

**Wirkung des C-Typ natriuretischen Peptides (CNP) auf  
Metaplastizität im Hippokampus:**

**Charakterisierung der Wirkung auf Langzeitpotenzierung  
und Langzeitdepression und der zugrunde liegenden  
cGMP-Signalwege**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von**

**Diplombiologen Jochen Martin Decker  
aus Neunkirchen / Saar**

**Mai, 2008**

1. Gutachter : Prof.Dr. Karl-Heinz Braunewell

2. Gutachter : Prof.Dr. Hans-Joachim Pflüger

Disputation am 12.09.2008 11 Uhr 15

## Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von April 2005 bis April 2008 angefertigt.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Braunewell danken für die Möglichkeit an diesem Projekt in seinen Laboren zu arbeiten und für seinen geduldigen, wissenschaftlichen Rat .

Der gesamten AG Signaltransduktion möchte ich für Tipps und Tricks und für regen Wissensaustausch danken.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Prof. Uwe Heinemann verpflichtet, für die Unterstützung in der Anfertigung der elektrophysiologischen Experimente, die wissenschaftlichen Diskussionen und Hilfestellungen und für die Bereitstellung von Arbeitsmaterialien.

Weiterhin möchte ich Anna Wojtowizs danken für die praktische Anleitung am set-up.

Meiner Familie danke ich für immerwährende Unterstützung und Rückhalt in allen Lebenssituationen.

<b><u>Inhalt</u></b> .....	IV-VII
<b>1. <u>Einleitung</u></b> .....	1-2
<b>2. <u>Literaturübersicht</u></b> .....	3
<b>2.1. Natriuretische Peptide und Guanylylzyklen im Gehirn</b> .....	3
2.1.1. Partikuläre Guanylylzyklen.....	3-4
2.1.2. Struktur, Expression und Lokalisation des C-Typ natriuretischen Peptides und seines Rezeptors.....	4-5
2.1.3. C-Typ natriuretisches Peptid und Lernen und Gedächtnis.....	5-6
2.1.4. cGMP und seine physiologische Wirkung im Hippokampus.....	6-8
<b>2.2. Synaptische Plastizität</b> .....	8
2.2.1. Kurzzeitplastizität.....	8
2.2.2. Paired Pulse Faszilitierung und Depression.....	9
2.2.3. Posttetanische Potenzierung.....	9-10
2.2.4. Funktionen der Kurzzeitplastizität.....	10
2.2.5. Langzeitpotenzierung.....	10-11
2.2.6. Ionotrope Glutamatrezeptoren und Langzeitpotenzierung.....	11-12
2.2.7. Signaltransduktionsmechanismen der Langzeitpotenzierung.....	12-13
2.2.8. Expressionsmechanismen der Langzeitpotenzierung: präsynaptisch versus postsynaptisch.....	13-14
2.2.9. AMPA Rezeptor „Trafficking“ im Hippokampus.....	14-15
2.2.10. NMDAR – abhängige Langzeitdepression.....	15-16
<b>2.3. Fragestellung</b> .....	17
<b>3. <u>Material und Methoden</u></b> .....	18
<b>3.1. Elektrophysiologie</b> .....	18
3.1.1. Versuchstiere.....	18
3.1.2. Anatomie und Zytoarchitektur des Hippokampus.....	18-21
3.1.3. Verschaltung des Hippokampus.....	21-22
3.1.4. Akute, hippokampale Gehirnschnitte.....	23-24
3.1.5. Messkammer.....	25-26
3.1.6. Allgemeines zur Arbeit mit der „Interface“Perfusionskammer.....	26
3.1.7. Reizelektroden.....	26-27
3.1.8. Referenzelektroden.....	27
3.1.9. Extrazelluläre Messelektroden.....	27
3.1.10. Extrazelluläre Feldpotentialmessung.....	27-30

3.1.11. Messung der CA1 Antwort mit verringertem inhibitorischen Input.....	30-31
3.1.12. Reizparadigma für hochfrequente Stimulation.....	31
3.1.13. Reizparadigma für niederfrequente Stimulation.....	31
3.1.14. Eingesetzte Pharmaka.....	32
<b>3.2. Immunocytochemie.....</b>	<b>33</b>
3.2.1. Primäre, dissoziierte, hippokampale Zellkultur.....	33-34
3.2.2. Stimulationsprotokolle.....	34-35
3.2.3. Eingesetzte Pharmaka.....	35
3.2.4. Zweifache Färbung: nicht permeabilisierte Rezeptorenoberflächenfärbung und permeabilisierte präsynaptische Färbung.....	35-36
3.2.5. Zweifache Färbung: permeabilisierte Färbung.....	36
3.2.6. Zweifache Färbung: nicht permeabilisierte Rezeptorenoberflächenfärbung.....	37
<b>3.3. Datenanalyse.....</b>	<b>37-38</b>
3.3.1. Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression.....	37-38
3.3.2. Quantifizierung der prä- und postsynaptischen Immunofluoreszenz.....	38-40

## **4. Ergebnisse**

<b>4.1. Effekte des C-Typ natriuretischen Peptides auf homosynaptische Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression im Hippokampus.....</b>	<b>41</b>
4.1.1. Wirkung des C-Typ natriuretischen Peptides auf die basale synaptische Transmission.....	41-42
4.1.2. Effekt des C-Typ natriuretischen Peptides auf homosynaptische Langzeitpotenzierung in der CA1 Region.....	42-44
4.1.3. Auswirkung des C-Typ natriuretischen Peptides auf den Populationsspike während homosynaptischer Langzeitdepression.....	45
4.1.4. Modulierung des Langzeitdepressions / -potenzierungsschwellenwertes durch C-Typ natriuretisches Peptid.....	46
4.1.5. Das C-Typ natriuretischen Peptides beeinflusst den Feldpotential slope im Stratum Radiatum während homosynaptischer Langzeitpotenzierung.....	47-50
4.1.6. Wirkung des C-Typ natriuretischen Peptides auf den slope des Feldpotentials während homosynaptischer Langzeitdepression.....	50-51

4.1.7. Effekt des C-Typ natriuretischen Peptides auf den Langzeitdepressions / -potenzierungs Schwellenwert des Feldpotential slopes.....	51-52
4.1.8. Analyse der reduzierenden Wirkung von C-Typ natriuretischem Peptid auf die Langzeitpotenzierung des Populationsspikes.....	52-54
<b>4.2. Beitrag inhibitorischer Netzwerke zu dem Effekt von C-Typ natriuretischen Peptid.....</b>	<b>55</b>
4.2.1. Wirkung des C-Typ natriuretischen Peptides auf Langzeitpotenzierung ohne inhibitorischen Input.....	55-57
4.2.2. Beitrag inhibitorischer Netzwerke zu dem Effekt von C-Typ natriuretischen Peptid auf Langzeitdepression.....	57-58
<b>4.3. Wirkung von C-Typ natriuretischen Peptid auf Kurzzeitplastizität .....</b>	<b>59</b>
4.3.1. Analyse der präsynaptischen Komponente.....	59-61
<b>4.4. Kontrolle der Spezifität des C-Typ natriuretischen Peptid Effektes auf Langzeitpotenzierung.....</b>	<b>61-62</b>
<b>4.5. Analyse zellulärer Signalwege, welche möglicherweise an der Wirkung von C-Typ natriuretischem Peptid auf synaptische Plastizität teilhaben.....</b>	<b>62-63</b>
4.5.1. Kontrolle der Qualität der GluR1 Oberflächenfärbung.....	64-65
4.5.2. Kontrolle der Spezifität des GluR1 Antikörpers.....	66-67
4.5.3. Kontrolle der Lokalisation des präsynaptischen Vesikelproteins SynapsinI in primärer, hippokampaler Zellkultur.....	68-70
4.5.4. Kontrolle der Wirkung von Glutamat in hippokampaler Zellkultur.....	70-71
<b>4.6. Wirkung der Stimulation mit C-Typ natriuretischem Peptid in Zellkultur.....</b>	<b>71-72</b>
4.6.1. Quantifizierung des Effektes von C-Typ natriuretischen Peptid auf die GluR1 Oberflächenexpression.....	73-75
4.6.2. Effekt des C-Typ natriuretischen Peptides auf die Anzahl des präsynaptischen Vesikelproteins SynapsinI.....	75-76
4.6.3. Effekt des C-Typ natriuretischen Peptides auf die Kokalisation von SynapsinI mit GluR1.....	77-78

## **5. Diskussion**

<b>5.1. C-Typ natriuretisches Peptid und zelluläre Aspekte des Lernen.....</b>	<b>79-80</b>
5.1.1. C-Typ natriuretisches Peptid moduliert Metaplastizität in CA1.....	80-82

5.1.2. Die Wirkung des C-Typ natriuretischen Peptides auf Langzeitpotenzierung ist spezifisch.....	82
5.1.3. Wirkung von C-Typ natriuretischem Peptid ohne inhibitorische Netzwerkkomponente.....	82-83
5.1.4. Applikation des C-Typ natriuretischen Peptides führt zu einer Modulierung von Kurzzeitplastizität.....	83-84
<b>5.2. Signalwege welche möglicherweise den Effekt von CNP vermitteln.....</b>	<b>84-91</b>
<b>5.3. Mögliche physiologische Funktionen der beobachteten Wirkung des C-Typ natriuretischen Peptides im Hippokampus.....</b>	<b>92-93</b>
<b>6. <u>Zusammenfassung</u>.....</b>	<b>94-95</b>
<b>7. <u>Summary</u>.....</b>	<b>96-97</b>
<b>8. <u>Zitierte Literatur</u>.....</b>	<b>98-116</b>
<b>9. <u>Anhang</u>.....</b>	<b>117</b>
<b>9.1. Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>117</b>
9.1.1. Allgemeine Chemikalien.....	117
9.1.2. Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	118
9.1.3. Allgemeine Materialien für die Zellkultur.....	118
9.1.4. Allgemeine Lösungen.....	119
9.1.5. Primäre Antikörper.....	119
9.1.6. Sekundäre Antikörper.....	120
<b>9.2. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>121</b>
<b>9.3. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>122-123</b>

# **1. Einleitung**

Mobilität und freies Handeln sind an die Fähigkeit zur Perzeption und Adaptation an sich rasch verändernde Umweltbedingungen gebunden.

Dies setzt die Fähigkeit des Nervensystems voraus Informationen zu speichern, um mit Hilfe von diesen Handlungspläne entwerfen zu können. Anders als im Immunsystem ist das Speichern von Informationen im Nervensystem nicht mit der Bildung neuer Zellen verbunden. Im Nervensystem werden die Informationen dezentral, in Form von neuronalen Netzen gespeichert. In diesen Netzwerken können Kopplungseffizienz oder „Gewichtung“ von Verbindungen verändert werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Plastizität. Plastizität ist eine besondere Eigenschaft des zentralen Nervensystems. Sie stellt eine aktivitätsabhängige Modifizierung der synaptischen Transmission an vorhandenen Synapsen dar. Solch eine Modifizierung kann durch einen Lernprozess, ein stressreiches Ereignis oder die Einnahme von psychoaktiven Substanzen ausgelöst werden. Als zelluläres Äquivalent von Lernen und Gedächtnis gelten langanhaltende Veränderungen synaptischer Übertragungseffizienz in Form der Zunahme einer Kopplung als Langzeitpotenzierung (LTP) und in Form einer Abnahme von Kopplung als Langzeitdepression (LTD). Synaptische Plastizität ist wichtig bei Prozessen der Entwicklung des Nervensystems und bei neuropsychiatrischen Störungen, wie Schizophrenie und Suchtkrankheiten.

Streng genommen kann man zwei Arten von neuronaler Plastizität unterscheiden. Eine Modulierung der Erregungsbildung und der Erregungsübertragung und eine langanhaltende Veränderung intrinsischer Eigenschaften von Neuronen und Neuronensembles. Erst kürzlich beschriebene Formen synaptischer Plastizität sind die homöostatische Plastizität (Turrigiano und Nelson 2004) und die Metaplastizität (Abraham und Nelson 1996). Am besten untersucht und deswegen sozusagen die prototypische Form von LTP und LTD sind LTP und LTD in der CA1 Region des Hippokampus. Diese Formen sind N-methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptor abhängige Formen. Spezifische Eigenschaften von LTP ähneln denen von Gedächtnis, zum Beispiel kann LTP schnell generiert werden und durch Wiederholung wird es verstärkt. Außerdem erfüllt es die theoretischen Anforderungen an ein zelluläres Korrelat von Gedächtnis, nämlich Kooperativität, Assozierbarkeit und Input Spezifität (Nicoll et al., 1988).



Neben exterozeptiven Signalen werden mit Hilfe von synaptischer Plastizität auch interozeptive Signale verarbeitet, wobei Peptide eine besondere Rolle als Signalmoleküle spielen. Diese wirken in der Regel über G-Proteine und intrazelluläre Signalkaskaden, vermittelt etwa durch  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP oder  $\text{IP}_3$ . Durch die Entdeckung der NO abhängigen Aktivierung von Guanylylzyklasen wurde in den letzten Jahren insbesondere cGMP als sekundärer Messenger interessant, da er in der Lage ist die Speicherung von Informationen im ZNS zu beeinflussen.

Das natriuretische Peptid CNP und sein Rezeptor, die partikuläre Guanylylzyklase (GC-B), welche cGMP produziert, werden weithin im ZNS exprimiert, wie zum Beispiel im Hippokampus (Minamino et al., 1993; Langub et al., 1995; Herman et al., 1993, 1996). Zusammen mit dem Fakt, dass CNP das meist vorkommende Peptid im humanen Liquor ist, lies dies die Vermutung aufkommen, dass es sich um einen wichtigen Neuromodulator (Komatsu, Y et al., 1991; Herman et al., 1993), beziehungsweise um einen neuroendokrinen Regulator (Fowkes et al., 2000; Di Cicco-Bloom E. et al., 2004) handelt.

Außer der Lokalisation gab es bisher keine Informationen über die physiologische Funktion des Hormonpeptides im Hippokampus.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Wirkung von CNP auf die Metaplastizität in der hippokampalen CA1 Region mit Hinblick auf zugrunde liegende cGMP Signalwege untersucht.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Natriuretische Peptide und Guanylylzyklen im Gehirn**

#### **2.1.1. Partikuläre Guanylylzyklen**

Die Guanylylzyklen (englisch Guanylyl Cyclase; GC) lassen sich in zwei Gruppen zusammenfassen, im Zytosol lösliche (sGC) und partikuläre, membranständige Guanylylzyklen. Beide leiten ihren Namen von ihrer Funktion ab, die Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) zu katalysieren, cGMP kann dann in der Zelle als sekundärer, intrazellulärer Botenstoff Proteinkinasen wie die Proteinkinasen G (PKGI und PKG II oder cGK $\alpha,\beta$  „cGMP-abhängige- Kinase“) aktivieren. Die partikulären Guanylylzyklen (GC-A, GC-B, GC-C) werden durch natriuretische Peptide des A, B oder C Typs (ANP, BNP, CNP) aktiviert, im Gegensatz zu der im Zytosol löslichen GC, die im Gehirn präsynaptisch durch den retrograden, diffusiblen Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert wird. Die GC-A wird von ANP und BNP aktiviert, wohingegen die GC-B nur von CNP aktiviert wird (Potter und Hunter, 2001). Im aktiven Zustand bilden partikuläre GCs Homodimere oder Homotetramere (Wilson und Chinkers, 1995; Simpson et al., 1999). Die Aktivierung von GC-A führt zu Vasodilatation und erhöht Natriuresis und Diuresis (Tremblay et al., 2002). Die bestbeschriebene, physiologische Rolle der GC-B ist die des Knochenwachstums (Bartels et al., 2004). Neben den partikulären Guanylylzyklen werden die natriuretischen Peptide auch vom sogenannten *clearance*-Rezeptor GC-C gebunden. Dieser Rezeptor hat keine funktionale intrazelluläre Kinase-Domäne und dient dazu, ANP, BNP und CNP aus dem Extrazellulärraum zu entfernen (Andreassi et al., 2001; Callahan et al., 2001).

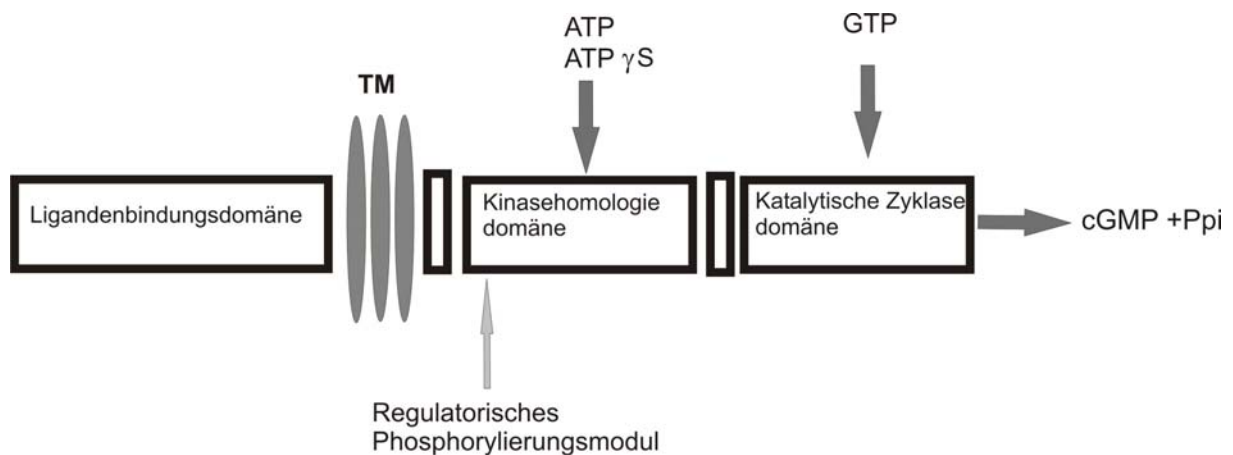


Abbildung 1: schematische Struktur der partikulären Guanylylzyklasen mit Funktionsdomänen. TM= Transmembrandomäne (nach Garbers et al., 2006).

