verschiedenen experimentellen Ansätzen konnte die Bedeutung der Kalziumkanäle herausgearbeitet werden: i) mikrofluorometrische Messungen mit kalziumsensitiven Farbstoffen, wobei die emittierten Photonen mittels einer einzelnen Photodiode detektiert wurden. Diese Technik gestattet eine exzellente zeitliche Auflösung, besitzt allerdings nur ein geringes räumliches Auflösungsvermögen, ii) Kalziummessungen mit einer guten räumlichen Auflösung auf Einzelbouton-Ebene mit Hilfe eines konfokalen Nipkow-Spinning-Disk Systems (Abschnitt 2.1, Abbildung 4), und schließlich iii) direkte elektrophysiologische Ableitungen der Kalziumströme an Moosfaser-Boutons. Mit allen drei Methoden war eine Reduktion der Kalziumtransienten/Ströme durch Adenosinapplikation von ähnlicher Größenordnung zu verzeichnen gewesen. Die direkte Messung von Kalziumströmen an zentralen Synapsen ist aufgrund ihrer geringen Größe technisch außerordentlich schwierig. Bislang sind derartige direkte Ableitungen außer an den hier vorgestellten Moosfaserboutons (Geiger & Jonas, 2000) nur an der deutlich größeren Heldschen Kalyx im Hirnstamm gelungen (Forsythe, 1994). Im übrigen wurden derartige Untersuchungen zu Wirkmechanismen der Kalziumstrommodulation überwiegend an Zellkultursystemen vorgenommen (Herlitze *et al.*, 1996). Zunächst war in unserer Studie bemerkenswert, dass die Reduktion der Amplitude der Kalziumströme effektiver war wenn diese Ströme durch

künstliche Aktionspotentiale hervorgerufen wurden als durch die zumeist in derartigen Studien verwendeten Rechteckpulse. Daher scheint eine kinetische Optimierung der Modulation der VDCC vorzuliegen, die unseres Wissens nach bisher so noch nicht demonstriert worden war. Daneben konnten zwei weite charakteristische Veränderungen des Kalziumstroms nachgewiesen werden, die für eine direkte G-Protein vermittelte Wirkung sprechen (Herlitze *et al.*, 1996): Zum einen war die Anstiegskinetik in Anwesenheit von Adenosin verlangsamt und darüber hinaus waren die Effekte auf die Amplitude spannungsabhängig reversibel. Eine Vordepolarisation des Boutons hob den Adenosin-Effekt auf. Takahashi *et al.* konnten in ihren Arbeiten an der Heldschen Kalyx bezüglich der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor (GABA<sub>B</sub>R) vermittelten Modulation der synaptischen Transmission ebenfalls eine Reduktion der Amplitude und Anstiegskinetik des Kalziumstroms sowie eine Spannungsabhängigkeit dieses Effektes durch GABA<sub>B</sub>R Aktivierung demonstrieren. Zusätzlich konnten sie in Okklusionsexperimenten mit GTP-Analogen GTP- $\gamma$ S weitere Hinweise für eine Vermittlung durch G-Proteine erbringen und schließlich den Effekt weiter auf die  $\beta\gamma$ -Untereinheit eingrenzen (Takahashi *et al.*, 1998; Kajikawa *et al.*, 2001).

Eine in der Literatur kontrovers diskutierte Tatsache betrifft die Frage, inwieweit eine tonische Hemmung durch Adenosin an der Moosfaser-Synapse vorliegt (Kukley *et al.*, 2005; Klausnitzer & Manahan-Vaughan, 2008). Obgleich dieser Aspekt nicht im Fokus unserer Untersuchung stand, konnte dennoch ein weiterer aufschlussreicher Befund beige-steuert werden: Unter Kontrollbedingungen in Abwesenheit von extern appliziertem Adenosin führte die bereits erwähnte Vordepolarisation zu einem Anstieg der Kalziumstromamplitude in direkten Bouton-Ableitungen. Zwar wurde dieses Phänomen nicht weiter pharmakologisch aufgeschlüsselt, es lässt sich aber sagen, dass eine tonische, wahrscheinlich G-Protein vermittelte Hemmung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle an dieser Synapse besteht.

Auf gänzlich andere Weise erfolgt die Modulation der synaptischen Transmission an der Moosfasersynapse über präsynaptische Kainatrezeptoren. Eine Besonderheit ist hierbei, dass es sich um ionotrope Autorezeptoren handelt im Gegensatz zu den üblicherweise vorhandenen metabotropen Autorezeptoren. Ein weiteres Beispiel für präsynaptische ionotrope Rezeptoren stellen Glyzin-Rezeptoren im Hirnstamm dar, die die Transmission zu verstärken vermögen (Turecek & Trussell, 2001). Auf phänomenologischer Ebene bemerkenswert ist die biphasische Modulation der Moosfaser-Transmission durch Kainat, wobei niedrige Dosen zu einer Fazilitierung, höhere hingegen zu einer Depression führen (Schmitz *et al.*, 2001b). Bis auf eine jüngst erschienene Arbeit (Kwon & Castillo, 2008b) herrschte grundsätzlich Einigkeit darüber, dass präsynaptische Kainatrezeptoren an der Moosfaser-Synapse existieren