Mitglieder der partikulären GC zeichnen sich strukturell dadurch aus, dass sie eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, eine Transmembran-Domäne (TM), eine Kinase-Homologie-Domäne (KHD) und eine hoch konservierte katalytische Domäne besitzen. Bindet ANP an die extrazelluläre Domäne der GC-A, so wird eine Konformationsänderung der Bindungsdomäne eingeleitet. Diese Konformationsänderung induziert wiederum eine Bindung von ATP an die KHD und bewirkt ihrerseits eine Konformationsänderung der KHD. Nun können die katalytischen Domänen aktive Dimere bilden und cGMP produzieren. Ein ähnlicher Mechanismus wird auch im Falle der GC-B angenommen (Potter und Hunter, 2001). Die GC-A, wie auch die GC-B können nur aktiviert werden, wenn ihre KHD vollständig phosphoryliert ist. Desensitisiert werden diese Rezeptoren durch eine Dephosphorylierung (Potters und Garbers, 1996). Die KHD der GC-B besitzt in ihrem N-Terminalen Bereich fünf Phosphorylierungsstellen, wohingegen die GC-A sechs besitzt (Potter und Garbers, 1998a; Potter und Garbers, 1998b).

### 2.1.2. Struktur, Expression und Lokalisation des C- Typ natriuretischen Peptides und seines Rezeptors

Sowohl hinsichtlich ihrer biochemischen Struktur, als auch in Bezug auf ihre Funktion bilden die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP eine Familie. Die gemeinsamen Merkmale dieser Familie sind ein aus 17 Aminosäuren bestehender Ring, welcher eine Disulfidbrücke enthält. Die unterschiedliche Ausprägung der physiologischen Wirkung und die unterschiedlichen

Rezeptoraktivitäten resultieren aus den verschiedenen langen C- und N-terminalen Seitenketten der einzelnen Peptide. ANP besteht aus 28 Aminosäuren, BNP aus 25 Aminosäuren und CNP aus 24 Aminosäuren. Zwischen dem ANP und CNP bei Mensch, Ratte und Meerschweinchen besteht eine hohe Homogenität im Aufbau. BNP hingegen weist einen größeren Unterschied zwischen den Spezies auf (Michels, Tarnow, 2001). Alle natriuretischen Peptide werden als inaktive Präprohormone gebildet und mittels geeigneter Stimuli in die Zirkulation freigesetzt, wo sie dann durch proteolytische Spaltung in die aktive Form überführt werden.

Die wichtigsten Syntheseorte von CNP sind Endothelzellen, das Gehirn, Knochen und Epithelium (Garbers et al., 2006). Die Hauptexpressionsorte der GC-B sind Fibroblasten, Hippokampus (Gyrus Dentatus) und Knochen.

Die präpro CNP mRNA wird im Gehirn am stärksten im olfaktorischen Nucleus, in limbischen Cortices, im dorsalen endopiriformen Nucleus, den hippocampalen Regionen CA1-3, den anteroventralen Periventriceln und im Nucleus Arcuatus und verschiedenen Hirnstamm Regionen exprimiert (Langub et al., 1995). In anderen *in situ*-Hybridisierungsstudien fand man die mRNA des CNP Rezeptors GC-B im Telencephalon und Neocortex, im olfaktorischen System, als auch im Hippokampus (CA1-CA3, Gyrus Dentatus) und in der Amygdala (Herman et al., 1996). Obwohl die Lokalisation und die Expression der GC-B und ihres Liganden CNP im Gehirn der Ratte gut untersucht sind (Stepan et al., 1999) bleibt die Frage offen, welche spezifischen, physiologischen Funktionen sie in diesen Regionen, insbesondere im Hippokampus, ausüben. In hippocampalen, primären Zellkulturen konnte im Western Blot gezeigt werden, dass die GC-B auch unter Kulturbedingungen in pyramidalen Neuronen exprimiert wird. Im Zellkultursystem zeigte sich weiterhin, dass eine Stimulierung mit 200nM CNP für 20 Minuten fast zu einer Verdoppelung der intrazellulären cGMP Konzentration führte. Wie auch bei anderen neuronalen Rezeptoren führt die Stimulation mit dem Agonisten CNP zu einer Clathrin abhängigen Internalisierung der GC-B (Brackmann et al., 2005).

### **2.1.3. C-Typ natriuretisches Peptid und Lernen und Gedächtnis**

CNP wirkt bei intraventrikulärer Applikation in Dosen von 100 und 200 ng anxiolytisch (Biro et al., 1996) in höheren Konzentrationen jedoch anxiogen (Montkowski et al., 1998). In einem passiven Vermeidungsparadigma führt CNP zu einer dosis-

abhängigen Faszilitierung des passiven Vermeidungslernens, fördert aber den Abruf der gelernten Antwort nicht (Telegdy et al., 1999). Im passiven Vermeidungstest kann CNP die Konsolidierung der Gedächtnisbildung verbessern, wenn es 30 Minuten vor der Lernübung injiziert wird (Telegdy et al., 1999). Die Wirkung von CNP konnte durch dopaminerge, muskarinische und cholinerge Modulatoren, sowie durch NO moduliert werden (Telegdy et al., 1999).

#### **2.1.4. cGMP und seine physiologische Wirkung im Hippokampus**

Am ausführlichsten wurde bisher cGMP als Vermittler NO abhängiger Modulation der Neurotransmission untersucht. Durch Aktivierung von NMDA Rezeptoren und damit verbundenem Kalziumeinstrom kann neuronale NO-Synthase aktiviert werden. Das diffusible Gas erreicht Astrocyten und präsynaptische Terminalen, wo die lösliche Guanylylzyklase aktiviert wird. Der Anstieg von cGMP kann dann den PKG Weg aktivieren (Garthwaite et. al., 1988). Tatsächlich wird die aktivitätsabhängige NO-Freisetzung durch NMDA Rezeptor Antagonisten, wie APV und MK-801, vollständig blockiert. Auch durch Blockade der nNOS mit Hilfe von N-nitro-L-arginine (NNLA) kann die durch NMDA Aktivierung erhöhte cGMP Produktion unterdrückt werden (Haley et al., 1996). Die Stimulierung des NMDA/NO/cGMP Signalweges spielt eine wichtige Rolle in den Phänomenen der Langzeitpotenzierung (LTP) und der Langzeitdepression (LTD), was wiederum eine Involvierung in kognitive Prozesse wie Lernen und Gedächtnis nahe legt (Arancio et al., 1995; Arancio et al., 1996; Stanton et al., 2001; Arancio et al., 2001; von Bohlen und Halbach et al., 2002).

In vielen Strukturen wird angenommen, dass LTP hauptsächlich auf postsynaptischen Veränderungen beruht. Es gibt allerdings immer wieder auch Hinweise, dass bestimmte Formen von LTP auf eine gesteigerte Transmitterfreisetzung zurück zu führen sind (Nicoll, Schmitz, 2005) oder sowohl präsynaptische Transmitterfreisetzung, als auch postsynaptische Rezeptoren an der Expression von LTP beteiligt sind (von Bohlen und Halbach et al., 2002). LTP ist primär ein postsynaptisches Ereignis muss aber auch präsynaptisch durch eine erhöhte Glutamat Freisetzung aufrecht erhalten werden. So ist NO ein möglicher Kandidat als retrogrades Signal zur Aufrechterhaltung der LTP, was in hippokampalen Zellkulturen demonstriert werden konnte (Arancio et al., 1996). NO, cGMP und PKG wirken direkt in präsynaptischen Neuronen (Arancio et al., 1995,

1996, 2001), wo sie einerseits an der vermehrten Freisetzung von Glutamat beteiligt sind, aber auch aktivitätsabhängig das synaptische Vesikel „cycling“ (Micheva et al., 2003; Ninan und Arancio, 2004) fördern. Tatsächlich können Inhibitoren der sGC oder der PKG die Induktion von LTP blockieren, wohingegen die Injektion von cGMP in das präsynaptische Neuron eine aktivitätsabhängige, langanhaltende Potenzierung evozierte, ausgelöst durch erhöhte Transmitterfreisetzung (Wang et al., 1997). Allerdings ist der PKG Weg nicht bei allen Formen von LTP Induktion essentiell, wie es in Knockout Mäusen ohne PKG I und PKG II gezeigt werden konnte (Kleppisch et al., 1999).

Die Rolle des NO/cGMP/PKG Signalweges bei der Induktion von LTD ist hingegen gut etabliert in der Literatur. In hippocampalen Schaffer-Kollateralen - CA1 Synapsen ist der NO/cGMP/PKG Signalweg notwendig um  $Ca^{++}$  aus Ryanodinrezeptor gesteuerten  $Ca^{++}$ -Speichern freizusetzen, was wiederum notwendig zur LTD Induktion ist. Hierbei fungiert cyclic ADP ribose (cADPR) als Signalübermittler von cGMP zu den Ryanodinrezeptoren. Hier konnte *in vitro* gezeigt werden, dass cGMP die cADPR Konzentration erhöht und zu einer Aktivierung der Ryanodinrezeptoren führt (Reyes-Harde et al., 1999).

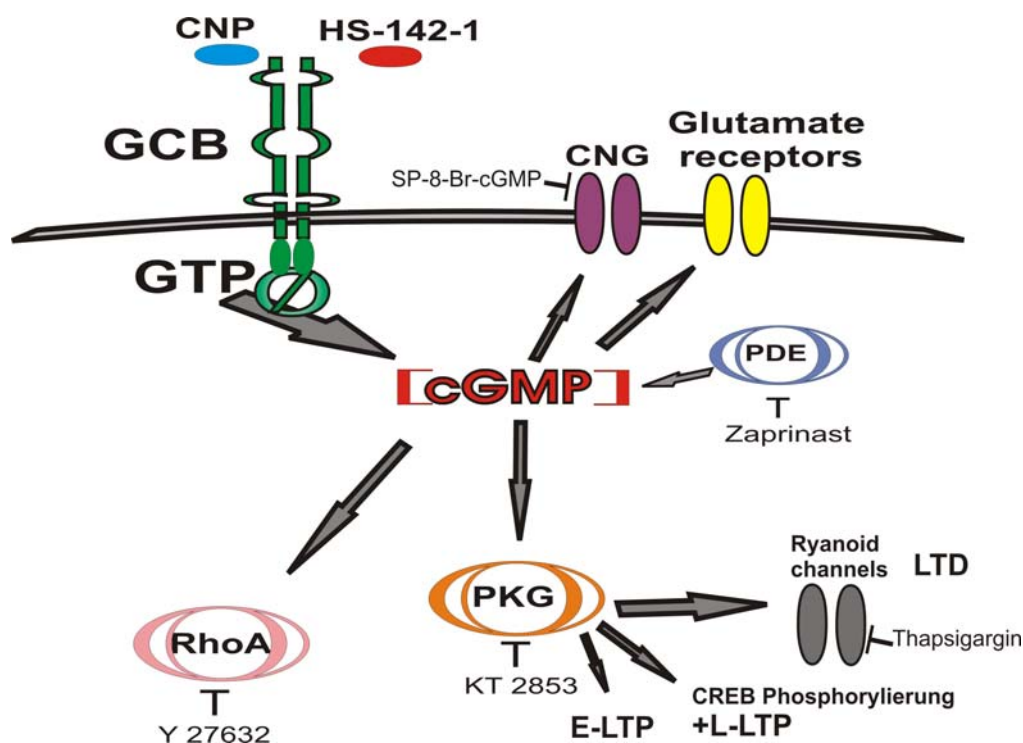


Abbildung 2 : Zusammenfassung der zellulären Signalwege und daraus resultierenden physiologischen Wirkungen von cGMP auf Plastizitätsphänomene. Der natriuretische Peptidrezeptor GC-B ist hier als cGMP produzierendes Enzym dargestellt. Die Wirkungen des second messengers cGMP wurden jedoch anhand des Signalweges mit der löslichen GC gefunden. Dieses Schema soll verdeutlichen in welche bekannten cGMP Signalwege der GC-B Signalweg während synaptischer Plastizität eingreifen könnte.

Angegeben sind außerdem verschiedene Blocker des Signalweges. Zum Einsatz kam in dieser Studie der GC-B Antagonist HS-142-1.  
CNG= cyclic nucleotid gated channels; PDE= Phosphodiesterase (cGMP abbauendes Enzym) ; E-LTP= early LTP ; L-LTP= late LTP.

Der cGMP Signalweg wird durch die Phosphodiesterase (PDE) durch einen negativen feedback Mechanismus reguliert und cGMP wird schließlich durch die PDE hydrolysiert. Unabhängig von dem NO/cGMP/PKG Signalweg kann cGMP aber auch noch andere physiologische Wirkung im Hippokampus ausüben. Der „second messenger“ cGMP kann im Hippokampus durch einen negativen feedback Mechanismus direkt auf AMPA Rezeptoren und damit auf die synaptische Transmission wirken (Lei et al., 2000). Schließlich gibt es die Möglichkeit, dass cGMP auf Ionenkanäle (CNG = cyclic nucleotid gated channels) im Hippokampus wirkt. Es handelt sich hierbei um nicht selektive Kationenkanäle, die den Einstrom von Ca<sup>2+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Ionen regulieren und in der Area CA1 und CA3 des Hippokampus exprimiert werden (Bradley et al., 1997).

## **2.2. Synaptische Plastizität**

### **2.2.1. Kurzzeitplastizität**

Kurzzeitplastizität ist per definitionem durch eine zeitliche Dauer von Millisekunden bis zu Minuten gekennzeichnet. Diese kurzzeitigen synaptischen Veränderungen wurden im gesamten Tierreich, an allen Arten von Synapsen beobachtet (Zucker, Regehr, 2002). Man nimmt an, dass diese Phänomene eine Rolle spielen in Kurzzeitadaptationen auf sensorische Reize und der Bildung des Kurzzeitgedächtnis. Die meisten Formen der Kurzzeitplastizität werden durch eine präsynaptische Erhöhung im intrazellulären Kalziumgehalt ausgelöst, indem die Kalziumextrusion aus der Zelle verlangsamt erfolgt und es deshalb bei repetitiver Reizung zu einer Akkumulation von Kalzium mit vermehrter Mobilisation von Vesikeln vom Zytoskelett und schließlich zu einer vermehrten Ausbildung von Fusionsporen kommt.

### **2.2.2. Paired Pulse Faszilitierung und Depression**

Kommen zwei Stimuli mit geringem Inter-Stimulus Intervall an der Präsynapse an, so wird die postsynaptische Antwort auf den zweiten Stimulus entweder verstärkt (Faszilitierung) oder abgeschwächt (Depression) relativ zu der Antwort auf den ersten Stimulus (Katz und Miledi, 1968; Zucker und Regehr, 2002).

Handelt es sich um Stimuli mit Inter-Stimulus Intervallen von weniger als 20 Millisekunden, so ist an den meisten Synapsen eine Paired Puls Depression zu beobachten. Viele Synapsen erfahren nach Stimuli mit Inter-Stimulus Intervallen von 20 - 500 Millisekunden eine Paired Pulse Faszilitierung. Der Mechanismus der diesem Phänomen zugrunde liegt, könnte die Aktivierung von Proteinkinasen beinhalten, die die Aktivität von präsynaptischer Phosphoproteinen, wie Synapsin, beeinflussen. Beispielsweise zeigen Synapsin Knockout Mäuse (De Camilli et al., 1990) anormale Kurzzeitplastizität (Rosahl et al. 1993; 1995).

Ob eine Synapse eine Paired Pulse Faszilitierung oder eine Paired Pulse Depression erfährt ist abhängig von ihrer individuellen vorhergehenden „Aktivierungsgeschichte“. Die genannten Formen der Plastizität resultieren größtenteils aus der Wahrscheinlichkeit der Transmitterausschüttung ( $p$ ). Synapsen, die ursprünglich eine sehr hohe  $p$  haben, tendieren dazu auf einen zweiten Stimulus mit Depression zu reagieren (Dobrunz and Stevens, 1997). Hingegen tendieren Synapsen mit einer ursprünglich sehr niedrigen  $p$  zur Faszilitierung des zweiten Signals.

### **2.2.3. Posttetanische Potenzierung**

Der Ausdruck Posttetanische Potenzierung (PTP) beschreibt eine Verstärkung in der synaptischen Transmitterausschüttung die von Sekunden bis zu einigen Minuten anhalten kann. PTP kann ausgelöst werden durch hochfrequente, tetanische Stimulationen von 10 - 200Hz über die Dauer von 200ms bis zu 5 Sekunden (Zucker und Regehr, 2002). Auch der PTP unterliegt eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit der Transmitterausschüttung durch eine präsynaptische Erhöhung der Kalziumkonzentration während der tetanischen Stimulation. Diese Erhöhung der Kalziumkonzentration könnte sich aufsummieren und direkt die Transmitterausschüttung erhöhen oder indirekt die biochemischen Kaskaden



beeinflussen, die der Transmitterfreisetzung zugrunde liegen (Magleby und Zengel, 1982; Zucker und Regehr, 2002).

#### **2.2.4. Funktionen der Kurzzeitplastizität**

In Evertibraten wie *Aplysia* in denen das Phänomen der Kurzzeitplastizität entdeckt wurde, konnte man wichtige Funktionen der Kurzzeitplastizität zum Beispiel in Verhaltensweisen, wie dem *fight or flight response* nachweisen (Kandel und Tauc, 1965). Im ZNS von Mammaliern dient Kurzzeitplastizität als wichtiger Modulator der Prozessierung von Information. Synapsen mit einer niedrigen Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit  $p$  dienen als Hochpaß Filter, sie faszilitieren während hochfrequenter Stimulation und gleichzeitig wird niedrigfrequente Transmission an ihnen weniger effizient weitergeleitet. Im Gegensatz dazu werden Synapsen mit einer hohen initialen Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit während einer hochfrequenten Stimulation eine Depression erfahren und gleichzeitig effizient niedrigfrequente Signale weiterleiten. Damit stellen diese einen „Lowpass Filter“ dar (Abbott und Regehr, 2004). Die Filtereigenschaften einer Synapse können also durch die Modulation ihrer initialen Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit angepasst werden. Dies kann prinzipiell über Aufnahme von Transmittern, Vesikelmobilisierung, Vesikelreifung und Modulation der Endozytose geschehen. In solche Prozesse kann wahrscheinlich auch präsynaptisch cAMP (Moore et al., 2003; Nicoll und Schmitz, 2005) oder cGMP eingreifen. Neben cyclischen Nucleotiden können auch Neuropeptide und Neuromodulatoren wie Dopamin und Noradrenalin an präsynaptischer Modulation der Transmitterfreisetzung beteiligt sein (Behr et al., 2000).

#### **2.2.5. Langzeitpotenzierung**

1967 wurde im Labor von Per Andersen erstmals eine langanhaltende, aktivitätsabhängige Veränderung synaptischer Stärke beobachtet (Andersen und Lomo 1967). Anfang der 70er wurde das Phänomen der über Stunden und Tage anhaltenden Veränderung synaptischer Stärke im Hippokampus von Kaninchen beschrieben und als Langzeitpotenzierung (LTP) bezeichnet (Bliss und Gardner-Medwin, 1973; Bliss und Lomo, 1973). Seitdem wurde LTP verstärkt untersucht, da

man weithin annimmt, dass es ein wichtiges Puzzlestück der zellulären Mechanismen darstellt, welche Erinnerungen bilden (Martin et al., 2000; Pastalkova et al., 2006; Whitlock et al., 2006). Im Gehirn existieren, wie man mittlerweile herausgefunden hat, noch viele andere Formen von LTP, in anderen Hirnregionen außer dem Hippokampus. Eine Gemeinsamkeit der LTP induzierbaren Synapsen ist, dass man in ihnen auch eine oder mehrere Formen von LTD (Langzeitdepression) induzieren kann. Dies bezeichnet man auch als bidirektionale Plastizität dieser Synapsen. Darüber hinaus ist mittlerweile klar, dass LTP und LTD eine ganze Klasse von Phänomenen beschreiben, deren zugrunde liegenden Mechanismen abhängig sind von dem jeweiligen Schaltkreis in dem sie auftreten.

### **2.2.6. Ionotrope Glutamatrezeptoren und Langzeitpotenzierung**

Ein großer Fortschritt im Verständnis der zugrunde liegenden synaptischen Mechanismen der Langzeitpotenzierung war die Aufklärung der Rolle der ionotropen Glutamatrezeptoren des NMDA und AMPA Typs. Diese Rezeptoren werden meist in die postsynaptischen Membran der „dendritischen Spines“ inkorporiert. Der Kanal des AMPA Rezeptors ist für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  durchlässig und stellt den größten Anteil an dem exzitatorischen, postsynaptischen Ionenstrom dar, wenn sich das Neuron nahe dem Ruhemembranpotential befindet. NMDA Rezeptoren hingegen sind in starkem Masse spannungsabhängig, da sie bei negativen Membranpotentialen von extrazellulären  $\text{Mg}^{2+}$  Ionen blockiert werden (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Erst wenn die Zelle depolarisiert wird löst sich die  $\text{Mg}^{2+}$  - Blockade des Rezeptors und Kalzium und Natrium kann durch die Pore in die Zelle strömen. Zur Induktion der LTP in der CA1 Region des Hippokampus muss eine postsynaptische Depolarisation erfolgen, Kalzium gelangt, sodann verstärkt in die Zelle und wenn ein gewisse Kalziumkonzentrationsschwelle erreicht wird, werden biochemische Signalwege aktiviert, die LTP induzieren (Malenka, 1991; Malenka und Nicoll, 1993). Weil die Aktivierung des NMDA Rezeptors zur Generierung seines Beitrages zu einer postsynaptischen Antwort beides benötigt, präsynaptische Freisetzung von Glutamat und postsynaptische Depolarisierung, werden NMDA Rezeptoren auch als Koinzidenzrezeptoren bezeichnet. Auch erklären diese Eigenschaften der NMDA Rezeptoren die Grundeigenschaften der LTP. Kooperativität und Assoziativität werden hergestellt, da mehrere Synapsen gleichzeitig benötigt werden, um nach

einer Aktivierung die Zelle genügend zu depolarisieren und schließlich den  $Mg^{2+}$  Block der NMDA Rezeptoren zu dissoziieren. Die Input Spezifität wird gewährleistet, indem die Kalziumkonzentration nur lokal stark erhöht werden kann, nämlich in den dendritischen „spines“ der Postsynapse. Dadurch können keine angrenzenden Synapsen während einer „Inputaktivität“ beeinflusst werden (Nicoll et al., 1988).

### 2.2.7. Signaltransduktionsmechanismen der Langzeitpotenzierung

Es wurden viele verschiedene Kandidatenmoleküle favorisiert, als Signalmoleküle zu fungieren, welche die Induktion der LTP in eine Proteintranslation benötigende „Late-Phase LTP“ übermitteln (Malenka und Bear 2004).

Die Calcium/Calmodulin abhängige Kinase II (CAMKII) erfüllt die Anforderung, die an ein solches „Signalübermittlermolekül“ gestellt werden:

1. die Blockierung dieses Moleküles muss die Blockade der Induzierung der LTP zur Folge haben
2. die Aktivierung des Moleküles sollte die synaptische Transmission verstärken und weitere Induktion von LTP dadurch verhindern

Die CAMKII erfüllt diese Anforderungen. Sie ist autophosphoryliert nach der Induktion von LTP (Barria et al., 1997; Fukunaga et al., 1995). In Knockout Mäusen denen eine kritische CAMKII Untereinheit fehlte (Silva et al., 1992) und in Knock in Mäusen, bei welchen endogene CAMKII durch eine Version ohne die Autophosphorylierungsstelle ersetzt wurde (Giese et al., 1998), konnte LTP Induktion verhindert werden. Nach elektrischer Stimulation eines Neurons gelangt Kalzium in die Zelle. Kalzium bindet an Calmodulin. Der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin Komplex (CAM) kann den PKA Signalweg aktivieren, indem er die Adenylatzyklase stimuliert und damit die Produktion von cAMP (cyclic Adenosin Monophosphat). Daraufhin aktiviert cAMP die cyclic adenosin monophosphat dependent Kinase (PKA). PKA kann dann in den Zellkern gelangen und dort den Transkriptionsfaktor cAMP response element binding protein (CREB) an der Stelle Ser-133 phosphorylieren. Der  $Ca^{2+}$  /CAM Komplex kann CAMKI, CAMKII und CAMKIV direkt aktivieren. CAMKII kann schließlich CREB im Nukleus phosphorylieren (Finkbeiner und Greenberg, 1999) und damit die Transkription beeinflussen. Außerdem gibt es noch eine Reihe anderer Kinase Signalwege, die eine Rolle bei der LTP spielen wie der durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase Erk/Mitogen Signalweg (MAPK) und der Proteinkinase C Signalweg

(für eine Übersicht siehe auch Malenka und Bear, 2004). Im Verlauf der LTP, in der „späten“ Phase, bewirkt der NO/cGMP/PKG Signalweg die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus Ryanodin sensitiven Speichern in der Präsynapse. Dies wiederum führt zu einer Phosphorylierung von cAMP regulatory binding element (CREB) (Lu, et al., 2002).

### **2.2.8. Expressionsmechanismen der Langzeitpotenzierung: präsynaptisch versus postsynaptisch**

Die Frage nach der Expression der LTP stellte die Frage nach Lokalisation. Wird LTP postsynaptisch als eine Veränderung der AMPA Rezeptor Eigenschaften festgelegt oder präsynaptisch als eine Änderung der

Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit? Die präsynaptische Variante der Expression würde einen retrograden Messenger erfordern, als solche worden NO, CO und Arachnidonsäure in Betracht gezogen (für eine Übersicht: Nicoll, 2003).

Mittlerweile hat sich die Meinung durchgesetzt, dass sich der Expressionsmechanismus der LTP an Schaffer Kollateralen - CA1 Synapsen hauptsächlich postsynaptisch abspielt. Der angenommene, zugrunde liegende Mechanismus ist die Zunahme von an der Oberfläche exprimierten AMPA Rezeptoren in der „postsynaptic density“ (PDS), welche durch eine aktivitätsinduzierte Veränderung des „Traffickings“ der Rezeptoren zustande kommt (Bredt and Nicoll, 2003; Derkach et al., 2007; Malenka und Nicoll, 1999; Malinow und Malenka, 2002; Song und Huganir, 2002).

Zu der Beendigung der Debatte um den Ort der LTP Expression in Area CA1 hat die Hypothese der „stillen Synapse“ beigetragen und deren experimentelle Verifizierung. Stille Synapsen zeigen bei einem normalen Ruhemembranpotential keine postsynaptischen Ströme nach einer Glutamatausschüttung. Dies ist ein elektrophysiologischer Befund der darauf hinweist, dass diese Synapsen keine AMPA Rezeptoren in der postsynaptischen Membran enthalten, sondern nur NMDA Rezeptoren (Durand et al. 1996; Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995; Malenka and Nicoll 1997). Während der LTP Induktion entwickeln diese Synapsen exzitatorische, postsynaptische Ströme, welche hypothetisch auf die Inkorporation von AMPA Rezeptoren in die postsynaptische Membran zurückzuführen ist.

Außerhalb der CA1 gibt es im Hippokampus insbesondere an Moosfasersynapsen von dem Gyrus Dentatus zur Area CA3 Hinweise auf eine präsynaptische LTP Expression (Tong et al., 1996; für eine Übersicht: Nicoll, Schmitz, 2005).

### **2.2.9. AMPA Rezeptor „Trafficking“ im Hippokampus**

AMPA Rezeptoren sind Tetramere, die sich aus den Untereinheiten GluR1-4 zusammensetzen. Im adulten Hippokampus herrschen 2 Formen vor, nämlich GluR1/GluR2 und GluR2/GluR3 Heteromere (Wenthold et al., 1996). Ihre elektrophysiologischen Eigenschaften hängen von ihrer Untereinheit Zusammensetzung ab. Aus mehreren Studien mit GFP markierten Untereinheiten geht hervor, dass die Zusammensetzung auch das „Trafficking“ der Rezeptoren reguliert und GluR1 während der LTP in die Synapse integriert wird (Hayashi et al., 2000; Passafaro et al., 2001; Shi et al., 2001). Während „normalem“ Aktivitätszustand an der Synapse ist GluR1 Insertion in die Membran nicht häufig, erst nach Aktivierung von NMDA Rezeptoren beispielsweise unter LTP Bedingungen werden vermehrt GluR1 Untereinheiten enthaltende AMPA Rezeptoren in die Membran integriert. Gleichzeitig wird angenommen, dass GluR2/3 AMPA Rezeptoren konstitutiv, unter basalen Bedingungen, in die Membran eingefügt und wieder endozytiert werden. Die zentrale Rolle der GluR1 Untereinheit während LTP zeigt sich auch in GluR1 -/- Knockout Mäusen, welche in CA3 - CA1 Synapsen keine LTP zeigten (Zamanillo et al., 1999). Weiterhin gibt es Hinweise, dass diese neu in die Membran integrierten AMPA Rezeptoren aus einem „Reservepool“ in dendritischen Endosomen stammen. Während einer HFS werden diese „Reserverezeptoren“ dann über einen Prozess mobilisiert, der das GTP bindende Protein Rab11a benötigt (Park et al., 2004). AMPA Rezeptoren werden nicht direkt in die PSD integriert, sie werden an extrasynaptischen Stellen exozytiert und dann vermittelt lateraler Diffusion in die PSD integriert. In der PSD werden die AMPA Rezeptoren durch sogenannte „slot-Proteine“ verankert. Diese bilden eine Familie von Proteinen, die man auch MAGUKS (membrane associated guanylate kinases) nennt. Diese Familie beinhaltet Mitglieder wie PSD-95, SAP97, PSD-93 und SAP102. Sie haben eine Protein-Protein Bindungsdomäne (PDZ) gemein (Kim und Sheng, 2004; Montgomery et al., 2004). AMPA Rezeptoren binden jedoch nicht direkt an MAGUKs, sondern vermittelt über TARPs (Transmembrane AMPA regulierende Proteine). TARPs sind notwendig, um

die Rezeptoren zur Membran an extrasynaptischen Stellen zu bringen (Chen et al., 2000; Nicoll et al., 2006).

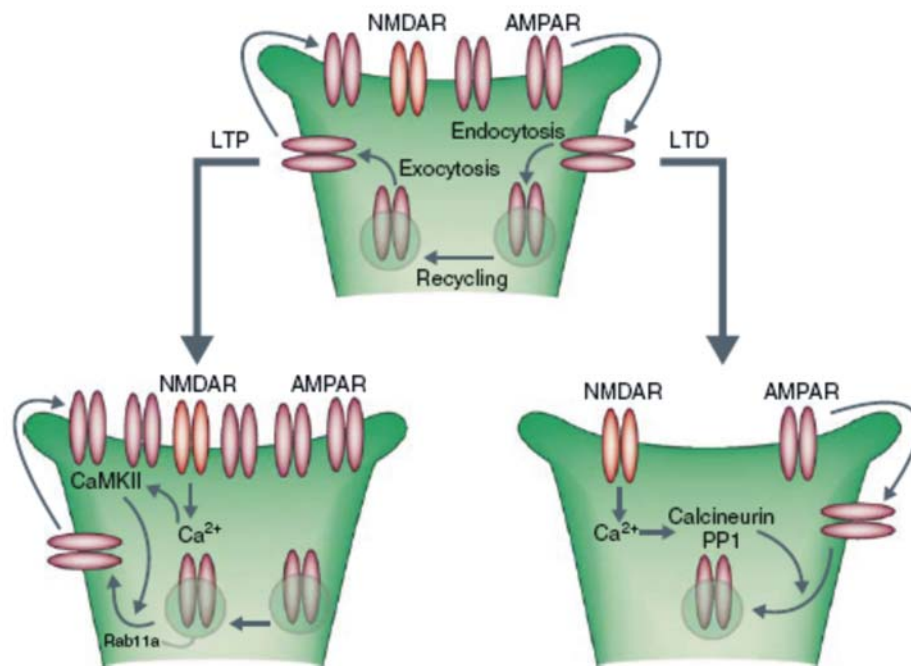


Abbildung 3 : schematische Darstellung des AMPA Rezeptor „Traffickings“ während LTP und LTD (Citric und Malenka., 2008)

Außer der vermuteten Regulation des lateralen Trafficking durch CAMKII (Tsui und Malenka, 2006) hat man eine neue regulatorische Interaktion entdeckt.

Es konnte demonstriert werden, dass die intrazelluläre, C-Terminus Domäne der GluR1 Untereinheit direkt an die durch cGMP aktivierte PKG II bindet. Diese Interaktion erhöht die Oberflächenexpression von AMPA Rezeptoren an extrasynaptischen Stellen. Blockiert man die Interaktion während chemischer LTP in hippocampalen Zellkulturen, so wird die Oberflächenexpression erniedrigt. Die Blockierung der Interaktion im hippocampalen Schnitt verringert die HFS induzierte LTP (Serulle et al., 2007).

### 2.2.10. NMDAR – abhängige Langzeitdepression

Im Hippokampus kann man LTD in der CA1 Region über die Schaffer Kollaterale induzieren (Dudek und Bear 1992). Dies war der Nachweis, dass Aktivität in CA1 Synapsen „bidirektional“ die Stärke synaptischer Verbindungen beeinflussen kann. Wie LTP so ist auch LTD input spezifisch und ist abhängig von einer intrazellulären Erhöhung der  $Ca^{2+}$  - Konzentration durch Aktivierung von NMDA Rezeptoren (Mulkey

und Malenka, 1992). Als „Scheideweg“ der bidirektionalen Plastizität wird die lokale Kalziumkonzentration angesehen. Findet nur eine leichte Erhöhung des postsynaptischen, dendritischen Kalziums statt, so wird LTD induziert (Cummings et al., 1996), erreicht die Kalziumkonzentration eine kritische Schwelle, so wird LTP induziert (Malenka und Nicoll, 1993). Das „differentielle“ Puffern von postsynaptischen, dendritischem Kalzium erlaubte die Überführung von LTD zu LTP (Harney et al., 2006; Nishiyama et al., 2000). Der zugrunde liegende Signalweg, der zu einer LTD führt unterscheidet sich zu LTP Signalwegen dadurch, dass es ein Signalweg ist, welcher Phosphatasen benutzt und nicht Kinasen. Die LTD Signalkaskade besteht aus Kalzium/Calmodulin-abhängiger Phosphatase Calcineurin, PP1 und einem Phosphoprotein, dass auch Inhibitor 1 genannt wird. Postsynaptische Inhibierung dieser Phosphatasen verhinderte eine LTD Induktion (Kirkwood and Bear, 1994; Morishita et al, 2001; Mulkey et al., 1992). Auf die Hypothese zur Expression von LTD durch Endozytose von AMPA Rezeptoren kam man, nachdem man experimentell die Umwandlung von „stillen Synapsen“ zu „aktiven Synapsen“ gesehen hatte (Malenka und Nicoll 1997). Experimentell wurde dann auch gezeigt, dass man in hippokampaler Zellkultur mit Agonisten der Glutamaterezeptoren eine Clathrin und Dynamin abhängige Endozytose von AMPA Rezeptoren induzieren konnte (Lissin et al., 1998; Beattie et al., 2000; Carroll et al., 1999; Ehlers, 2000; Heynen et al., 2000; Lin et al., 2000). Der genaue molekulare Mechanismus, der die Endozytose der AMPA Rezeptoren während LTD auslöst ist noch unbekannt, man hypothetisierte, dass AMPA Rezeptoren aus der PSD heraus dissoziieren, lateral an eine perisynaptische Stelle diffundieren und schließlich dort Clathrin und Dynamin abhängig endozytiert werden (Ashby et al., 2004; Blanpied et al., 2002; Groc et al., 2004).

### **2.3. Fragestellung**

Das natriuretische Peptid CNP und sein cGMP produzierender Rezeptor werden im Hippokampus in der Area CA1 exprimiert. Über die Funktion, die dieses Peptid im Hippokampus ausübt ist nichts bekannt. Die vorliegende Dissertationsschrift behandelt, unter Verwendung von elektrophysiologischen, pharmakologischen und immunozytochemischen Methoden am Hirnschnittpräparat der Ratte und in primärer, hippokampaler Zellkultur, folgende Fragen:

1. Hat CNP einen funktionellen Einfluss auf Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression in der Area CA1 des Hippokampus ?
2. Hat CNP einen Effekt auf Kurzzeitplastizität?
3. Kann CNP aufgrund seiner seiner Funktion im Hippokampus als Neuromodulator beschreiben werden?
4. Welche cGMP Signalwege könnten bei einer möglichen Modulierung synaptischer Plastizitätsphänomene durch das Peptid eine Rolle spielen?



### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Elektrophysiologie**

##### **3.1.1. Versuchstiere**

Für die Präparation von hippokampalen Primärkulturen, sowie für die Anfertigung von akuten Gehirnschnitten wurden ausschließlich Ratten (*Rattus norvegicus*) des Stammes Wistar (Hauszucht und FA Charles River) verwendet.

##### **3.1.2. Anatomie und Zytoarchitektur des Hippokampus**

Die Grundlagen zur anatomischen und funktionellen Untersuchung des Hippokampus legte der spanische Nobelpreisträger Ramón y Cajal und sein Schüler Lorente de Nó (Ramon y Cajal, 1888; De No, 1934).