und die Kurzzeit- als auch Langzeitdynamik positiv modulieren können (Contractor *et al.*, 2001; Kamiya *et al.*, 2002; Lauri *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2007; Sachidhanandam *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2001b). Kwon *et al.* haben argumentiert, dass dieser Effekt ausschliesslich durch postsynaptische KAR vermittelt wird. Aufgrund einer polysynaptischen Aktivierung des postsynaptischen rekurrenten CA3 Netzwerkes wäre in den anderslautenden Untersuchungen fälschlicherweise das Vorhandensein präsynaptischer KARs suggeriert worden. Diese Deutung der Befunde hat allerdings bereits starken Widerspruch erfahren (Sachidhanandam *et al.*, 2009). In letzterer Arbeit wurde ein besonders überzeugender funktioneller Nachweis erbracht, der für präsynaptische KAR spricht. Es konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit der GluK3 Untereinheit die Kurzzeitfazilitierung deutlich reduziert ist (gemäß aktueller Nomenklatur, siehe Abschnitt 2.3). Für die Argumentation entscheidend ist nun die Tatsache, dass die GluK3 Untereinheit nur präsynaptisch an Moosfaserterminalen, nicht aber postsynaptisch in CA3 Pyramidenzellen exprimiert wird. Diese Daten stehen in Einklang mit den in Abschnitt 2.3 erbrachten Befunden, die ebenfalls für eine funktionelle Relevanz von präsynaptischen KAR sprechen, in diesem Falle für die GluK2 Untereinheit. Bezüglich der Frage welche KAR-Untereinheiten die präsynaptische Modulation bewerkstelligen wurde eine ausgesprochen intensive Debatte geführt. Im Zentrum standen dabei allerdings die GluK1 und GluK2 Untereinheiten. Diese Frage ist auch von pathophysiologischer Relevanz, da postuliert worden ist, dass GluK1 enthaltende KAR bei der Epileptogenese eine Rolle spielen könnten und somit ein potentiell pharmakotherapeutisches Ziel darstellen (Smolders *et al.*, 2002). Sowohl pharmakologisch als auch durch die Nutzung genetischer Deletionsmutanten konnten wir den Nachweis erbringen, dass es sich um GluK2 enthaltende präsynaptische Kainatrezeptoren handelt. Hingegen ist ein GluK1 spezifisches Pharmakon ohne Einfluss auf die Moosfasertransmission. Diese Experimente stehen in deutlichem Gegensatz zu mehreren Arbeiten, die die GluK1 Untereinheit als wichtigen Bestandteil des präsynaptischen KAR postulieren (Bortolotto *et al.*, 1999; Bortolotto *et al.*, 2005; Lauri *et al.*, 2001; More *et al.*, 2004). Unsere Befunde werden allerdings durch aktuelle Untersuchungen unterstützt (Sachidhanandam *et al.*, 2009). Die Zusammenschau der Daten legt den Schluss nahe, dass es sich bei den präsynaptischen KAR überwiegend um GluK2/GluK3 Heteromere handelt. Zusätzlich scheint aber auch die GluK5 Untereinheit von essentieller Bedeutung zu sein (Pinheiro *et al.*, 2007). Die exakte Untereinheitenkomposition des präsynaptischen KARs an der Moosfaserterminale ist aber bislang noch nicht abschliessend geklärt.

Weiterhin bedeutsam sind die präsynaptischen KAR hinsichtlich der Frage nach der Assoziativität der Langzeitpotenzierung an der Moosfasersynapse. Zunächst konnten die Experimente in Abschnitt 2.5 dieser Arbeit den Nachweis erbringen, dass an dieser synaptischen Verbindung eine Form der Assoziativität existiert. Ältere Studien hatten dieses verneint (Zalutsky & Nicoll, 1992), wodurch die Bedeutung der LTP an der Moosfasersynapse in Frage gestellt worden war. Die hier gefundene Assoziativität ist präsynaptisch ausgeprägt, d.h. sie besteht im Gegensatz zur klassischen NMDAR abhängigen Form der LTP nicht zwischen prä- und postsynaptischen Element sondern erfolgt auf der präsynaptischen Seite zwischen AC- und Moosfasern. Interessanterweise sind hierfür präsynaptische KAR von Bedeutung, da ihre Blockade die Assoziativität hemmt. Eine weitere Studie konnte zusätzlich demonstrieren, dass die Interaktion zwischen diesen beiden Fasersystemen auch bidirektional funktioniert, indem die zeitlich genau abgestimmte Aktivierung von Moosfasereingängen die Auslösung von AC-LTP (einer klassisch NMDAR abhängigen, postsynaptisch exprimierten Form) erleichtert (Kobayashi & Poo, 2004). Dabei führte eine Moosfaseraktivierung, die der AC-Stimulation um 10 bis 30 ms vorausging, zur größten Potenzierung. Auf eine mögliche Rolle der KAR wurde in jener Arbeit allerdings nicht eingegangen.

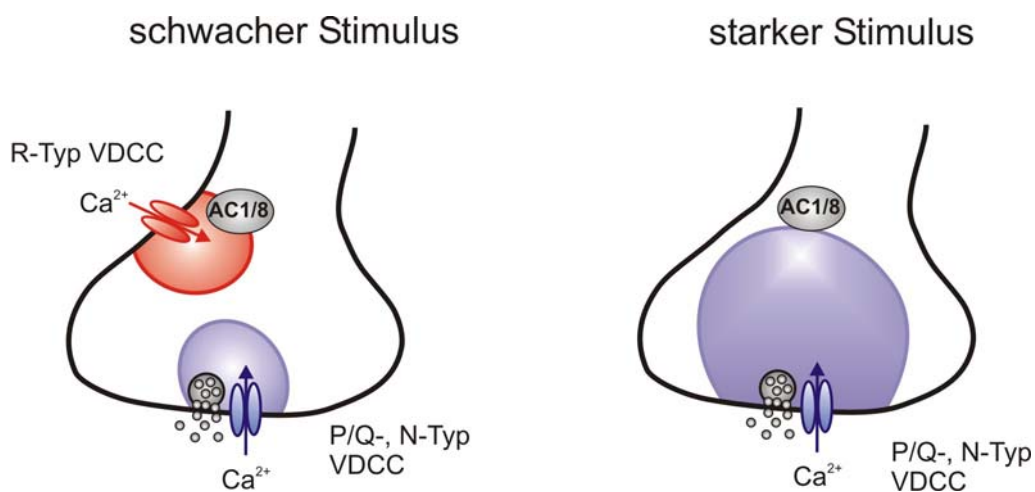
Hinsichtlich der Induktion der Moosfaser-LTP kommt den KAR eine fazitätierende Rolle zu, indem sie zur Modulation der Induktionsschwelle beitragen (siehe auch Abschnitt 2.3 und 2.5). In einer jüngeren Studie ist postuliert worden, dass dies durch kalziumpermeable KAR erfolgt und der resultierende Kalziuminflux anschließend eine weitere Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern hervorruft, die für die Auslösung der LTP entscheidend sei (Lauri *et al.*, 2003). Mit Hilfe von mikrofluorometrischen Messungen mit kalziumsensitiven Farbstoffen und entsprechenden pharmakologischen Antagonisten konnte in Abschnitt 2.3 der vorliegenden Arbeit eine solche Beteiligung intrazellulärer Speicher nicht nachvollzogen werden. Es gibt allerdings andere Arbeiten, die die Existenz dieser Kalziumspeicher an Moosfaserboutons demonstrieren haben und deren Beteiligung an der Kurzzeitplastizität zeigten (Scott *et al.*, 2008; Shimizu *et al.*, 2008). Ihre Mitwirkung in der Induktion der Langzeitplastizität wurde in jenen Studien jedoch nicht untersucht. Die bestehenden Diskrepanzen in dieser Frage konnten daher bislang nicht abschließend geklärt werden.