Cajal benutzte eine Färbemethode, die zuvor Golgi gefunden hatte, die „schwarze Reaktion“ eine „Silbernitratimprägnierungsmethode“ (Jones, 1999). Cajal entwickelte die Methode weiter, indem er das zu färbende Objekt ein zweites Mal „imprägnierte“. Im Gegensatz zu der auch von Golgi vertretenen „Retikulum“ Theorie kumulierte Cajals Arbeit in der Neuronendoktrin.

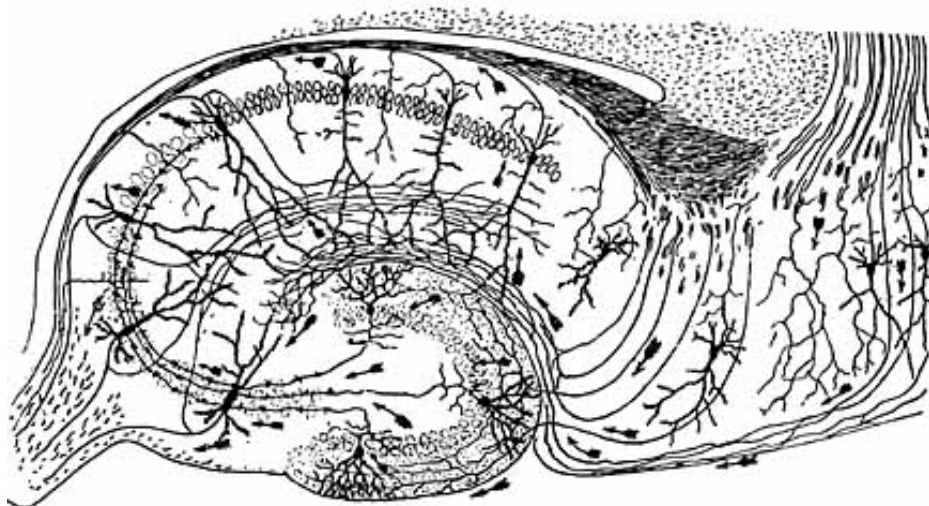


Abbildung 4: Cajals anatomische Zeichnung der zytologischen Struktur des Hippokampus. Pfeile deuten die Richtung der vermuteten Informationsübertragung an (Ramon y Cajal, 1888).

Der Hippokampus stellt eine bilaterale, limbische Struktur dar, die im Querschnitt 2 „C`s“ entspricht. Der kraniale Teil des Hippokampus wird als „dorsaler Hippokampus“ bezeichnet. Er enthält medial den septalen Pol (Abb. 5). Der ventrale Teil des Hippokampus enthält den „temporalen Pol“.

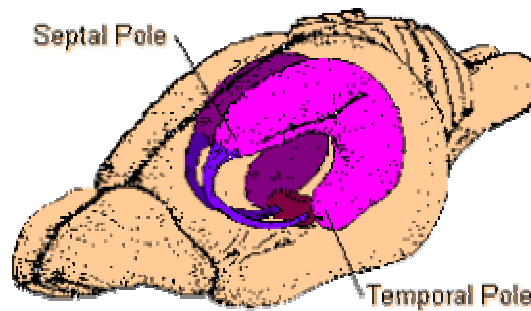


Abbildung 5 : Darstellung eines Rattenhirns mit dem Hippokampus, Fornix und den Corpora Mammillaria (nach Amaral und Witter 1989).

Als Teil des limbischen Systems liegt der Hippokampus im medialen Temporallappen und bildet den sogenannten Archikortex (Lopes da Silva und Witter, 1990).

In C-förmiger Ausbildung zieht er von den septalen Nuklei des basalen Vorderhirns ausgehend über das Diencephalon in dorsorostrale Richtung. Medial wird er vom Thalamus begrenzt, lateral wölbt er sich in die Höhle des Seitenventrikels.

Die interne Struktur des Hippokampus bleibt über seine gesamte Länge gleich.

Ein Querschnitt perpendicular zur Längsachse enthüllt die interne Struktur als zwei ineinander verschlungene C`s. Ein C entspricht der Area Dentata (Gyrus Dentatus) das andere C wird als Ammonshorn (Cornu Ammonis, mit den Regionen CA1-CA4, Hippokampus proper) bezeichnet.

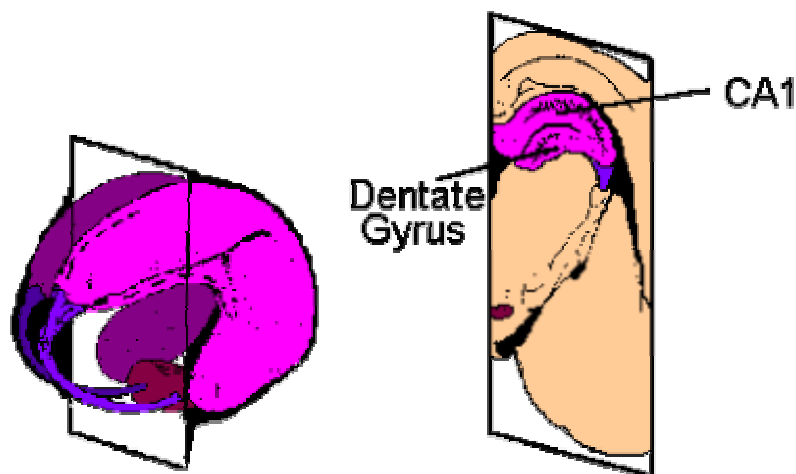


Abbildung 6 : Querschnitt im Bereich des septalen Pols des Hippokampus. In der Querschnittsebene sind die beiden ineinander verschränkten „C´s“ zu erkennen, das Ammonshorn mit der CA1 Region und der Gyrus Dentatus.

Die Hauptzellschicht des Cornu Ammonis ist das Stratum Pyramidale (SP). Die Hauptzellschicht des Gyrus Dentatus ist das Stratum Granulosum. Der Gyrus Dentatus wird gemeinhin als Teil des Hippokampus angesehen, tatsächlich stellt er jedoch zytoarchitektonisch eine eigen Einheit dar (Amaral, 1978; Bayer, 1985; Amaral und Witter, 1989; Witter, 1989). Der Gyrus Dentatus besteht aus drei Schichten. Das Stratum Molekulare liegt über dem Stratum Granulosum und unterhalb der Hilus. Manchmal wird jedoch der Hilus des Gyrus Dentatus, die innere Region des C, bestehend aus granulären Zellen, als Area CA4 bezeichnet. Hier geht die homomorphe Zytoarchitektur aus der CA3 Region in eine polymorphe Zytotextur über. Die Verbindungen des Gyrus Dentatus und der CA Regionen sind schon von Ramon y Cajal klar beschrieben worden. Er zeigte bereits, dass neben der trisynaptischen Schleife (EC-DG; DG-CA3, CA3-CA1; Andersen, 1975) lange wenig beachtete Eingänge vom EC auf die CA1 und CA3 Region konvergieren (Abb. 7). In der Abbildung 4 entspricht die einseitige Projektion der CA1 Zellen zum Fornix nicht mehr dem heutigen Wissen, da die Fasern im Alveus auch das Subiculum erreichen und im Alveus ein Teil des Temporaammonischen Fasertraktes verläuft.

Im Cornu Ammonis beginnen die Zellschichten an der hippokampalen Fissur mit dem Stratum Molekulare, das oftmals zusammen mit dem benachbarten Stratum Lacunosum als Stratum Lacunosum-Molekulare bezeichnet wird. In dieser Zellschicht liegen parallele Fasern und apikale dendritische Endigungen. Das Stratum Radiatum besteht aus zerstreut liegenden Zellkörpern und einigen Fasertrakten, von denen die Schaffer-Kollateralen die bedeutendsten sind. Diese Assoziationsfasern

verbinden die CA3- mit der CA1-Region. Im Stratum Pyramidale liegen die Somata. Das Stratum Oriens, die nächste Zellschicht, besteht aus den basalen Dendriten der Pyramidenzellen und aus den vielgestaltigen Zellkörpern verschiedener inhibitorischer Nervenzellen. Im daran anschließenden Alveus findet man Axone der Pyramidenzellen. Zum Ventrikel hin wird der Hippokampus letztendlich durch die Endothelschicht abgegrenzt.

### **3.1.3. Verschaltung des Hippokampus**

Schneidet man den Hippokampus transvers entlang seiner Längsachse, so zeichnet sich unter anderem die trisynaptische Schleife innerhalb der von der Area Dentata bestimmten lamellaren Organisation des Hippokampus ab.

(Andersen et al., 1966; Swanson, 1978, 1982; Witter, 1989).

Die Afferenzen der Schicht II des Entorhinalen Cortex konvergieren im angulären Bündel und projizieren zu den granulären Zellen des Gyrus Dentatus über den das Subiculum perforierenden Tractus Perforans. Körnerzellen des Gyrus Dentatus wiederum projizieren zu den Pyramidenzellen der CA3 über das Moosfasersystem. Schließlich projizieren die Pyramidenzellen der CA3 Region zu den Pyramidenzellen der CA1 Region über die Schaffer Kollateralen. Dieses Fasersystem aktiviert immer die apikalen Dendriten und weniger die basalen Dendriten (Lorente de No, 1934; Blackstad, 1956, 1958; Amaral, 1978; Bayer, 1985; Amaral und Witter, 1989; Witter, 1989). Der zweite Fasertrakt entspringt den Pyramidenzellen der Schicht III des Entorhinalen Cortex und führt im Tractus Perforans direkt, ohne den „Umweg“ über die Area Dentata zu nehmen, hauptsächlich in das Subiculum und das Stratum Lacunosum-Molekulare der CA1-Region. In der CA1 Region erhalten sowohl distale, apikale Dendriten der Pyramidenzellen als auch Interneurone direkte glutamaterge Afferenzen aus dem Entorhinalen Cortex (Empson und Heinemann 1995). Darüber hinaus finden sich zahlreiche Verbindungen zwischen den einzelnen hippokampalen Regionen, sowie eine große Anzahl von Interneuronen, die entlang beider Achsen der Hippokampusformation modulierende Verbindungen darstellen (Ramón y Cajal, 1911; Steward und Scoville, 1976; Witter et al., 1989).

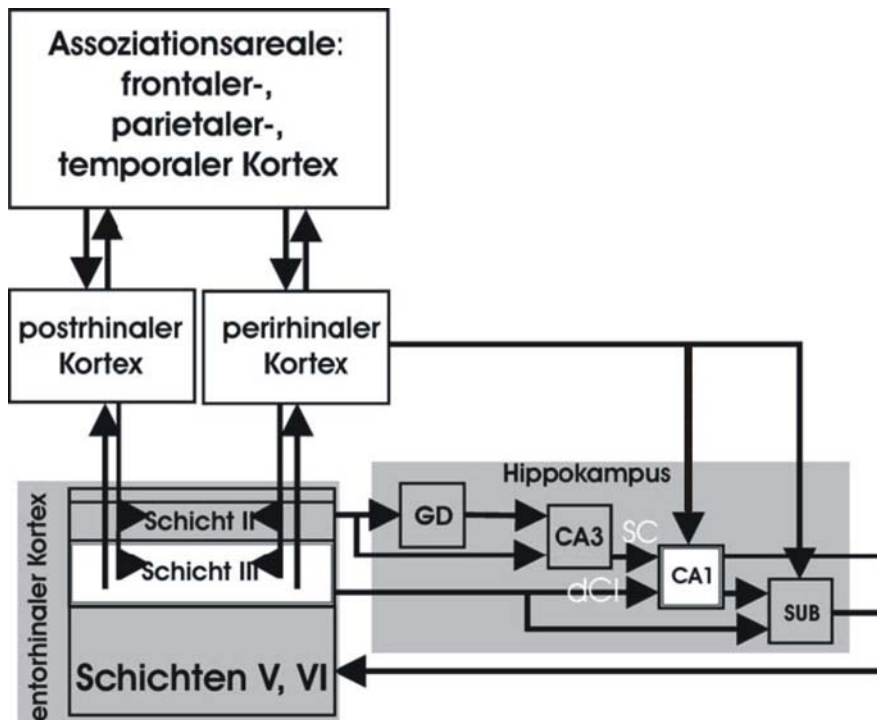


Abbildung 7: Übersichtsdiagramm der Verschaltung des Hippokampus mit anderen Hirnarealen (modifiziert nach Naber et al., 1999). Die durchgezogenen Linien zeigen die experimentell belegten Verbindungen an. Der Hauptinformationsfluß aus den kortikalen Strukturen erfolgt über den post- und perirhinalen Cortex, in denen Informationen aus verschiedenen sensorischen Assoziationskortexen in noch segregierten Feldern verarbeitet werden. Diese projizieren auf die oberflächlichen Schichten des EC (Entorhinaler Cortex) wo sowohl Schicht III und II Zellen aktiviert werden können. Die trisynaptische Schleife wird präferentiell während rhythmischer Aktivität aktiviert (Gloveli et al., 2005).

In den letzten beiden Dekaden wurden die Assoziationsfasern, entlang der septo-temporalen Axe zunehmend beachtet. Diese werden durch Axone der Mosszellen im Hilus, durch Axone der CA3 Pyramidenzellen und durch Axone der OLM Interneurone gebildet (Amaral und Witter, 1989; Witter, 1989, Gloveli et al., 2005). Der Hippokampus hat eine essentielle Funktion bei Lernvorgängen und Gedächtnisbildung und in der neuroendokrinen Regulation von Stresshormonen. Er ist notwendig für die Bildung von deklarativem Gedächtnis beim Menschen (Scoville, und Milner, 1957; Squire und Zola-Morga, 1991) und für die Bildung von räumlichem Gedächtnis bei Ratten (Morris et al., 1982).

### 3.1.4. Akute, hippokampale Gehirnschnitte

Als Nährmedium während der Präparation und der Experimentierphase diente artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid, ACSF), die in folgender Zusammensetzung (in mM) weitestgehend dem Liquor der Ratte entspricht: 129 NaCl, 21 NaHCO<sub>3</sub>, 3 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.6 CaCl<sub>2</sub>, 1.8 MgSO<sub>4</sub>, und 10 Glucose. Die Osmolarität wurde in einem Gefrierpunkt-Osmometer (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) kontrolliert und betrug 300 ± 5 mOsmol/kg. Die Perfusionslösung wurde durch Begasung mit Carbogen aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> gesättigt. Unter Begasung betrug der pH-Wert aufgrund des Bicarbonat-Phosphat-Puffers 7,4 ± 0,5.

Untersuchungen zur Wirkung von CNP auf synaptische Plastizität wurden an akuten Hirnschnitten durchgeführt. Dazu wurden ausgewachsenen, weiblichen Wistar-Ratten aller Zyklusphasen im Alter zwischen 90 und 120 Tagen (180-220g) verwendet. Die Tiere stammten teilweise aus eigener Zucht, sonst wurden sie von „Charles River Laboratories“ in Sulzfeld, Deutschland, gezüchtet. Etwa eine Woche vor den Experimenten wurden die Tiere in die Zentrale Versuchstierhaltung der Charité überführt. Hier wurden sie unter standardisierten Bedingungen, in 12-stündigem Lichtregime, bei freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Alle Tiere wurden in Diethyläthernarkose enthauptet. Mit einem Skalpell wurde die Kopfhaut dorsomedial zerteilt und vom Schädeldach gelöst. Die am Schläfenbein ansetzende Masseterenmuskulatur wurde durchtrennt und die Okzipitalplatte samt Teilen des Kleinhirns mit dem Skalpell abgesetzt.

Die so geschaffene caudale Schädelöffnung erlaubte es die Schädelkalotte nach rostral wegzuklappen, ohne kortikale Strukturen zu verletzen.

Danach wurde mit einer feinen Augenschere die Dura Mater geöffnet und zur Seite hin mit einer Pinzette abgezogen. Das Riechhirn wurde in coronarer Schnitfführung abgesetzt. Das übrige Gehirn wurde dann mit einem gebogenen Spatel an der rostralen Schnittfläche ansetzend vorsichtig aus der Schädelgrube gehoben und anschließend in eisgekühlter, oxygenierter ACSF gewaschen, um Stoffwechselfvorgänge zu verlangsamen und eine Gewebekonsistenz zu erhalten, die die folgenden Arbeitsschritte erleichterte. Das Gehirn wurde dann mit der Hirnbasis auf eine gekühlte Arbeitsfläche gelegt und die Hemisphären mit einer Rasierklinge durch einen medianen Sagittalschnitt vollständig voneinander getrennt. Beide

Hemisphären wurden mit einem feinen Haarpinsel vorsichtig auf die Medianfläche gekippt.

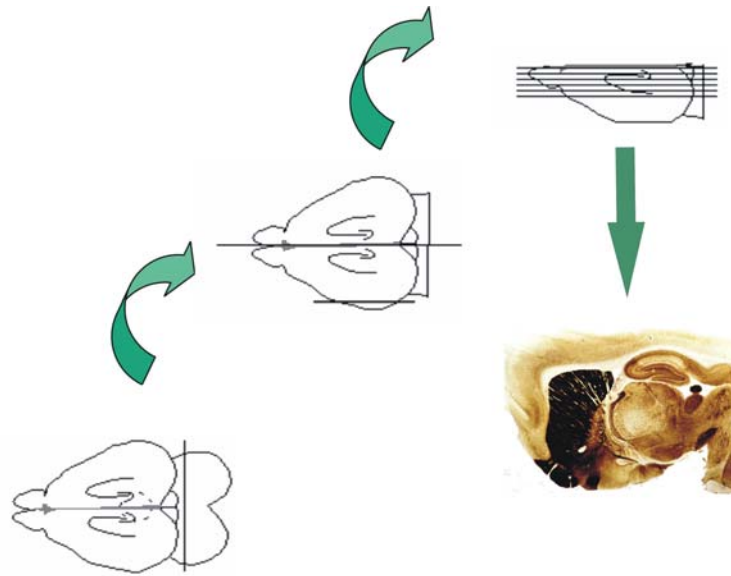


Abbildung 8: Darstellung der Schnittebenen bei der Herstellung hippocampaler Akutschritte.

Die verbliebenen Kleinhirnanteile wurden entfernt und mit einem zum Sulcus Parasyllivus Mediales parallelen Transversalschnitt wurde der parietale Anteil der Hemisphäre abgetrennt. Mit der so entstandenen Fläche wurden die Hemisphären mit Hilfe von Filterpapierstreifen, die gefaltet und wie eine Pinzette benutzt wurden, in die Schneidekammer überführt und auf einen mit Cyanacrylatklebstoff (z.B. UHU-Sekundenkleber®) bedeckten Präparierblock geklebt.

Die Schneidekammer wurde nun mit gekühlter, oxygenierter ACSF gefüllt. Mit einem Vibratom von Campden Instruments (Sileby, UK) wurden in horizontaler Schnitfführung Hirnschnittpräparate mit einer Stärke von 400  $\mu\text{m}$  angefertigt. Diese Hirnschnittpräparate enthielten den Hippocampus, Entorhinalen Cortex, Perirhinalen Cortex und die angrenzenden Anteile des Temporalen Cortex. Aus jeder Hemisphäre konnten etwa 4-5 für die spätere Messung geeignete Schnitte gewonnen werden, die mit einem Haarpinsel und einem kleinen, leicht gebogenen Spatel in die Messkammer transferiert wurden.

### 3.1.5. Messkammer

Die Interface-Messkammer bestand aus Plexiglas und war durch Magnete auf der Metallarbeitsplatte eines erschütterungsgedämpften Tisches fixiert.

Die beiden als Perfusionskammern bezeichneten 25 x 55 mm großen Vertiefungen im Deckel der in hauseigenen Werkstätten hergestellten Interface-Messkammer, dienten sowohl als Mess- als auch als Aufbewahrungskammer. In jeder der beiden von einander getrennten Kammern fanden 4-5 Gehirnschnittpräparate Platz. Sie ruhten in der Mitte der Kammern auf doppellagigem Linsenreinigungspapier der Firma KODAK (Stuttgart, Deutschland), das eine große Diffusionsfläche für die zwischen den Papierfasern entlang laufende ACSF bot. Auf 36°C erwärmte, oxygenierte ACSF wurde mit einer Rollenpumpe der Firma Abimed mit 1,8 ml/min in Polyethylenschläuchen durch eine feine Öffnung in den hinteren Teil der Kammer gepumpt. Die ACSF durchtränkte das Linsenreinigungspapier und verteilte sich so gleichmäßig in der Kammer, bis es im vorderen Bereich der Messkammer passiv abfloss. Feingeflochtene Schnüre aus Kunstfaser wurden so verlegt, dass sie durch ihre Dochtwirkung für einen gleichmäßigen Abfluss sorgten.

Die Interface-Kammer wurde etwa bis zur Hälfte mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) gefüllt. Im unteren Teil befanden sich eine Heizspirale und ein Kunststoffschlauch, durch dessen Öffnungen Carbogengas austreten kann. Im oberen Bereich der Kammer lagen die eigentlichen Messkammern, in denen sich die Hirnschnittpräparate befanden. Über dem Schnitt war ein binokulares Mikroskop angebracht, mit dessen Hilfe die in den Manipulatoren eingespannten Elektroden platziert werden konnten. Da die Messungen unter Interface-Bedingungen stattfanden, wurde der hierfür benötigte hohe Sauerstoffpartialdruck durch Besprudeln des im unteren, beheizten Teil des Kammergehäuses eingefüllten, destillierten Wassers mit Carbogengas aus 95% O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> aufrechterhalten. Das erwärmte, wasserdampfgesättigte Gas wurde dann über Schlitze in die Perfusionskammer über die Oberfläche der Gehirnschnitte geleitet. Die Temperatur in der Perfusionskammer wurde auf ca. 34°C gehalten, indem mittels Thermostat sichergestellt wurde, dass sowohl das eingeleitete Gasmisch als auch die ACSF die gewünschte Temperatur besaßen. Der gesamte Aufbau war von einem Faraday-Käfig umgeben, um Einstrahlungen aus den zahlreichen umgebenden 50-Hz-Stromnetzkaabel zu reduzieren. In der so konstruierten Kammer können die



Stoffwechselfvorgänge der Gehirnschnitt-Präparate aufrechterhalten werden und die Schnitte blieben erfahrungsgemäß etwa 8-10 Stunden lang vital. Allerdings ist es wichtig, dass man LTD - Messungen nur bis zu einer Dauer von 5-6 Stunden *in vitro* vornimmt, wegen dem von Mark F. Bear beschriebenen „Late in the day effect“, welcher sich auf die Ausprägung des LTD auswirkt (Bear M.F., 2003).

### **3.1.6. Allgemeines zur Arbeit mit der „Interface“ Perfusionskammer**

Wichtig für die Vitalität der Hirnschnittpräparate ist es, dass Temperatur, Ernährung, Luftzusammensetzung und Luftfeuchtigkeit auf einem konstanten Niveau gehalten werden. Auch für die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist auf genaue Dokumentation und Einhaltung dieser Faktoren zu achten.

Es ist wichtig, dass sowohl das Flüssigkeitsniveau der ACSF in der Messkammer, als auch das Niveau des destillierten Wassers im unteren Teil der Perfusionskammer gleichbleibend sind. Das Flüssigkeitsniveau in der Messkammer wird durch die Fließgeschwindigkeit der ACSF bestimmt. Diese wird durch die Pumpgeschwindigkeit der Rollenpumpe geregelt, die durch feine Schläuche die ACSF aus den Vorratsbehältern in die Messkammer pumpt. Die pro Zeiteinheit beförderte Flüssigkeitsmenge sollte von Zeit zu Zeit kontrolliert werden, da Materialermüdung, v.a. der Schläuche, die Pumpleistung verändern können. Auch auf eine gleichmäßige Begasung und bestmögliche Abdeckung der Messkammern ist zu achten, um den Sauerstoffpartialdruck und auch die Lufttemperatur und -feuchtigkeit in der direkten Umgebung der Hirnschnitte konstant zu halten. Da die Temperatur auch innerhalb der Messkammer unterschiedlich ist, sollte man immer an derselben Stelle in der Kammer messen und die Temperatur an dieser Stelle auch regelmäßig überprüfen. Nach jedem Versuchstag ist die Kammer gründlich mit Aqua dest. zu reinigen. Alle vier bis sechs Wochen ist eine Spülung mit 3% Wasserstoffperoxid angebracht, wobei darauf zu achten ist, die Kammer danach noch einige Male gründlich mit Aqua dest. zu spülen.

### **3.1.7. Reizelektroden**

Zur Reizgenerierung wurden für diese Arbeit bipolare Reizelektroden selbst gefertigt. Eine Glaskapillare aus Borosilikatglas mit eingezogener Trennwand - ein sogenanntes Thetaglas, mit einem ovalen Durchmesser von 2 x 2,5 mm und einer Wandstärke von 0,2 mm der Firma Science Products aus Hofheim - wurde an einem

vertikalen Elektrodenziehgerät (aus hauseigenen Werkstätten) mit definierter Zugkraft und Geschwindigkeit ausgezogen. Die Doppelspitze der Kapillare wurde auf einen Durchmesser von ca. 0,1 mm zurückgebrochen. In die Kapillarlumina wurden mit 0,2 mm starken Silberdrähten verlötete 0,05 mm starke Platindrähte eingeführt. Die Platindrähte wurden durch die Kapillarspitze geführt und so mit durch Hitze verflüssigtem Schellack verschweißt, dass sie parallel zueinander auf ca. 0,1 mm Abstand fixiert waren. Zuletzt wurden die Silberdrähte auf ca. 1-2 mm gekürzt und Silberdrähte am Ende des Thetaglases mit Dentalwachs verschlossen.

### **3.1.8. Referenzelektroden**

Die Referenzelektroden sind fest in die Interfacekammer eingebaut. Sie bestehen aus unter großem Druck zu Pellets gepresstem Silber und Silberchlorid im Verhältnis 30:70 und sind über einen Silberdraht mit der Erdverbindung im Vorverstärker verbunden.

### **3.1.9. Extrazelluläre Messelektroden**

Für die Feldpotentialaufzeichnung wurden NaCl gefüllte Mikroelektroden (Widerstand 5 -10 M $\Omega$ ) Mikroelektroden verwendet. Wie bei der Herstellung der Reizelektroden wurde eine Glaskapillare mit dem bereits erwähnten Chicago Puller auf eine Spitze von etwa 1  $\mu$ m ausgezogen. Zur Verwendung kamen Borosilikatkapillaren der Firma Science Products aus Hofheim mit 1,5 mm Durchmesser und einer Wandstärke von 0,25 mm, die zwecks Vereinfachung des Füllens mit einem Filament versehen waren. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Kapillarspitzen auf einen Durchmesser von ca. 3  $\mu$ m mechanisch zurückgebrochen. Nachdem die Kapillaren bis zur Hälfte mit 154 mM NaCl-Lösung gefüllt waren, wurden die Spitzen auf eventuell vorhandene Luftblasen überprüft und diese bei Bedarf durch Erwärmen und leichtes Klopfen verdrängt. Zum Schluss wurde ein mit Silberchlorid imprägnierter Silberdraht so weit in die Kapillare eingeführt, dass er die NaCl-Lösung sicher erreicht und mit Dentalwachs fixiert.

### **3.1.10. Extrazelluläre Feldpotentialmessung**

Die Hirnschnittpräparate wurden nach der Präparation in eine Interface-Messkammer überführt, wo sie bis zum Beginn der Messung für eineinhalb Stunde ruhten.

Es wurden dann die Ableitelektroden mit Hilfe eines motorbetriebenen, ferngesteuerten Mikromanipulators (WSE, Bad Waldsee, BRD) unter mikroskopischer Sichtkontrolle (Mikroskop - Carl Zeiss, Jena, BRD) ca. 100  $\mu\text{m}$  tief in der Pyramidenzellschicht und in das Stratum Radiatum des Hirnschnittes positioniert (Abb. 9). Um von einer konstanten Zellanzahl, die zu den aufgezeichneten Signalen beitragen, ausgehen zu können, verblieb jede Elektrode an ihrem ursprünglichen Ort und ihre Position wurde im Laufe der Messung nicht verändert.

Die extrazellulären, elektrischen Potentialänderungen entstehen durch transmembranale Ionenströme, wobei die Potentiale das Ergebnis der Summe transmembranaler Ströme an vielen Zellen sind. Diese Potentialänderungen wurden mit einem Vorverstärker (hauseigene Werkstätten) gemessen. Die Signale wurden nach 10facher Vorverstärkung auf die Empfindlichkeit des Interfaces angepasst, und mit 3 KHz gefiltert. Auf einem Oszilloskop (HAMEG, Mainhausen, BRD) wurden die Signale zur sofortigen Kontrolle dargestellt und nach Umwandlung des analogen Signals in ein digitales auf Festplatte für die spätere Auswertung gespeichert.

Um eine Reizantwort hervorzurufen, wurden die Afferenzen zur Area CA1 (Schaffer-Kollateralen, Kommissurenfasern und Assoziationsfasern) mit einer bipolaren Reizelektrode gereizt, die im Stratum Radiatum platziert wurde. Durch die Aktivierung einer Vielzahl von Zellen, zu denen die gereizten Afferenzen projizieren, kommt es zu einer Summation der Einzelzellantworten. Dieses Summenpotential (Populationsspike, PS) ist stark genug, um registriert zu werden.

Weil durch synaptische Aktivität in den Afferenzen zu CA1 ein Ionenstrom in die Dendriten fließt, sieht man bei der Aufzeichnung im Stratum Radiatum einen transienten Einwärtsstrom der auch „fiber volley“ genannt wird. Dieser resultiert aus dem „volley“ der präsynaptischen Aktionspotentiale. Dem „fiber volley“ folgt ein langsames, negatives Potential mit einem Zeitverlauf, der den zugrunde liegenden exzitatorischen, synaptischen Strom widerspiegelt. Dieses Potential wird auch populations exzitatorisches postsynaptisches potential oder pEPSP genannt.

Der Ionenstrom der während dieses pEPSP in die Dendriten fließt, fließt kurz vor der Zellkörperschicht wieder aus den Dendriten nach außen. So kann man mit einer Ableitelektrode im Stratum Pyramidale während des gleichen synaptischen Ereignisses ein positives Potential registrieren. Reicht die Intensität des synaptischen Input aus, um ein Aktionspotential zu erzeugen, so kann man im Stratum pyramidale ebenfalls ein negatives Potential ableiten (Populationsspike).

Dieser Populationsspike resultiert aus dem Einwärtsstrom während des postsynaptischen Aktionspotentials. Der initiale slope des pEPSP im Stratum Radiatum oder des Populationsspikes im Stratum Pyramidale stellt ein Maß dar, um die Intensität der synaptischen Aktivität abzuschätzen. Die Amplitude des Populationsspikes ist ein Maß für die Anzahl der Neurone, die durch diese synaptische Aktivität den Aktionspotential Schwellenwert erreichen. Die Amplitude des „fiber volley“ ist proportional zur Anzahl präsynaptischer Axone, die durch elektrische Stimulierung aktiviert wurden.

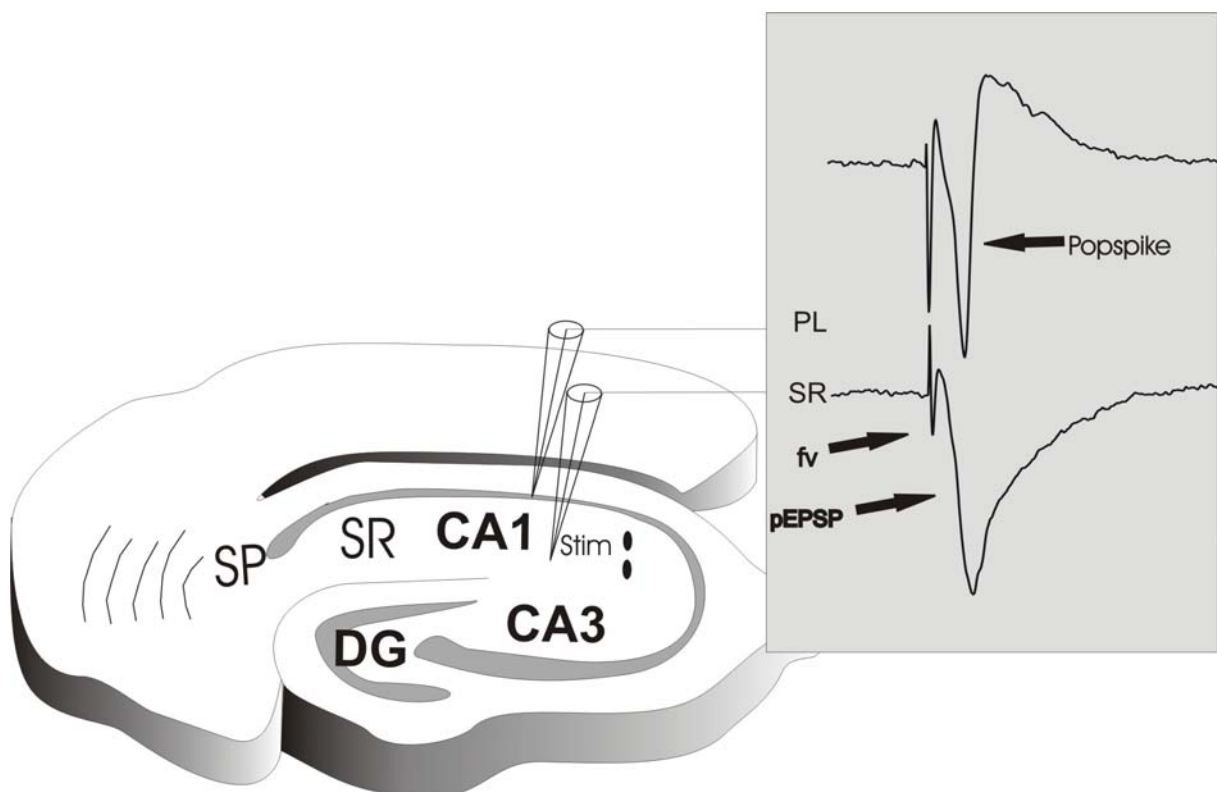


Abbildung 9: Elektrodenpositionierung: schematische Darstellung der Elektrodenpositionierung im hippocampalen Schnitt. Die bipolare Reizelektrode befindet sich im Stratum Radiatum (SR). Die linke Ableitelektrode wurde im Stratum Pyramidale (SP) der CA1 positioniert, um Populationsspikes aufzuzeichnen. Die rechte Ableitelektrode befand sich im SR und registrierte Feldpotentiale. Das Fenster zeigt aufgezeichnete Signale und deren Komponenten. fv= fiber volley; pEPSP= population excitatory postsynaptic potential.

Wie die Messelektroden wurde auch die Reizelektrode in einen Manipulator eingespannt und unter mikroskopischer Kontrolle positioniert. Auch sie durfte im Laufe des Experiments nicht mehr in ihrer Position verändert werden. Angeschlossen war die Reizelektrode an einen von der Erde getrennten Reizstromgenerator, der über den PC gesteuert wurde. Die Reizintensität wurde direkt am Reizgenerator (hauseigene Werkstätten) so eingestellt, dass die Reizimpulse für LTP Messungen 30% und für LTD- Messungen 50% der maximal möglichen Reizantwort lieferten. Mit

zunehmender Reizintensität nahm die Amplitude der Reizantwort zu, bis ein Maximalpunkt erreicht war, von dem aus die Reizantwort entweder nicht mehr größer wurde oder aber sich in ihrer charakteristischen Form veränderte. Dies war meist bei ca. 7-10 V der Fall. 50% der maximalen Reizantwort wurden meist bei ca. 5 V und 30% der Maximalen Reizantwort bei 3 V gemessen. Wurde eine Messung mit einer bestimmten Reizintensität begonnen, so wurde diese Einstellung am Reizstromgenerator nicht mehr verändert, um die Langzeitveränderungen auf eine stets gleiche Reizintensität unverfälscht beobachten zu können. Im Weiteren wird von homosynaptischen Effekten gesprochen werden, wenn sowohl das Reizparadigma zur Induktion von LTP/LTD, als auch der zur Potentialaufzeichnung notwendige Reiz über dieselben Synapsen verschaltet sind. Von heterosynaptischen Effekten spricht man, wenn unterschiedliche Synapsen betroffen sind (Abb.10). In der vorliegenden Arbeit wurde ein homosynaptisches Paradigma zur LTP/LTD Messung verwendet.

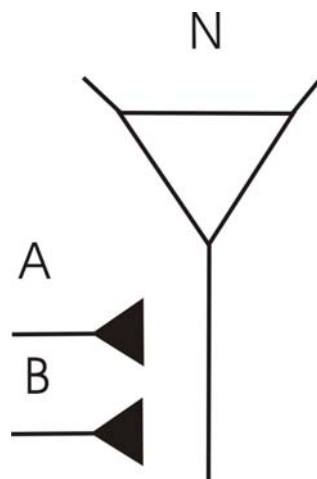


Abbildung 10: Begriffserklärung zu homo- und heterosynaptisch:

Homosynaptisch: Das zur Induktion von LTD / LTP eingesetzte Reizparadigma und der Einzelreiz zur Aufzeichnung der Feldpotentiale erreichen beide das Soma des Neurons (N) beispielsweise über die Affferenz B.