Die Notwendigkeit eines präsynaptischen Kalziuminfluxes für die Auslösung von Moosfaser-LTP ist dagegen überwiegend akzeptiert (Nicoll & Schmitz, 2005), aber auch (Yeckel *et al.*, 1999). Allein die Quelle für diese Kalziumionen blieb fraglich. Die gemeinhin für die präsynaptische Transmitterfreisetzung verantwortlichen Subtypen von spannungsabhängigen

Kalziumkanälen, nämlich P/Q- und N-, tragen an der Moosfasersynapse zur Transmission bei (ihre Blockade reduziert die Transmission komplett (P/Q), bzw. um 40 % (N), allerdings kann trotz Inhibition eines oder gar beider dieser Kanäle eine LTP ausgelöst werden (Castillo *et al.*, 1994). Im übrigen konnte weder dort, noch in direkten Ableitungen von Kalziumströmen an Moosfaserboutons (Li *et al.*, 2007), noch in der Arbeit 2.4 ein Beitrag von L-Typ VDCC zum Kalziuminflux in Moosfaserboutons gefunden werden, wie er für spezifische, aber eher unphysiologische Bedingungen postuliert worden ist (Lauri *et al.*, 2003). Mit den Experimenten aus Abschnitt 2.4 konnte der Nachweis erbracht werden, dass ein R-Typ VDCC signifikant zum präsynaptischen Kalziuminflux (40 %) beiträgt und die Schwelle der LTP-Induktion beeinflusst. Entsprechende Befunde waren von einer weiteren Arbeitsgruppe im gleichen Jahr publiziert worden (Dietrich *et al.*, 2003). Eine absolute Notwendigkeit dieses Kanals war nicht gegeben, da Induktionsprotokolle mit stärkeren Reizintensitäten in der Lage waren trotz Hemmung der R-Typ Kanäle eine LTP zu induzieren. Es sei ausserdem darauf verwiesen, dass der exakte Beitrag der R-Typ Kanäle schwer zu ermitteln ist, da es sich hierbei um eine pharmakologische Definition handelt. Sowohl die vorhandenen Pharmaka in spezifischen Konzentrationen als auch die erhältlichen genetischen Deletionsmodelle ( $\alpha 1E$ -KO) können aber nicht die gesamte zugrunde liegende Kanalpopulation blockieren oder ausschalten (Tottene *et al.*, 2000). In weiteren Studien konnte die Existenz der R-Typ Kanäle an Moosfaserboutons nicht nur bestätigt, sondern auch um wichtige Details erweitert werden. Zunächst scheint eine ausgeprägte Heterogenität vorzuliegen, was die Expression der R-Typ Kanäle an einzelnen individuellen Boutons anbelangt. Der Beitrag des R-Typ vermittelten Kalziuminfluxes variierte dabei zwischen maximal 35 % und Boutons ohne jeglichen R-Typ Anteil (Miyazaki *et al.*, 2005). In direkten elektrophysiologischen Kalziumstrommessungen an Moosfaserboutons konnte dies allerdings nicht bestätigt werden. Hier war eine R-Typ Komponente in allen abgeleiteten Boutons gesehen worden (Li *et al.*, 2007). Der R-Typ vermittelte Anteil am gesamten Kalziumeinstrom wurde mit nur 15 % bestimmt. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit erstmals fundamentale biophysikalische Eigenschaften der R-Typ Kanäle an Moosfaserboutons aufgeklärt. So wurde die Einzelkanalleitfähigkeit mit 3.3 pS bestimmt, gegenüber 2.2 pS von P/Q-Typ Kanälen. Neben dieser größeren Einzelkanalleitfähigkeit haben R-Typ Kanäle offensichtlich die Eigenschaft durch breitere (d.h. längere) Aktionspotentiale bevorzugt rekrutiert zu werden im Vergleich zu P/Q-Kanälen. Eine solche Verbreiterung ist für repetitive Aktionspotentialserien beschrieben worden (Geiger & Jonas, 2000), wie sie auch bei den Protokollen für die LTP Induktion vorkommen.

Aus dieser Tatsache ergibt sich ein weiterer guter Erklärungsansatz für die besondere Rolle der R-Typ Kanäle in der LTP-Induktion (Li *et al.*, 2007).

Wie bereits zuvor beschrieben tragen R-Typ Kanäle zum Kalziuminflux in die Moosfaserboutons bei. Bei Stimulation mit geringer Frequenz (z. B. 0.05 Hz) führt dieser Kalziuminflux aber nicht zu einer Transmitterfreisetzung (Dietrich *et al.*, 2003; Breustedt *et al.*, 2003), aber siehe auch (Gasparini *et al.*, 2001). Erst repetitive Reizserien (ab 4 Pulse mit 25 Hz) führen zu einem ausreichend großen R-Typ vermittelten Kalziuminflux mit nachfolgender Transmitterfreisetzung. Gleichzeitig kontrolliert dieser Kanal aber mit hoher Sensitivität den Kalziumzugang zur Adenylatzyklase, deren Aktivierung für die Induktion der Moosfaser-LTP notwendig ist. Genau umgekehrt verhält es sich für die Kalziumkanäle von P/Q- und N-Typ. Sie vermitteln den Kalziuminflux für die Transmitterfreisetzung bei basaler niederfrequenter Aktivierung der Moosfasern. Hingegen gelangt erst bei starken Induktionsprotokollen ausreichend Kalzium über P/Q- und N-Typ Kanäle in die Terminale um die Adenylatzyklase zu aktivieren und somit eine LTP auszulösen. Diese Situation lässt eine räumlich funktionelle Organisation der Moosfaserterminalen in hochspezialisierten Nanodomänen möglich erscheinen, wie sie in der Abbildung 1 schematisch dargestellt wird.