Heterosynaptisch: Das Reizparadigma kommt z.B. über Affferenz B aber der Einzelreiz kommt über eine andere Affferenz, zum Beispiel Affferenz A.

### 3.1.11. Messung der CA1 Antwort mit verringertem inhibitorischen Input

Um den Einfluss von inhibitorischen Netzwerken auf die von CNP vermittelte Wirkung auf synaptische Plastizität zu untersuchen, wurde Area CA3 nach der Präparation dissektiert (Abb.11). Damit wurde der Anteil der „Feed-Forward Hemmung“ von CA3

auf CA1 entfernt. Zusätzlich setzte ich 5  $\mu\text{M}$  Bicucullin im ACSF ein, um  $\text{GABA}_A$  und damit die „Feedback Hemmung“ in CA1 zu vermindern (Empson und Heinemann 1995).

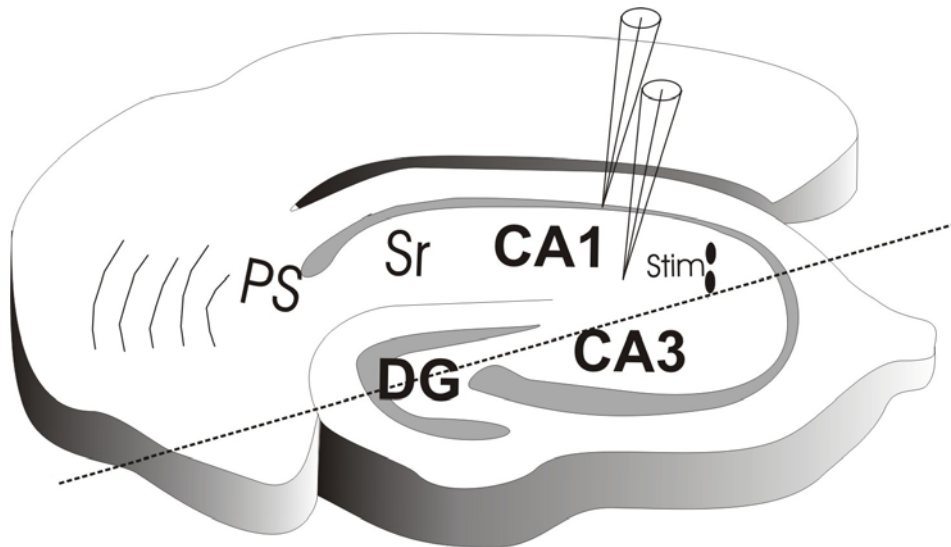


Abbildung 11: Dissektion der CA3 Region und von Teilen des Gyrus Dentatus.

### 3.1.12. Reizparadigma für hochfrequente Stimulation

Zur Induktion von LTP ist eine Reihe verschiedener Tetanus-Frequenzen und -Arten einsetzbar. Tetanus-Frequenzen zur Auslösung von LTP reichen von 0,2 bis 400 Hz (Alger et al., 1976). Meist werden 100 bis 200 Einzelimpulse eingesetzt. Bei Stimulationsfrequenzen unter 50 Hz kann es zu einer vorübergehenden heterosynaptischen Depression kommen (Douglas, 1977; McNaughton et al., 1978), da niederfrequente Reize besser in der Lage sind, gleichzeitig mit den Projektionsfasern inhibitorische Interneurone zu aktivieren. In der vorliegenden Arbeit wurde eine 1 s dauernde tetanische Stimulation mit 10, 30 50 und 100 Hz verwendet.

### 3.1.13. Reizparadigma für niederfrequente Stimulation

Das hier verwendete Reizparadigma bestand aus 900 Einzelimpulsen, die mit einer Frequenz von 1 Hz und 5 Hz über 15 min verabreicht wurden (Low Frequency Stimulation). Es zeigte sich, dass diese Stimulationsart in der Lage ist, sowohl bei jugendlichen als auch bei erwachsenen Ratten, in in-vitro und in in-vivo Experimenten eine langanhaltende, inputspezifische LTD auszulösen (Dudek 1992; Mulkey and Malenka 1992).

### 3.1.14. Eingesetzte Pharmaka

Die zur akuten Badapplikation verwendeten Substanzen wurden wie in der Produktinformation des jeweiligen Herstellers beschrieben aus Trockensubstanzen zu Stammlösungen verarbeitet und in ACSF verdünnt. C-Typ natriuretisches Peptid (CNP, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) wurde mit ACSF auf eine Konzentration von 100 nM verdünnt und eine Stunde vor der Messung in die Interface-Kammer eingewaschen. Der Antagonist der partikulären Guanylylzyklase B (GCB) HS-142-1 wurde in einer Konzentration von 100 µg/mL (Tian und Yang, 2006) eingesetzt und war ein freundliches Geschenk von Dr. Jörg Buttgerit. Bicucullin (Tocris Bioscience Missouri, USA) wurde zur Blockierung der GABA<sub>A</sub> Rezeptoren in einer Endkonzentration von 5 µM eingesetzt.

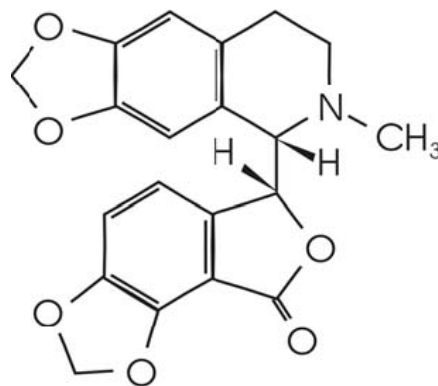


Abbildung 12 : Strukturformel von Bicucullin.

Bicucullin: [R-(R\*,S\*)]-5-(6,8-Dihydro-8-Oxofuro[3,4-e]-1,3-Benzodioxol-6-yl)-5,6,7,8-Tetrahydro-6,6-Dimethyl-1,3-Dioxolo[4,5-g]isoquindinium-Bromid ist ein GABA<sub>A</sub> Rezeptor Antagonist mit der Fähigkeit Ca<sup>2+</sup>-gesteuerte Kaliumkanäle zu blockieren (Khawaled et al.1999).

Bicucullin unterdrückt sowohl präsynaptische, AP-gesteuerte, phasische als auch die im Hintergrund ablaufende tonische GABA<sub>A</sub>-vermittelte Inhibition. Der schnelle, GABA<sub>A</sub> vermittelte Anteil des nach homosynaptischer Reizung sichtbaren, inhibitorischen Potentials wird durch Bicucullin unterdrückt (Empson und Heinemann, 1995).

## 3.2. Immunozytochemie

### 3.2.1 Primäre, dissoziierte, hippokampale Zellkultur

**Poly-D-Lysin:** 100 mg/l in 0,15 M Borsäure, pH 8.4

**Medium 1:** DMEM, 10% Fötale Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2mM Glutamin

**Medium 2:** Neurobasal™, 1 x B27 (Invitrogen), Pen/Strep (Invitrogen) 0,5 mM Glutamin (Invitrogen)

**Trypsin:** 0,1% in HBSS<sup>-</sup>

**DNaseI :**0,01% (200 U) in HBSS<sup>-</sup>, 2,4 mM MgSO<sub>4</sub>

Für die primäre Zellkultur wurden schwangere Wistar Ratten E17-E19 verwendet. Diese wurden wie oben beschrieben von Charles River Sulzfeld angeliefert und verblieben 1-2 Tage im hauseigenen Tierstall. Die Tiere wurden unter kurzer Diethylether Betäubung dekaptiert. Anschließend wurden die Embryonen so schnell wie möglich aus der Bauchhöhle mitsamt dem Uterus entnommen. Ab diesem Arbeitsschritt wurde unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank in einer Zellkultur gearbeitet. Der Uterus wurde mit einer Schere geöffnet und ein Embryo nach dem anderen vorsichtig entnommen. Sodann wurden die Embryos dekaptiert und der Kopf mit Hilfe einer Pinzette aufgehoben und ihn mittels Nadeln fixierte. Dann wurde mit einer feineren Schere ein Schnitt entlang der Linie Hinterhauptsloch-Augen gesetzt. Daraufhin konnte man mit einer Pinzette das Schädeldach vorsichtig beseitigen und das Hirn mit einer zweiten, zur Spitze hin abgerundeten Pinzette aus dem Schädel heben und in die untere Hälfte einer Petrischale geben, die man vorher mit ca. 4 ° Celsius kaltem HBSS<sup>-</sup> aufgefüllt hatte.

In dieser Petrischale wurde nun die Präparation des Hippokampus unter einem binokularem Mikroskop vorgenommen. Mit einer feinen Pinzette hielt man linker Hand den sich in der Entwicklung befindlichen Hirnstamm. Mit einer feinen, abgerundeten Pinzette wiederum zerteilte man vorsichtig median das Corpus Callosum und klappte die Hirnhälften vorsichtig auf. Nun konnte man leicht die das Gehirn umgebende Membran mit einer Pinzette entfernen. Daraufhin wurde mit sanftem, mechanischen Druck der Hippokampus vom Cortex abgelöst und von kortikalen Resten befreit. Nachdem man die Hippokampi in einem 15 ml Röhrchen mit 4 ° C kaltem HBSS<sup>-</sup> gesammelt hatte, wusch man sie 3 mal mit HBSS<sup>-</sup>.



Nach dem dritten Waschvorgang wurden die Hippokampi achtzehn Minuten in einer 0,1 %-igen Trypsin-Lösung bei 37° C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde wieder 3-4 mal mit kaltem HBSS<sup>-</sup> gewaschen. In einer 2 mL Dnase/HBSS<sup>-</sup>-Lösung wurden die Hippokampi anschließend dissoziiert. Zur Dissoziation wurden 2 Kanülen verschiedener Stärke(0,9 mm und 0,45 mm) benutzt. Die Lösung mit den Hippokampi wurde je dreimal, tröpfchenweise durch die Kanülen abnehmender Stärke gedrückt, so dass man eine annähernd homogene Zellsuspension erhielt. Nach dem letzten Dissoziationsvorgang wurde die Zellsuspension durch ein Nylonnetz mit 125 µm Maschenweite gedrückt, um nicht dissoziierte Gewebestücke zurück zu halten.

Mit Medium 1 wurde das Gesamtvolumen auf 15 ml aufgefüllt und die Zellzahl bestimmt. Die Dichte der auszusäenden Zellen richtet sich nach der Art der späteren Anwendung. Für Immunocytochemie Experimente wurde eine Zelldichte von 50-60 Tausend Zellen pro Well ausgesät. Ausplattiert wurden die Zellen in 24-Well Kulturschalen auf mit Poly-D-Lysin vorbeschichteten Glass-Coverslips. Die Glass-Coverslips mussten vor dem Aussäen der Neurone gründlich 3-4 mal mit HBSS<sup>-</sup> gewaschen werden, denn zurückbleibende Poly-D-Lysin Reste wirken zytotoxisch. 24 Stunden nach dem Aussäen in eine 24- Well Kulturschale erfolgte der Mediumwechsel mit serumfreien Medium 2. Weiterhin wurde einmal die Woche ca. 200 µl Medium 2 pro Well hinzugegeben.

### **3.2.2. Stimulationsprotokolle**

Um den Effekt von CNP auf synaptische Plastizität in Hippokampuszellen im Hinblick auf verschiedene cGMP Signalwege einordnen zu können, setzte ich verschiedene Protokolle ein.

1. Eine Glutamat (100 µM)/Glycin (10 µM) Stimulation sollte als Positivkontrolle dienen.
2. Die eingesetzte CNP Konzentrationsreihe betrug 3, 20, 100nM CNP.
3. Applikation verschiedener Konzentrationen (1,10,100 und 500µM) des membranpermeablen cGMP Analogons 8-Br-cGMP
4. Als NO-Donor wurde SNAP (50µM) benutzt

Alle Lösungen wurden in ACSF angesetzt, nachdem in Kontrollexperimenten geklärt wurde, dass die Stimulation sowohl mit in ACSF gelösten Substanzen, als auch mit

im Kulturmedium 2 gelösten Substanzen den selben prä- und postsynaptischen Effekt lieferten. Glutamat/Glycin und 500  $\mu\text{M}$  cGMP wurden jeweils für 5 Minuten appliziert, wohingegen alle anderen Substanzen für 20 Minuten bei 37<sup>0</sup> C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank appliziert wurden.

### 3.2.3. Eingesetzte Pharmaka

Zur Stimulation in der Zellkultur wurde das Zellmembran permeable cGMP Analogon 8-Br-cGMP (Sigma) benutzt.

Als NO-Donor diente S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamin (SNAP, Sigma).

Als Nitrosothiol Derivat setzt SNAP NO unter physiologischen Bedingungen frei und aktiviert spezifisch die lösliche Guanylylzyklen.

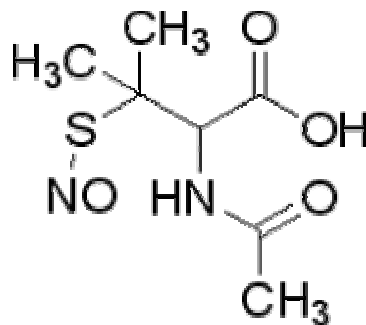


Abbildung 13 : Strukturformel des NO-Donors SNAP.

C-Typ natriuretisches Peptid wurde wie in der Elektrophysiologie zur Aktivierung der partikulären Guanylylzyklase B eingesetzt.

### 3.2.4. Zweifache Färbung: nicht permeabilisierte Rezeptorenoberflächenfärbung und permeabilisierte präsynaptische Färbung

**Fixierlösung:** 2% PFA (Paraformaldehyd) in PBS

**Blockierlösung:** 3% BSA, 5% HS (Horse Serum)

**Mowiol (Mounting-Medium):** 10% Mowiol, 25% Glycerin, 100 mM Tris/HCl, pH 8.5, 2,5% DABCO

Auf Deckgläschen kultivierte hippokampale Neuronen wurden nach Absaugen der Stimulationslösung mit 2 % Paraformaldehyd für 5 Minuten fixierten. Danach wurden

sie 3 mal mit PBS gewaschen und in die untere Hälfte einer mit Parafilm ausgelegten Petrischale überführt. Nun wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit einer Blockierlösung abgedeckt, indem man 200 µL der Lösung für 30 Minuten auf dem Deckgläschen inkubierte. Zuletzt inkubierte man mit dem ersten, monoklonalen Antikörper (anti- Maus) gegen ein N-terminales, extrazelluläres Epitop, der AMPA Rezeptor Untereinheit GluR1 (Santa Cruz) 1:20 in Blockierlösung verdünnt, über Nacht bei 4<sup>0</sup> Celsius.

Am nächsten Tag saugte man die Antikörperlösung ab und wusch 3 mal mit PBS. Im nächsten Schritt wurden die Zellen zur Permeabilisierung mit 0,2% TritonX-100/Blockierlösung für 30 Minuten inkubiert und anschließend 3 mal mit PBS gewaschen. Nun wurden vor dem Inkubieren mit der nächsten Antikörperlösung noch einmal die unspezifischen Bindungsstellen mit Blockierlösung für 30 Minuten abgedeckt. Der darauffolgende erste Antikörper gegen das präsynaptische Vesikelprotein Synapsin I (Sigma) war ein polyklonaler Antikörper gewonnen aus Kaninchen. Er wurde 1:1000 in Blockierlösung verdünnt und die Kulturen wurden mit dieser Antikörperlösung für eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 maligem Waschen konnte man im letzten Schritt die an die Fluorochrom Alexa 488 (Ziege anti-Maus) und Cy 3 (Ziege anti-Kaninchen) gekoppelten zweiten Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung bei Raumtemperatur mindestens 45 Minuten inkubieren. Abschließend wusch man die Antikörperlösung mit PBS von den Zellen und fixierte die Glassplättchen mit einer Zwischenschicht Mowiol auf Glasobjektträgern (Roth). Nach dem gleichen Prozedere wurde eine VGLUT1 (vesikulärer Glutamatttransporter; anti-Meerschwein)-GLUR1(anti-Maus) und eine NR1(anti-Maus)-Synapsin(anti-Kaninchen) Färbung angefertigt.

### **3.2.5. Zweifache Färbung: permeabilisierte Färbung**

Es wurden verschiedene Kontrollfärbungen zur Kontrolle der Lokalisation des präsynaptischen Markers SynapsinI angefertigt:

1. VGlut I (anti-Meerschwein) – SynapsinI (anti-Maus)
2. Synaptophysin (Maus)- SynapsinI (anti-Kaninchen)

Diese Färbungen wurden für beide Antikörper unter permeabilisierenden Bedingungen mit 0,2% Triton X-100 durchgeführt.

### 3.2.6. Zweifache Färbung: nicht permeabilisierte Rezeptorenoberflächenfärbung

Als weitere Kontrollfärbung diente eine Doppelfärbung mit 2 verschiedenen GLUR1 Antikörpern um diese in Ihrem Färbungsmuster und somit ihrer Qualität vergleichen zu können. Diese Färbungen wurden unter nicht permeabilisierenden Bedingungen, ohne Triton X-100 durchgeführt.

## 3.3. Datenanalyse

### 3.3.1. Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression

Die Daten der extrazellulären Messung wurden mit TIDA 3 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) aufgenommen und mit Hilfe von Signal 2 (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, Großbritannien) ausgewertet.

Die Rohdaten wurden mit 10.000 Datenpunkten pro Sekunde erfasst. Mittels eines Skriptes für Signal 2 (von Herrn Dr. Herbert Siegmund programmiert) ließen sich die Parameter Amplitude des Populationsspikes und initialer slope des Feldpotentials vermessen.

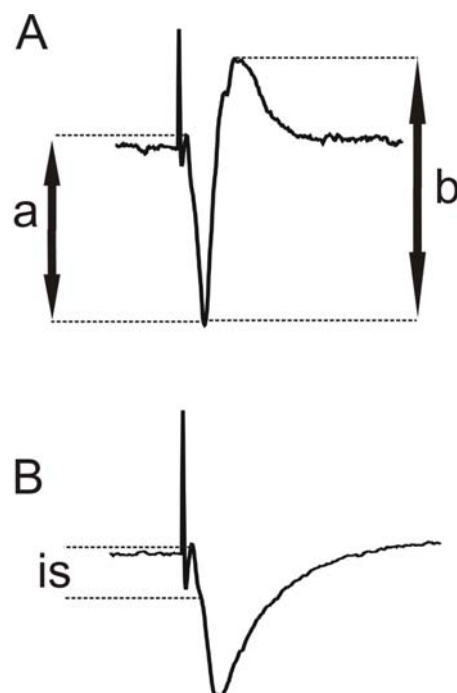


Abbildung 14 : Beispiele für die vermessenen Parameter.

A Amplitude des Populationsspikes im SP:  $a+b / 2$

B initialer slope des Feldpotentials im SR(siehe auch 3.1.11.)

Die initiale, negative Komponente des SR Feldpotentials ( $\Delta V/\Delta t$ ) ist proportional zur Wirkung von Glutamat. Auf Grund der großen interindividuellen Streuung der Amplitudenwerte, wurden die vor der hoch- bzw. niederfrequenten Stimulation erhobenen Werte für jeden Slice gleich 100 % gesetzt und die bei den nachfolgenden Messungen erhobenen Werte in Prozent des jeweiligen Ausgangswertes ausgedrückt.

Die Rohdaten wurden in Excel (Microsoft Corporation, Seattle, USA) 2000/2002 überführt. Dort wurden die Werte in Intervallen von 1 Minute gemittelt.

Zur Darstellung der Daten wurde das arithmetische Mittel errechnet und als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. So bearbeitet wurden sie in Origin 6/7 (OriginLab Corporation, Northhampton USA) als % der Baseline geplottet und der Fehler als Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Bilder und Grafiken wurden mit der Software CorelDraw 11.0 und 12.0 (Corel Co.; Ottawa, Kanada) erstellt. Als statistischer Test zwischen unbehandelten Kontrollschnitten und mit CNP behandelten Schnitten wurde der Student T-test verwendet.

### **3.3.2. Quantifizierung der prä-und postsynaptischen Immunofluoreszenz**

Die angefertigten Präparate wurden mit einem Leica TCS SP5, konfokalen Laser-scanning Mikroskop aufgenommen. Das benutzte Objektiv war ein Leica HCXPI, Apo, 63 x / 1,4-0,6, Oil. Dabei wurde für die Anregung des zweiten Antikörpers Alexa 488 Ziege anti-Maus ein Laser im Bereich von 498-530nm benutzt und für die Antikörper Ziege anti-Kaninchen Cy 3 und Ziege anti-Meerschwein Alexa Fluor 555 ein Laserbereich von 550-670nm.

Es wurde sequentiell mit 400 Hz und einer Auflösung von 1024x1024 Pixel eingelesen. Dabei benutzte ich die pinhole Größe 1 airy und einen 2 x optischen Zoom. Der frame average betrug beim Einlesen 4x. Die angefertigten Bilder wurden weiterverarbeitet in Adobe Photoshop. In diesem Programm wählte ich eine Fläche von 30x10 $\mu$ m aus, um nach dem Zufallsprinzip einen Dendriten des Dendritenbaumes eines pyramidalen Neurons auszuwählen.

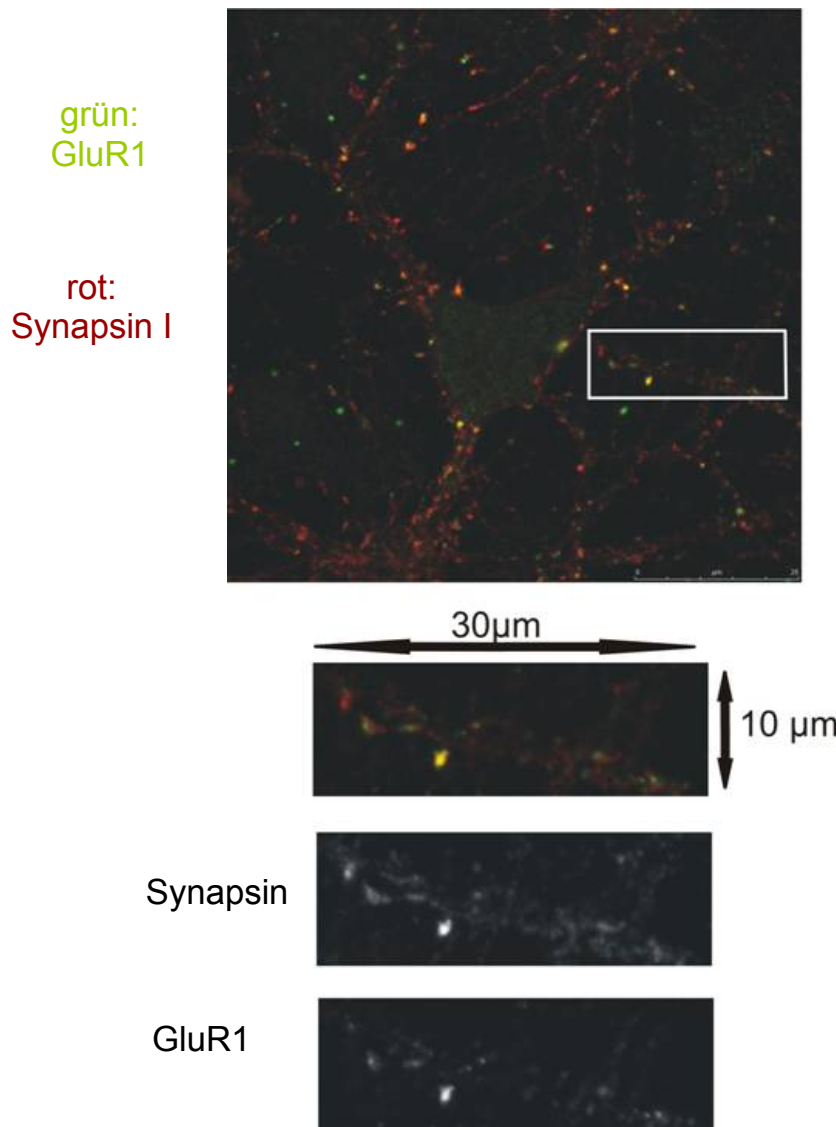


Abbildung 15: Beispiel der Aufbereitung der am konfokalen Laserscanning Mikroskop aufgenommenen Bilder. Gezeigt ist ein pyramidales Neuron aus einer Zellkultur (DIV 17) mit Synapsin I (anti-Kaninchen;rot) und GluR1 (anti-Maus;grün) immunopositiver Reaktion.

Aus dem gezeigten Gesamtbild wurde ein Dendritenausschnitt von 30x10 µm zur weiteren Bildbearbeitung entnommen. Dieser Dendritenausschnitt wurde separat als grüner und als roter Kanal abgespeichert. Diese Rohdaten wurden mit ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) geöffnet. Mit ImageJ wurden die Bilder invertiert und eine einheitliche Signaldetektionsschwelle der Grauwerte festgelegt. Anschließend ließ man das Programm die Signale im Bereich von 5-50 Pixeln Größe automatisch auszählen. Als Kolokalisation wurde die deutliche Überlagerung von rotem und grünem Signal gewertet. Als kolokalisierend wurden prä- und postsynaptische Signale gewertet, wenn in den übereinander gelegten Kanälen mindestens ein gelbes Pixel zu sehen war (Abb.15). Als Einzelexperimente für eine Stimulationsgruppe wurden die einzelnen Präparationen gewertet.

Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet, die nur mit ACSF behandelt wurden. Die ausgezählten Fluoreszenzpunkte der jeweiligen Stimulationsgruppen wurden mit der unstimulierten Kontrollgruppe des jeweiligen Experimentes normalisiert und als % der Kontrolle dargestellt.

Die statistische Signifikanzen der verschiedenen Stimulationsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe wurden als zweiseitiger, ungepaarter T-test dargestellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Effekte des C-Typ natriuretischen Peptides auf homosynaptische Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression im Hippokampus

#### 4.1.1. Wirkung des C-Typ natriuretischen Peptides auf die basale synaptische Transmission

Um zu überprüfen, ob die Badapplikation des Hormonpeptid CNP einen Effekt auf die „normale“, synaptische Transmission in der Area CA1 von hippocampalen Gehirnschnitten hat, wurden 5 Schnitte von 5 Tieren vermessen. Nach 10 minütiger Kontrollperiode wurde das Hormon eine Stunde lang eingewaschen und am Ende der Applikation noch einmal mit Reiz induzierten postsynaptischen Signalen verglichen. Die Reizintensität wurde so eingestellt, dass unter Kontrollbedingungen 30% der maximalen Antwort evoziert wurden.

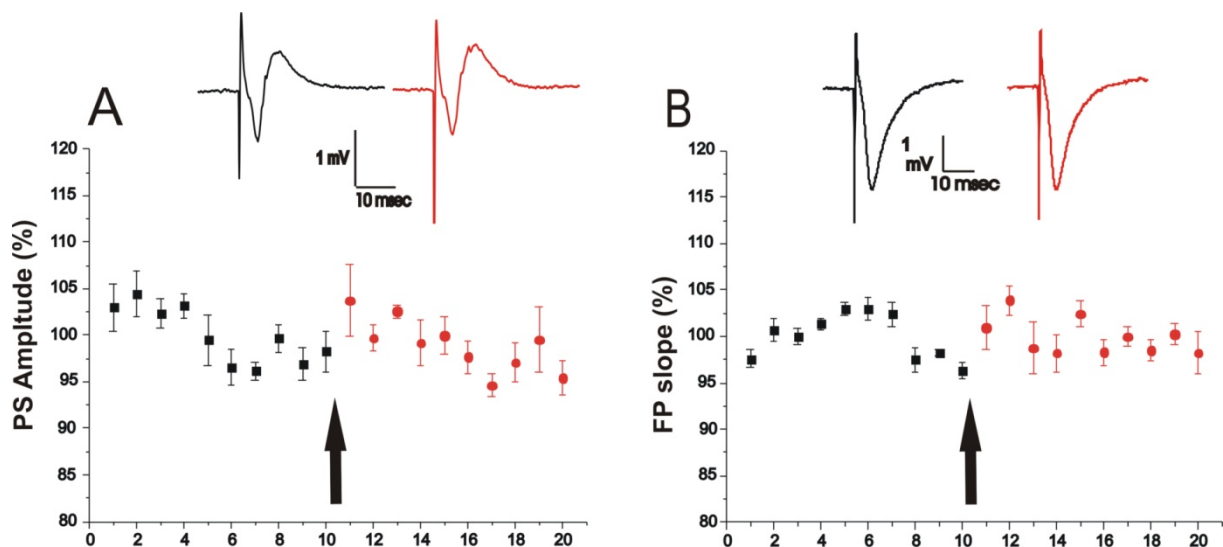


Abbildung 16: Messung des Effektes von CNP auf die basale synaptische Transmission vor (schwarz) und nach (rot) Applikation von 100nM CNP.

Die angegebenen Fehler sind Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Die Pfeile geben den Zeitpunkt an, an dem 100nM CNP für eine Stunde eingewaschen wurde. Die roten Werte wurden nach der CNP Applikation erhoben.

A Effekt auf Einzelreiz evozierte Feldpotentiale im Stratum Pyramidale (SP). Die Messpunkte sind normalisiert auf den Mittelwert der Kontrollperiode.

Inset: Beispielaufnahmen der Populationsspike vor (schwarz) und nach Einwaschen von CNP (rot)

B Effekt auf die basale, synaptische Transmission gemessen im Stratum Radiatum (SR).



Die basale Transmission im Stratum Pyramidale (SP) analysiert als Amplitude des Populationsspikes (PS) war statistisch nicht signifikant (zweiseitiger, gepaarter T-Test;  $p > 0,05$ ) unterschiedlich von derjenigen, gemessen nach einstündigem Einwaschen von 100 nM CNP (Abb.16 A).

Auch die basale Transmission im Stratum Radiatum (SR) ausgedrückt als Feldpotential (FP) slope unterschied sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) von derjenigen gemessen nach einer einstündigen CNP Applikation (Abb. 16 B). Somit hat CNP keine Wirkung auf die basale, synaptische Transmission.

#### **4.1.2. Effekt des C-Typ natriuretischen Peptides auf homosynaptische Langzeitpotenzierung in der CA1 Region**

In akuten, hippocampalen Gehirnschnitten wurde durch Reizung des SR, ein Feld-EPSP überlagert von einem Populationsspike (PS) im SP der CA1 Region evoziert (siehe auch Material und Methoden, Abb.9). Bei 30% der maximalen Signalstärke wurde eine Baseline von 10 Minuten aufgezeichnet. Daraufhin wurde einmalig tetanisch gereizt.

Ein HFS Stimulus mit 100 Hz induzierte in unbehandelten Kontrollschnitten eine über 30 Minuten anhaltende LTP, ausgedrückt als Amplitude des PS. Die Potenzierung der PS Amplitude war gemessen in den letzten 10 Minuten der Aufnahme durchschnittlich  $94 \pm 1,2\%$  über dem Wert der Baseline ( $N = 7$ ; 7 Schnitte von 7 Tieren; Abb. 17 A). Nach dem Einwaschen von 100 nM CNP für eine Stunde war nur eine LTP von durchschnittlich  $57 \pm 4,3\%$  über dem Baselinewert zu verzeichnen ( $N = 5$ ; 5 Schnitte von 5 Tieren; Abb. 17 A). Im ungepaarten, zweiseitigen T-test unterscheiden sich Kontrolle und mit CNP behandelte Schnitt nach der 100 Hz Stimulation signifikant voneinander ( $p < 0,0001$ ).

Nach einer HFS von 50 Hz lag die gemessene LTP im Kontrollschnitt bei  $78 \pm 1,3\%$  über dem Baselinewert ( $N= 7$  Schnitte von 7 Tieren; Abb. 17 B). Nach der Behandlung mit CNP bewirkte eine 50 Hz Stimulation eine durchschnittliche Potenzierung von  $10 \pm 0,9\%$  über dem Baselinewert ( $N= 8$  Schnitte von 7 Tieren). Der Kontrollwert nach der 50 Hz Stimulation unterschied sich wiederum signifikant von der LTP nach Einwaschen des Hormonpeptides ( $p < 0,0001$ ).

Nach 30 Hz Stimulation des SR wurde eine Potenzierung von  $137 \pm 1\%$  der PS Amplitude im SP gemessen (N= 7 Schnitte von 7 Tieren; Abb.17 C). Nach CNP Behandlung hingegen bewirkte eine 30 Hz Stimulation eine Depression der Amplitude um  $18 \pm 0,5\%$  (N= 8 Schnitte von 7 Tieren). Nach einer 30 Hz HFS unterschieden sich Kontrolle und CNP Behandlung signifikant voneinander (zweiseitiger, ungepaarter T-test;  $p < 0,0001$ ), wobei die CNP behandelte Gruppe sich schon im LTD Bereich befand und signifikant reduziert war im Vergleich zur Baseline (zweiseitiger, gepaarter T-test;  $p < 0,0001$ ; getestet an den letzten 10 Minuten der Aufnahmen).

Im letzten HFS Experiment mit einer 10 Hz Frequenz wurde eine nicht signifikante Abnahme der Potentialantworten gegenüber der Baseline beobachtet. Die PS Amplitude nahm auf  $89 \pm 4,6\%$  der Baseline ab (N= 5 Schnitte aus 5 Tieren; Abb.17 D). Das Einwaschen von CNP verstärkte die Depression der Amplitude auf  $54 \pm 1\%$  der Baseline (N= 3 Schnitte von 3 Tieren). Auch hier ist die mit CNP behandelte Gruppe signifikant gegenüber der Baseline reduziert (zweiseitiger, gepaarter T-test,  $p < 0,0001$ ). Somit ergibt ein Einwaschen von 100 nM CNP nach 30 Hz und 10 Hz HFS eine Depression der Amplitude (LTD), wo im unbehandelten Schnitt eine Potenzierung, beziehungsweise eine gegenüber der Baseline unveränderte Amplitude des Populationsspikes zu beobachten ist.

Die Reduzierung der PS Amplitude nach einer HFS durch CNP war am stärksten nach 50 und 30 Hz (Tabelle1).

<b>Stimulation</b>	<b>Kontrolle - 100 nM CNP</b>
100 Hz	37%
50 Hz	68%
30 Hz	55%
10 Hz	35%

Tabelle 1: Übersicht über die reduzierende Wirkung von CNP auf homosynaptische LTP. Der Wert ergibt sich aus dem Mittelwert der Kontrolle minus dem Mittelwert der mit 100nM CNP behandelten Gruppe.

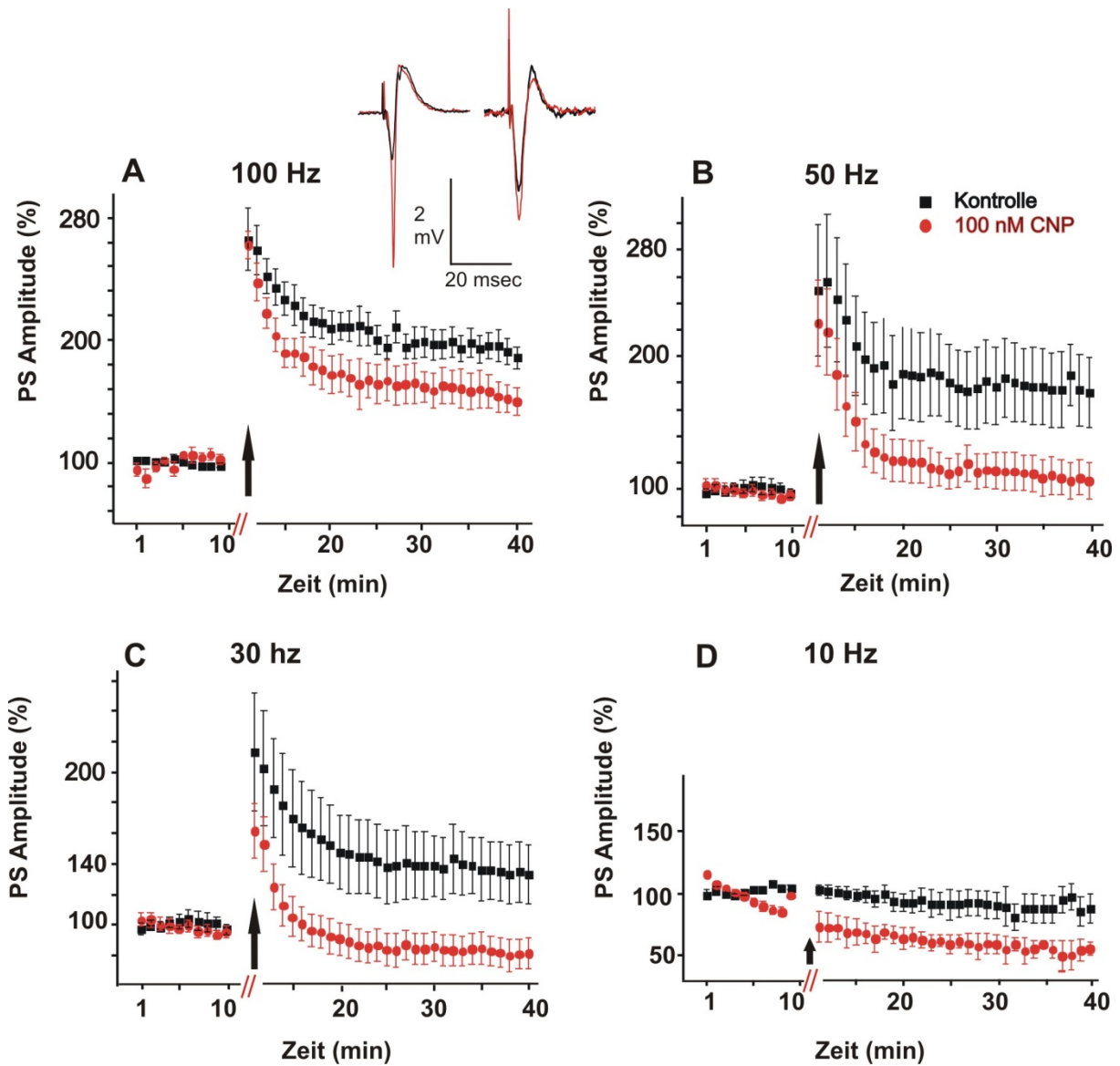


Abbildung 17: Beeinflussung homosynaptischer LTP durch 100 nM CNP in Area CA1. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Der Pfeil bezeichnet den Zeitpunkt der HFS Stimulation. Einzelpulsreize wurden vor und nach der HFS alle 20 Sekunden gegeben. Die Amplitude der Populationsspikes (PS) wurde in den 10 min vor und 30 min nach HFS aufgezeichnet. Die unterbrochene Zeitleiste bezeichnet den Umstand, dass zwischen der Aufnahme der Baseline und der HFS Aufzeichnung nach der Badapplikation von CNP 60 Minuten vergingen.