**Abb1:** Hypothetisches Modell der molekularen räumlichen Organisation von Moosfaserboutons: R-Typ Kanäle scheinen strategisch günstig nahe an der Adenylatzyklase positioniert zu sein. Letztere ist kalziumsensitiv und für die Initiierung der Signalkaskade der LTP-Induktion von entscheidender Bedeutung. Hingegen sind R-Typ Kanäle vom Kalziumsensor an den Vesikel, der die Transmitterfreisetzung vermittelt, weiter entfernt. Der durch ein einzelnes Aktionspotential hervorgerufene Kalziuminflux durch einen R-Typ Kanal erreicht gut die Adenylatzyklase aber nicht den vesikulären Sensor. Für die P/Q- und N-Typ Kanäle verhält es sich umgekehrt, sie sind nahe am Sensor und weiter entfernt von der Adenylatzyklase (linke Seite). Erst mehrere repetitive Aktionspotentiale führen zu dem nötigen Kalziuminflux, so dass die jeweiligen Nanodomänen durchbrochen werden können (rechte Seite, exemplarisch dargestellt für P/Q- und N-Typ).

Die auffällig stark ausgeprägte Kurzzeitdynamik an der Moosfaser-Synapse ist immer wieder auf nachhaltiges Interesse gestoßen. Dabei scheinen die unterschiedlichsten Prozesse und Moleküle zu dieser Dynamik beizutragen (Salin *et al.*, 1996b). Allerdings konnten die jeweilig postulierten Mechanismen immer nur einen gewissen Anteil der Fazilitierung erklären, ein alleinverantwortlich ursächlicher Mechanismus konnte bislang nicht gefunden werden. So können unter anderem präsynaptische Kainatrezeptoren (siehe Abschnitt 2.3, (Contractor *et al.*, 2001; Lauri *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2001b)), intrazelluläre Kalziumspeicher ((Scott *et al.*, 2008; Shimizu *et al.*, 2008), aber siehe Abschnitt 2.2 und (Carter *et al.*, 2002)) oder auch die Sättigung intraterminaler Kalziumpufferungsproteine wie Calbindin (Blatow *et al.*, 2003) jeweils zur Kurzzeitfazilitierung beitragen. Die entsprechende Bedeutung der tonischen Aktivierung von Adenosinrezeptoren und ihre Folgen für die synaptische Dynamik sind bereits oben ausführlich diskutiert worden (Abschnitt 2.1). Jüngere Studien hatten nun einen weiteren attraktiven Kandidaten in den Fokus gerückt. Es war postuliert worden, dass in Abhängigkeit des jeweilig exprimierten Paralogs der Munc13 Familie eine Synapse entweder einen fazilitierenden (Munc13-2) oder einen deprimierenden (Munc13-1) Phänotyp in der Kurzzeitdynamik aufweisen können (Rosenmund *et al.*, 2002). Erstmals konnte hierbei die spezifische Identität eines einzelnen Proteins des Freisetzungapparates für die Richtung der Kurzzeitdynamik verantwortlich gemacht werden (siehe Einleitung zu Abschnitt 2.2). In den vorgelegten Ergebnisse aus Abschnitt 2.2 ergab sich in der Tat, dass das Fehlen von Munc13-2 einen deutlichen Einfluss auf die Kurzzeitdynamik hat. Entgegen der Erwartung war jedoch die Kurzzeitfazilitierung an der Moosfaser-Synapse in Abwesenheit von Munc13-2 erhöht, was als Folge einer deutlich reduzierten Freisetzungswahrscheinlichkeit interpretiert werden kann. Die Gegenprobe mit Munc13-1 war leider nicht möglich, da die Tiere mit einer Munc13-1 Deletion postnatal nicht vital sind. Weiterhin konnten wir demonstrieren, dass die beobachteten Effekte der Munc13-2 Deletion spezifisch für die Moosfaser-Synapse sind, da andere exzitatorische hippokampale Synapsen (SC- oder AC-Synapsen) oder inhibitorische Eingänge auf CA3 Pyramidenzellen unverändert blieben. Daher ist es einerseits denkbar, dass die Munc13 Paraloge synapsenspezifische Funktionen aufweisen. Andererseits wäre es möglich, dass die Regulation des Primings und der Freisetzungswahrscheinlichkeit mehr von der Gesamtzahl der Kopien der Munc13 Proteine abhängen, als von der spezifischen Identität des jeweiligen Paralogs. Wir favorisieren wie in Abschnitt 2.2 erläutert die letztere Ansicht, die auch einen vereinheitlichenden Erklärungsansatz für Unterschiede zur Studie von Rosenmund *et al.* bietet.

Andere Komponenten des Freisetzungapparates wie z.B. Rim1 $\alpha$  und Rab3a sind ebenfalls intensiv untersucht worden (Castillo *et al.*, 1997; Castillo *et al.*, 2002; Schoch *et al.*, 2002; Calakos *et al.*, 2004). Diese beiden Proteine scheinen gemeinsam mit Munc13 einen funktionellen „tripartite complex“ zu bilden (Dulubova *et al.*, 2005). Bislang zeichnet sich jedoch keine konsistente allgemeine Theorie für die Funktion dieser Proteine in der synaptischen Dynamik ab. So führt das Fehlen von Rim1 $\alpha$  an Schaffer-Kollateral-Synapsen zu einer geringeren Freisetzungswahrscheinlichkeit und erhöhten Kurzzeitfazilitierung (Schoch *et al.*, 2002), wohingegen Munc13-2 hier keine Effekte aufweist. An Moosfasersynapsen hingegen scheinen basale Transmission und Kurzzeitplastizität in Rim1 $\alpha$  Deletionspräparaten unbeeinträchtigt (Castillo *et al.*, 2002). Allerdings ist in diesen Studien wiederum gezeigt worden, dass Rim1 $\alpha$  von entscheidender Bedeutung für die Expression der LTP an der Moosfasersynapse ist. Für Munc13-2 konnten wir hingegen keinerlei Involvierung in die Langzeitplastizität an dieser Synapse finden (Abschnitt 2.2). Auch die Untersuchung einer Munc13-2  $-/-$ , Munc13-2  $+/-$  Mauslinie (Tiere sind vital) zeigte normale Moosfaser-LTP. Hieraus scheint zu folgen, dass die einzelnen Komponenten des „tripartite complex“ noch jeweils unabhängige Funktionen erfüllen. Eine abschließende Bewertung aller vorliegenden teils disparaten Befunde ist zum derzeitigen Moment allerdings noch nicht möglich.

Während also für präsynaptisch exprimierte Formen der LTP eine Phosphorylierung von Rim1 $\alpha$  das derzeit führende Modell darstellt (Castillo *et al.*, 2002) (die Bedeutung der Rim1 $\alpha$ -Phosphorylierung ist aber jüngst von derselben Arbeitsgruppe in Frage gestellt worden (Kaeser *et al.*, 2008)), sind bei postsynaptisch exprimierten Formen zum einen die Phosphorylierung von AMPAR, als auch insbesondere der Transport von zusätzlichen AMPA Rezeptoren in die postsynaptische Membran als verantwortliche Mechanismen identifiziert worden (Bredt & Nicoll, 2003). In diesem Zuge wurde in der vorliegenden Arbeit (2.6) ein möglicher neuer Kandidat des AMPAR-Transports, Protein 4.1, in einer Doppeldeletionsmutante (4.1N und G) untersucht. Die Relevanz des Proteins 4.1N für den Einbau der AMPAR Untereinheit GluR1 in die extrasynaptische Membran konnte jüngst nachgewiesen werden (Lin *et al.*, 2009). Wenngleich das Fehlen dieser zwei Isoformen in der hier vorgelegten Untersuchung die LTP unbeeinträchtigt ließen, konnte in noch unveröffentlichten Studien einer Triple-Deletion von 4.1N, G und B eine deutliche Reduktion der LTP beobachtet werden. Daneben ist jüngst mit den Cornichons eine weitere Proteinfamilie als bedeutsames Transportprotein ausfindig gemacht worden, die ähnlich den TARPs (siehe Einleitung 2.6) auch die biophysikalischen Eigenschaften der AMPA

Rezeptoren modulieren (Schwenk *et al.*, 2009). Ein Einfluß auf die spezifischen Kanaleigenschaften wie Leitfähigkeit oder Desensitisierung ist bislang für die 4.1 Proteine noch nicht gefunden worden.

Inwieweit ein Transport von zusätzlichen oder neuen Ionenkanälen oder anderweitigen Proteinen bei der Expression von klassischer präsynaptischer Moosfaser-LTP eine Rolle spielen könnte ist bislang noch nicht untersucht worden. Es gibt allerdings einige erste Evidenzen, dass die Expression präsynaptischer LTP das Anschalten neuer Freisetzungszonen (release sites) erfordert (Tong *et al.*, 1996; Reid *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang ist es denkbar, dass beispielsweise spannungsabhängige Kalziumkanäle in neue aktive Zonen eingebaut werden müssen, wofür ebenfalls entsprechende Transportproteine erforderlich sein könnten. Die mögliche Identifikation solcher Prozesse und molekularer Kandidaten ist allerdings zukünftigen Studien vorbehalten.

## 4. Zusammenfassung

In der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift wurden verschiedene Aspekte der synaptischen Kurzzeit- und Langzeitdynamik an unterschiedlichen synaptischen Verbindungen des Hippocampus untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Moosfasersynapse.

An der Moosfasersynapse konnte zunächst demonstriert werden, dass Adenosin eine tonische Hemmung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen vermittelt. Es konnte die Modulation der P/Q- und N-Typ Kanäle pharmakologisch eingegrenzt werden. Über diesen Mechanismus wird auf extrinsische Weise die Freisetzungswahrscheinlichkeit an dieser Synapse auf einem niedrigen Niveau gehalten, was wiederum zu den Voraussetzungen für die besonders stark ausgeprägte Fazilitierungsdynamik gehört. Im Vergleich hierzu erfolgt die Einflussnahme von Munc13-2 auf die Freisetzungswahrscheinlichkeit auf intrinsischem Wege. Dieses Protein konnte als Bestandteil des Freisetzungsapparates als besonders bedeutsam für die Moosfasersynapse nachgewiesen werden. Der Verlust von Munc13-2 in einer Deletionsmutante führte zu einer deutlich verringerten Freisetzungswahrscheinlichkeit und als Konsequenz zu einer stark erhöhten Kurzzeitfazilitierung an den Moosfasern. Die Langzeitplastizität hingegen war durch den Verlust von Munc 13-2 nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu waren die Kernparameter der synaptischen Transmission an drei weiteren hippocampalen Synapsen, nämlich Schaffer-Kollateral-, Assoziational-Kommissural-, sowie inhibitorischen Synapsen auf CA3 Pyramidenzellen durch den Verlust von Munc13-2 unbeeinträchtigt.

Eine weitere bedeutsame Einflussgröße an den Moosfaserterminalen stellen ionotrope glutamaterge Autorezeptoren vom Kainattyp dar. Diesbezüglich konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass die  $\text{Glu}_{K6}$  Untereinheit entscheidender Bestandteil der Zusammensetzung des präsynaptischen Kainatrezeptors ist und nicht wie vielfach postuliert die  $\text{Glu}_{K5}$  Untereinheit. Die Aktivierung der  $\text{Glu}_{K6}$  enthaltenden KAR trägt sowohl zur Kurzzeitdynamik an der Moosfasersynapse bei als auch zum Setzen der Induktionsschwelle für die Langzeitplastizität. Eine Involvierung von intrazellulären Kalziumspeichern in der durch KAR initiierten Signalkaskade konnte hier experimentell nicht nachgewiesen werden. Die präsynaptischen ionotropen Kainatrezeptoren sind darüber hinaus auch für die Vermittlung einer präsynaptischen Form der Assoziativität an Moosfasersynapsen



bedeutsam. Die Existenz dieses wichtigen Charakteristikums der Langzeitpotenzierung war für die Moosfasersynapse lange Zeit fraglich geblieben. Die Rolle der KAR für die Kooperativität zwischen Moosfasern als auch für die Assoziativität zwischen AC- und Moosfasersynapsen konnte hier durch den Einsatz entsprechender Stimulationsprotokolle sowie mittels pharmakologischer Werkzeuge erstmalig demonstriert werden.

Eine andere ungeklärte Frage betraf die Quelle des für die Induktion der Moosfaser-LTP notwendigen präsynaptischen Kalziumioneninflux. In diesem Zusammenhang gelang es den R-Typ Kalziumkanal als wesentlich zu identifizieren. Ebenso wie im Falle des präsynaptischen Kainatrezeptors besteht auch für den R-Typ Kalziumkanal allerdings keine absolute Notwendigkeit für die Auslösung der LTP. Induktionsprotokolle höherer Intensität sind in der Lage andere Quellen für den Kalziuminflux (P/Q- und N-Typ Kanäle) zu rekrutieren. Die Induktionsschwelle wird allerdings durch die R-Typ Kanäle herabgesetzt. Interessanterweise scheint die basale synaptische Transmission an Moosfasern weitgehend unabhängig von R-Typ Kanälen zu sein.

Ein weiterer Gegenstand der vorgelegten Untersuchungen betraf die mögliche Funktion der Proteine 4.1N und 4.1G im Zuge der postsynaptischen Expression von Langzeit-Potenzierung an Schaffer-Kollateral-Synapsen. Es konnte keine Beteiligung dieser beiden Paraloge am Transport von AMPAR-Untereinheiten in die postsynaptische und extrasynaptische Membran nachgewiesen werden, obgleich Vorbefunde dies nahegelegt hatten. Vielmehr scheint eine ausgeprägte funktionelle Redundanz der 4.1 Paraloge vorzuliegen, so dass erst das Fehlen aller zerebral exprimierten Paraloge zu einem elektrophysiologisch detektierbaren Phänotyp führt.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abbott, L. F. & Regehr, W. G. (2004). Synaptic computation. *Nature* **431**, 796-803.
- Allen, R. C. (1999). *David Hartley on Human Nature* State University of New York Press.
- Atwood, H. L. & Karunanithi, S. (2002). Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. *Nat.Rev.Neurosci.* **3**, 497-516.
- Bernard, C. (1883). *Lecons sur les Effets du Substances Toxiques et Medicamenteuses*.
- Blatow, M., Caputi, A., Burnashev, N., Monyer, H., & Rozov, A. (2003). Ca<sup>2+</sup> buffer saturation underlies paired pulse facilitation in calbindin-D28k-containing terminals. *Neuron* **38**, 79-88.
- Bliss, T. V. & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31-39.
- Bortolotto, Z. A., Clarke, V. R., Delany, C. M., Parry, M. C., Smolders, I., Vignes, M., Ho, K. H., Miu, P., Brinton, B. T., Fantaske, R., Ogden, A., Gates, M., Ornstein, P. L., Lodge, D., Bleakman, D., & Collingridge, G. L. (1999). Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature* **402**, 297-301.
- Bortolotto, Z. A., Nistico, R., More, J. C., Jane, D. E., & Collingridge, G. L. (2005). Kainate receptors and mossy fiber LTP. *Neurotoxicology* **26**, 769-777.
- Bredt, D. S. & Nicoll, R. A. (2003). AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* **40**, 361-379.
- Breustedt, J., Vogt, K. E., Miller, R. J., Nicoll, R. A., & Schmitz, D. (2003). Alpha1E-containing Ca<sup>2+</sup> channels are involved in synaptic plasticity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 12450-12455.
- Calakos, N., Schoch, S., Sudhof, T. C., & Malenka, R. C. (2004). Multiple roles for the active zone protein RIM1alpha in late stages of neurotransmitter release. *Neuron* **42**, 889-896.
- Carter, A. G., Vogt, K. E., Foster, K. A., & Regehr, W. G. (2002). Assessing the role of calcium-induced calcium release in short-term presynaptic plasticity at excitatory central synapses. *J.Neurosci.* **22**, 21-28.

Castillo, P. E., Janz, R., Sudhof, T. C., Tzounopoulos, T., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1997). Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **388**, 590-593.

Castillo, P. E., Schoch, S., Schmitz, F., Sudhof, T. C., & Malenka, R. C. (2002). RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation. *Nature* **415**, 327-330.

Castillo, P. E., Weisskopf, M. G., & Nicoll, R. A. (1994). The role of Ca<sup>2+</sup> channels in hippocampal mossy fiber synaptic transmission and long-term potentiation. *Neuron* **12**, 261-269.

Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol.Rev.* **57**, 411-425.

Collingridge, G. L., Isaac, J. T., & Wang, Y. T. (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat.Rev.Neurosci.* **5**, 952-962.

Collingridge, G. L., Olsen, R. W., Peters, J., & Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* **56**, 2-5.

Contractor, A., Swanson, G., & Heinemann, S. F. (2001). Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* **29**, 209-216.

Dietrich, D., Kirschstein, T., Kukley, M., Pereverzev, A., von der, B. C., Schneider, T., & Beck, H. (2003). Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* **39**, 483-496.

Dulubova, I., Lou, X., Lu, J., Huryeva, I., Alam, A., Schneggenburger, R., Sudhof, T. C., & Rizo, J. (2005). A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J.* **24**, 2839-2850.

Fessard, A. (1967). Claude Bernard and the physiology of junctional transmission. In *Claude Bernard and Experimental Medicine*, eds. Grande, F. & Visscher, M. B., pp. 105-124. Schenkman Pub. Co. Inc., Cambridge MA.

Forsythe, I. D. (1994). Direct patch recording from identified presynaptic terminals mediating glutamatergic EPSCs in the rat CNS, in vitro. *J.Physiol* **479 ( Pt 3)**, 381-387.

Gasparini, S., Kasyanov, A. M., Pietrobon, D., Voronin, L. L., & Cherubini, E. (2001). Presynaptic R-type calcium channels contribute to fast excitatory synaptic transmission in the rat hippocampus. *J.Neurosci.* **21**, 8715-8721.

Geiger, J. R. & Jonas, P. (2000). Dynamic control of presynaptic Ca<sup>2+</sup> inflow by fast-inactivating K<sup>+</sup> channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron* **28**, 927-939.

Harris, E. W. & Cotman, C. W. (1986). Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neurosci.Lett.* **70**, 132-137.

Hartley, D. (1749). *Observations on Man, His Frame, His Duty and His Expectations* James Leake and WM Frederick, Bookfellers in Bath, London.

Henze, D. A., Urban, N. N., & Barrionuevo, G. (2000). The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience* **98**, 407-427.

Herlitze, S., Garcia, D. E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1996). Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **380**, 258-262.

Kaesler, P. S., Kwon, H. B., Blundell, J., Chevaleyre, V., Morishita, W., Malenka, R. C., Powell, C. M., Castillo, P. E., & Sudhof, T. C. (2008). RIM1alpha phosphorylation at serine-413 by protein kinase A is not required for presynaptic long-term plasticity or learning. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**, 14680-14685.

Kajikawa, Y., Saitoh, N., & Takahashi, T. (2001). GTP-binding protein beta gamma subunits mediate presynaptic calcium current inhibition by GABA(B) receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 8054-8058.

Kamiya, H. & Ozawa, S. (1999). Dual mechanism for presynaptic modulation by axonal metabotropic glutamate receptor at the mouse mossy fibre-CA3 synapse. *J.Physiol* **518** ( Pt 2), 497-506.

Kamiya, H., Ozawa, S., & Manabe, T. (2002). Kainate receptor-dependent short-term plasticity of presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx at the hippocampal mossy fiber synapses. *J.Neurosci.* **22**, 9237-9243.

Kamiya, H., Shinozaki, H., & Yamamoto, C. (1996). Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 suppresses transmission at rat hippocampal mossy fibre synapses. *J.Physiol* **493** ( Pt 2), 447-455.

Katsuki, H., Kaneko, S., Tajima, A., & Satoh, M. (1991). Separate mechanisms of long-term potentiation in two input systems to CA3 pyramidal neurons of rat hippocampal slices as revealed by the whole-cell patch-clamp technique. *Neurosci.Res.* **12**, 393-402.

Katz, B. & Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J.Physiol* **195**, 481-492.

Klausnitzer, J. & Manahan-Vaughan, D. (2008). Frequency facilitation at mossy fiber-CA3 synapses of freely behaving rats is regulated by adenosine A1 receptors. *J.Neurosci.* **28**, 4836-4840.

Kobayashi, K. & Poo, M. M. (2004). Spike train timing-dependent associative modification of hippocampal CA3 recurrent synapses by mossy fibers. *Neuron* **41**, 445-454.

Kukley, M., Schwan, M., Fredholm, B. B., & Dietrich, D. (2005). The role of extracellular adenosine in regulating mossy fiber synaptic plasticity. *J.Neurosci.* **25**, 2832-2837.

Kwon, H. B. & Castillo, P. E. (2008a). Long-term potentiation selectively expressed by NMDA receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* **57**, 108-120.

Kwon, H. B. & Castillo, P. E. (2008b). Role of glutamate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* **60**, 1082-1094.

Lauri, S. E., Bortolotto, Z. A., Nistico, R., Bleakman, D., Ornstein, P. L., Lodge, D., Isaac, J. T., & Collingridge, G. L. (2003). A role for Ca<sup>2+</sup> stores in kainate receptor-dependent synaptic facilitation and LTP at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* **39**, 327-341.

Lauri, S. E., Delany, C., VR, J. C., Bortolotto, Z. A., Ornstein, P. L., Isaac, T. R., & Collingridge, G. L. (2001). Synaptic activation of a presynaptic kainate receptor facilitates AMPA receptor-mediated synaptic transmission at hippocampal mossy fibre synapses. *Neuropharmacology* **41**, 907-915.

Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2007). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science* **315**, 961-966.

Li, J. Y., Plomann, M., & Brundin, P. (2003). Huntington's disease: a synaptopathy? *Trends Mol.Med.* **9**, 414-420.

Li, L., Bischofberger, J., & Jonas, P. (2007). Differential gating and recruitment of P/Q-, N-, and R-type Ca<sup>2+</sup> channels in hippocampal mossy fiber boutons. *J.Neurosci.* **27**, 13420-13429.

Lin, D. T., Makino, Y., Sharma, K., Hayashi, T., Neve, R., Takamiya, K., & Huganir, R. L. (2009). Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation. *Nat.Neurosci.* **12**, 879-887.

Malenka, R. C. & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**, 5-21.

Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. (1999). Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* **285**, 1870-1874.

Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **262**, 23-81.

Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu.Rev.Neurosci.* **23**, 649-711.

McHugh, T. J., Jones, M. W., Quinn, J. J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J. K., Lowell, B. B., Fanselow, M. S., Wilson, M. A., & Tonegawa, S. (2007). Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science* **317**, 94-99.

Mellor, J. & Nicoll, R. A. (2001). Hippocampal mossy fiber LTP is independent of postsynaptic calcium. *Nat.Neurosci.* **4**, 125-126.

Miyazaki, K., Ishizuka, T., & Yawo, H. (2005). Synapse-to-synapse variation of calcium channel subtype contributions in large mossy fiber terminals of mouse hippocampus. *Neuroscience* **136**, 1003-1014.

Moore, K. A., Nicoll, R. A., & Schmitz, D. (2003). Adenosine gates synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 14397-14402.

More, J. C., Nistico, R., Dolman, N. P., Clarke, V. R., Alt, A. J., Ogden, A. M., Buelens, F. P., Troop, H. M., Kelland, E. E., Pilato, F., Bleakman, D., Bortolotto, Z. A., Collingridge, G. L., & Jane, D. E. (2004). Characterisation of UBP296: a novel, potent and selective kainate receptor antagonist. *Neuropharmacology* **47**, 46-64.

Nakazawa, K., Quirk, M. C., Chitwood, R. A., Watanabe, M., Yeckel, M. F., Sun, L. D., Kato, A., Carr, C. A., Johnston, D., Wilson, M. A., & Tonegawa, S. (2002). Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* **297**, 211-218.

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

Nicoll, R. A., Tomita, S., & Brecht, D. S. (2006). Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors. *Science* **311**, 1253-1256.

Pinheiro, P. S., Perrais, D., Coussen, F., Barhanin, J., Bettler, B., Mann, J. R., Malva, J. O., Heinemann, S. F., & Mulle, C. (2007). GluR7 is an essential subunit of presynaptic kainate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**, 12181-12186.

Ramon y Cajal, S. (1899). *Textura del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados* Moya, Madrid, Spain.

Reid, C. A., Dixon, D. B., Takahashi, M., Bliss, T. V., & Fine, A. (2004). Optical quantal analysis indicates that long-term potentiation at single hippocampal mossy fiber synapses is expressed through increased release probability, recruitment of new release sites, and activation of silent synapses. *J.Neurosci.* **24**, 3618-3626.

Rolls, E. T. & Kesner, R. P. (2006). A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Prog.Neurobiol.* **79**, 1-48.

Rosenmund, C., Sigler, A., Augustin, I., Reim, K., Brose, N., & Rhee, J. S. (2002). Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms. *Neuron* **33**, 411-424.

Sachidhanandam, S., Blanchet, C., Jeantet, Y., Cho, Y. H., & Mulle, C. (2009). Kainate receptors act as conditional amplifiers of spike transmission at hippocampal mossy fiber synapses. *J.Neurosci.* **29**, 5000-5008.

Salin, P. A., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1996a). Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron* **16**, 797-803.

Salin, P. A., Scanziani, M., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1996b). Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 13304-13309.

Schmitz, D., Mellor, J., Frerking, M., & Nicoll, R. A. (2001a). Presynaptic kainate receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 11003-11008.

Schmitz, D., Mellor, J., & Nicoll, R. A. (2001b). Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science* **291**, 1972-1976.

Schoch, S., Castillo, P. E., Jo, T., Mukherjee, K., Geppert, M., Wang, Y., Schmitz, F., Malenka, R. C., & Sudhof, T. C. (2002). RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature* **415**, 321-326.

Schwenk, J., Harmel, N., Zolles, G., Bildl, W., Kulik, A., Heimrich, B., Chisaka, O., Jonas, P., Schulte, U., Fakler, B., & Klocker, N. (2009). Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors. *Science* **323**, 1313-1319.

Scott, R., Lalic, T., Kullmann, D. M., Capogna, M., & Rusakov, D. A. (2008). Target-cell specificity of kainate autoreceptor and Ca<sup>2+</sup>-store-dependent short-term plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *J.Neurosci.* **28**, 13139-13149.

- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298**, 789-791.
- Shen, L., Liang, F., Walensky, L. D., & Huganir, R. L. (2000). Regulation of AMPA receptor GluR1 subunit surface expression by a 4. 1N-linked actin cytoskeletal association. *J.Neurosci.* **20**, 7932-7940.
- Sherrington, C. S. (1906). *Integrative Action of the Nervous System* Yale Univeristy, New Haven.
- Shimizu, H., Fukaya, M., Yamasaki, M., Watanabe, M., Manabe, T., & Kamiya, H. (2008). Use-dependent amplification of presynaptic Ca<sup>2+</sup> signaling by axonal ryanodine receptors at the hippocampal mossy fiber synapse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**, 11998-12003.
- Smolders, I., Bortolotto, Z. A., Clarke, V. R., Warre, R., Khan, G. M., O'Neill, M. J., Ornstein, P. L., Bleakman, D., Ogden, A., Weiss, B., Stables, J. P., Ho, K. H., Ebinger, G., Collingridge, G. L., Lodge, D., & Michotte, Y. (2002). Antagonists of GLU(K5)-containing kainate receptors prevent pilocarpine-induced limbic seizures. *Nat.Neurosci.* **5**, 796-804.
- Takahashi, T., Kajikawa, Y., & Tsujimoto, T. (1998). G-Protein-coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABAB receptor. *J.Neurosci.* **18**, 3138-3146.
- Thomson, A. M. (2003). Presynaptic frequency- and pattern-dependent filtering. *J.Comput.Neurosci.* **15**, 159-202.
- Tong, G., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1996). Long-term potentiation in cultures of single hippocampal granule cells: a presynaptic form of plasticity. *Neuron* **16**, 1147-1157.
- Tottene, A., Volsen, S., & Pietrobon, D. (2000). alpha(1E) subunits form the pore of three cerebellar R-type calcium channels with different pharmacological and permeation properties. *J.Neurosci.* **20**, 171-178.
- Turecek, R. & Trussell, L. O. (2001). Presynaptic glycine receptors enhance transmitter release at a mammalian central synapse. *Nature* **411**, 587-590.
- Urban, N. N., Henze, D. A., & Barrionuevo, G. (2001). Revisiting the role of the hippocampal mossy fiber synapse. *Hippocampus* **11**, 408-417.
- Varoqueaux, F., Sigler, A., Rhee, J. S., Brose, N., Enk, C., Reim, K., & Rosenmund, C. (2002). Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 9037-9042.



Weisskopf, M. G. & Nicoll, R. A. (1995). Presynaptic changes during mossy fibre LTP revealed by NMDA receptor-mediated synaptic responses. *Nature* **376**, 256-259.

Weisskopf, M. G., Zalutsky, R. A., & Nicoll, R. A. (1993). The opioid peptide dynorphin mediates heterosynaptic depression of hippocampal mossy fibre synapses and modulates long-term potentiation. *Nature* **365**, 188.

Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* **313**, 1093-1097.

Wojtowicz, J. M. & Atwood, H. L. (1986). Long-term facilitation alters transmitter releasing properties at the crayfish neuromuscular junction. *J.Neurophysiol.* **55**, 484-498.

Xu-Friedman, M. A. & Regehr, W. G. (2004). Structural contributions to short-term synaptic plasticity. *Physiol Rev.* **84**, 69-85.

Yamakawa, H. & Ohara, O. (2000). Comparison of mRNA and protein levels of four members of the protein 4.1 family: the type II brain 4.1/4.1B/KIAA0987 is the most predominant member of the protein 4.1 family in rat brain. *Gene* **248**, 137-145.

Yeckel, M. F., Kapur, A., & Johnston, D. (1999). Multiple forms of LTP in hippocampal CA3 neurons use a common postsynaptic mechanism. *Nat.Neurosci.* **2**, 625-633.

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

Zalutsky, R. A. & Nicoll, R. A. (1992). Mossy fiber long-term potentiation shows specificity but no apparent cooperativity. *Neurosci.Lett.* **138**, 193-197.

Zucker, R. S. & Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu.Rev.Physiol* **64**, 355-405.

## **6. Danksagung**

Mein spezieller Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dietmar Schmitz für die große Unterstützung meiner Arbeit und für die Schaffung einer großartigen wie auch kreativen Arbeitsatmosphäre. Seine unbegrenzte Begeisterung für die unterschiedlichsten wissenschaftlichen Fragestellungen ist eine stetige Inspirationsquelle.

Bedanke möchte ich mich auch bei Frau Dr. Anja Gundlfinger für die ausgezeichnete Zusammenarbeit in verschiedenen Projekten, sowie Herrn Dr. Sebastian Schuchmann für die feine Bürogemeinschaft. Ihnen beiden verdanke ich vielfältige Anregungen und regen Austausch.

Mein Dank gilt weiterhin auch allen Mitgliedern der AG Schmitz des Neurowissenschaftlichen Forschungszentrums für die besonders kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für Ihre Unterstützung und Ihre Anteilnahme in allen Lebenslagen.

## **7. Eidesstattliche Erklärung**

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

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern<sup>7</sup>Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin den 27.08.2009

Jörg-Michael Breustedt