- A 100 Hz Stimulation im Kontrollschnitt und nach 100 nM CNP Applikation. Das Inset zeigt PS vor (schwarz) und nach HFS (rot). Linker Hand ist eine Kontrollmessung abgebildet und rechts eine Messung nach Applikation von 100 nM CNP
- B 50 Hz Stimulation im Kontrollschnitt und im mit 100 nM CNP behandelten Schnitt
- C 30 Hz Stimulation im Kontrollschnitt und im mit 100 nM CNP behandelten Schnitt
- D 10 Hz Stimulation im Kontrollschnitt und im mit 100 nM CNP behandelten Schnitt

### 4.1.3. Auswirkung des C-Typ natriuretischen Peptides auf den Populationsspike während homosynaptischer Langzeitdepression

Mit der gleichen Elektrodenpositionierung wie in den LTP Messungen (siehe auch Material und Methoden, Abb.9) wurde auch homosynaptische LTD in Area CA1 untersucht. Bei 50% der maximalen Signalstärke wurde eine Baseline von 10 Minuten aufgezeichnet. Daraufhin wurde für 900 s mit einem LFS Stimulus gereizt und für 30 Minuten aufgenommen.

Eine 5 Hz LFS bewirkte im Kontrollschnitt eine LTD von  $80 \pm 1,3\%$  der Baseline (Abb.18 A), 100 nM CNP verstärkten die LTD um 15% auf einen Wert von  $65 \pm 0,6\%$  der Baseline. Im zweiseitigen, ungepaarten T-Test unterscheiden sich Kontrolle und CNP behandelter Schnitt signifikant ( $p < 0,0001$ ).

Stimulierte man mit 1Hz so wurde eine LTD von  $94 \pm 0,3\%$  des Baseline Wertes 30 min nach Ende der LFS beobachtet (Abb.18 B). Das gleiche Protokoll in Gegenwart von 100 nM CNP induzierte eine LTD von  $69 \pm 0,2\%$  des Baselinewertes und somit eine um 25% verstärkte LTD. Auch hier zeigt sich eine statistische Signifikanz der Verstärkung der LTD durch CNP Applikation gegenüber der LTD in unbehandelten Schnitten (zweiseitiger, ungepaarter T-Test  $p < 0,0001$ ).

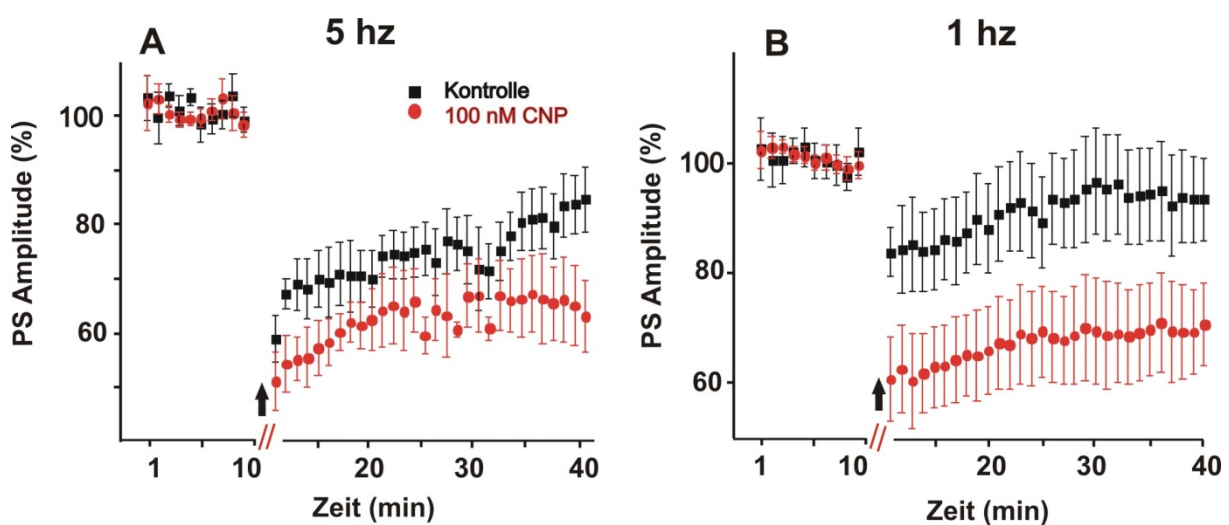


Abbildung 18: Wirkung von CNP auf LTD in CA1: CNP verstärkt homosynaptische LTD der PS Amplitude in CA1.

A 5 Hz Stimulation und erhöhte LTD durch 1 h CNP Applikation.

B 1 Hz Stimulation und verstärkte LTD nach 1h CNP Applikation.

#### 4.1.4. Modulierung des Langzeitdepressions / -potenzierungs-schwellenwertes durch C-Typ natriuretische Peptid

Trägt man die Änderung der PS Amplitude während LTP und LTD als % der Kontrolle über der Frequenz auf, so erhält man eine Kurve, die eine „sliding threshold“ Funktion  $\theta_{LTD/P}$  (Bienenstock, Cooper, Munro, 1982) widerspiegelt (Abb.19 A).

Sie ist Ausdruck der bidirektionalen Plastizität in der CA1 Region des Hippokampus (Dudek, Bear; 1992). Die BCM - Kurve zeigt, dass die Applikation von CNP eine Verschiebung der „Schwellenwertfunktion“ von  $\theta_{LTD/P1} = 15$  Hz nach rechts auf  $\theta_{LTD/P2} = 43,3$  Hz bewirkt und gleichzeitig eine Verstärkung der LTD (Abb. 19 B).

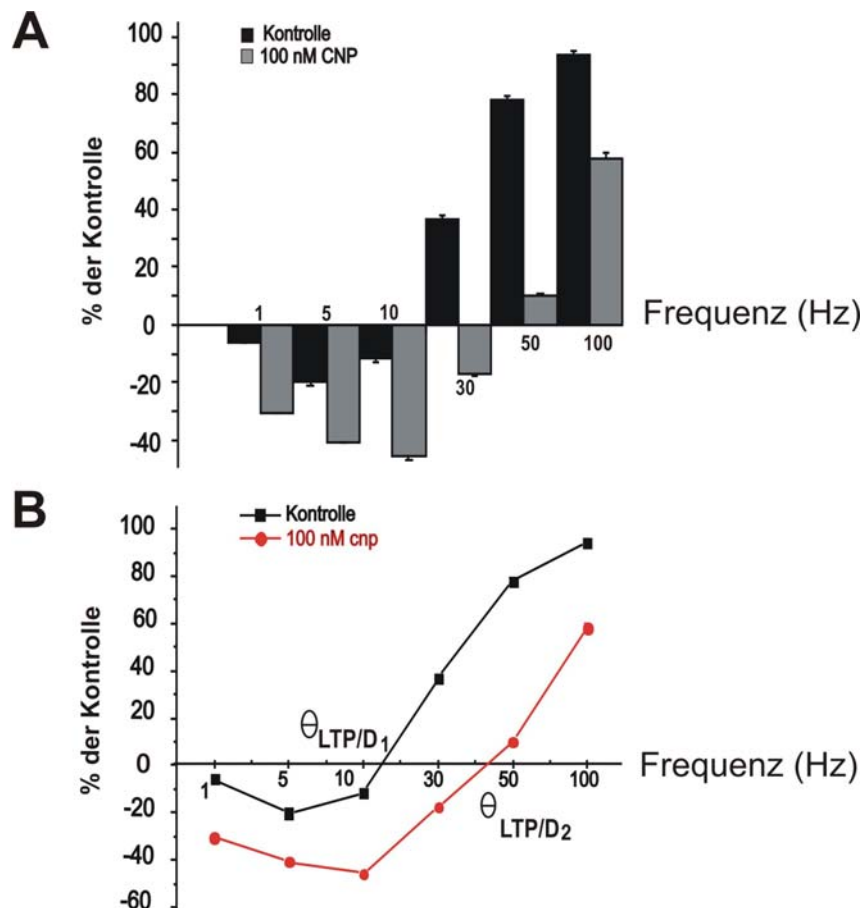


Abbildung 19: Die letzten 10 Minuten der Aufnahmen der verschiedenen HFS Stimulationen aufgetragen als Änderung der PS Amplitude über der Frequenz.

A Balkendiagramm der verschiedenen Frequenzen mit Standardfehler des Mittelwertes.  
 B Auftragung ohne Standardfehler mit Darstellung der „Schwellenwertverschiebung“ durch CNP Applikation  $\theta_{LTD/P2} - \theta_{LTD/P1} = 28,3$  Hz.

#### **4.1.5. Das C-Typ natriuretische Peptide beeinflusst den Feldpotential slope im Stratum Radiatum während homosynaptischer Langzeitpotenzierung**

Als Maß für die Geschwindigkeit der präsynaptische Transmitterfreisetzung wurde der initiale „slope“  $\Delta V/\Delta t$  des Feldpotentials (FP) im SR vermessen.

Da die Messungen simultan mit den Messungen im SP durchgeführt wurden erhielt man dieselbe „Reihe“ von HFS von 100 Hz - 10 Hz.

Eine 100 Hz Stimulation für eine Sekunde führte zu einer stabilen Potenzierung des FP slope Wertes auf  $115 \pm 1,4\%$  (Abb.20A). Dieser im unbehandelten Schnitt gemessene Wert war signifikant höher (zweiseitiger, ungepaarter T-test;  $p < 0,0001$ ) als der Wert im mit CNP behandelten Schnitt ( $97 \pm 0,6\%$ ). Auffällig war, dass nach einer CNP Behandlung und einem 100 Hz HFS, der Fp slope bis zu 3% unter den Baselinewert sinken kann.

Eine 50 Hz Stimulation ergab eine stabile LTP, wobei der durchschnittliche Wert der Potenzierung des FP slopes  $143 \pm 1\%$  betrug (Abb.20 B). Auch hier bewirkte die CNP Applikation eine Reduzierung der LTP auf  $85 \pm 2\%$  der Baseline und befand sich somit im LTD Bereich. Diese Reduktion war statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ) gegenüber der Kontrolle. Auch gegenüber der Baseline war eine 50 Hz Stimulation mit CNP statistisch signifikant reduziert (zweiseitiger, gepaarter T-test;  $p < 0,0001$ ).

Ein ähnliches Bild wie nach der 50 Hz Stimulation zeigte sich nach einer 30 Hz Stimulation. Im Kontrollexperiment wurde der FP slope auf durchschnittlich  $118 \pm 1,6\%$  potenziert (Abb. 20 C). Wiederum rief ein CNP Badapplikation eine Reduzierung der Potenzierung hervor ( $83 \pm 0,8\%$ ), welche gegenüber der Kontroll-LTP signifikant war (zweiseitiger, ungepaarter T-test;  $p < 0,0001$ ). Außerdem war der durch 30 Hz hervorgerufene Fp slope in der Gruppe der CNP behandelten Schnitte signifikant kleiner als der der Baseline (zweiseitiger, gepaarter T-test;  $p < 0,0001$ ).

Vergleichbar mit der Analyse der Amplitude des Populationsspikes (Abb. 17 D) lieferte eine Stimulation von 10 Hz eine geringe Potenzierung ( $110 \pm 0,8\%$ ; Abb. 20D). Nach einstündiger CNP Applikation evozierte eine 10 Hz Stimulierung einen Fp

slope, der gegenüber der Baseline um 16% reduziert war ( $84 \pm 2\%$  der Baseline; Abb. D). Sowohl die Reduzierung der Potenzierung des FP slope im Vergleich zum Kontrollschnitt als auch die Reduzierung gegenüber der Baseline war nach CNP Applikation signifikant (zweiseitiger, ungepaarter T-test;  $p < 0,0001$ ). CNP hatte die stärkste Wirkung auf den FP slope nach einer 50 und 30 Hz HFS, vergleichbar mit der Situation im SP (Tabelle2)

<b>Stimulation</b>	<b>Kontrolle-100nM CNP</b>
100 Hz	18%
50 Hz	59%
30 Hz	35%
10 Hz	26%

Tabelle 2: Übersichtstabelle über das Maß der Reduktion der FP slope nach CNP Behandlung.

Ein einstündiges Einwaschen von 100 nM CNP bewirkte nach allen HFS eine Depression des FP slopes im SR gegenüber der Baseline.

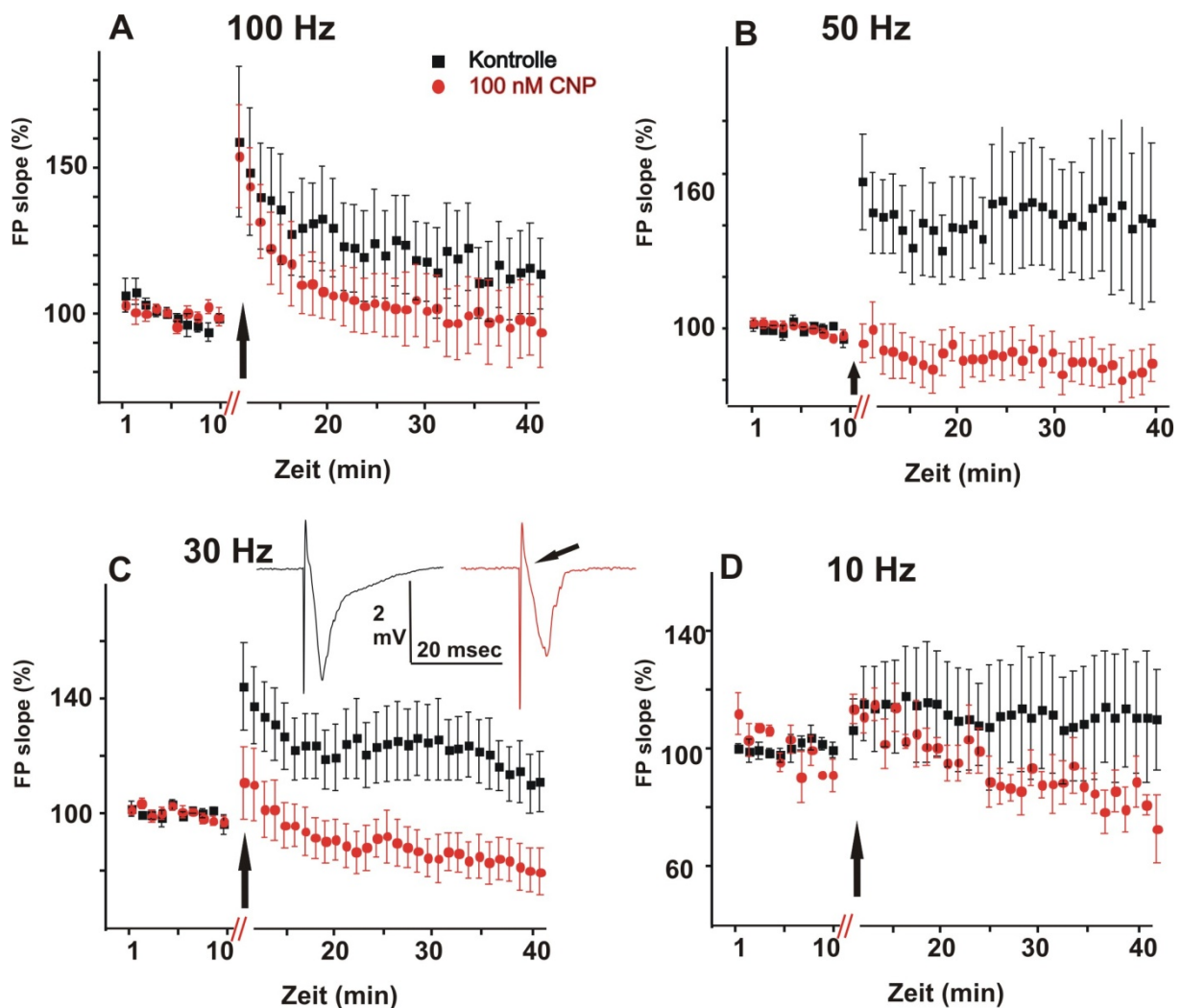


Abbildung 20: Reduzierende Wirkung von CNP auf den initialen „slope“ des FP gemessen im SR. Der FP slope wurde vermessen als  $\Delta V/\Delta t$  (siehe auch Material und Methoden 3.1.11) und gibt somit die Geschwindigkeit der präsynaptischen Glutamatfreisetzung wieder. Als Fehler ist der Standard Fehler des Mittelwertes aufgetragen.

A Potenzierung des „slope“ nach 100 Hz Stimulation, Kontrolle und CNP Applikation unterscheiden sich anfänglich kaum, später gibt es aber einen signifikanten Unterschied.  
 B bei 50 Hz Stimulation ist ein deutlicher Unterschied zwischen Kontrolle und CNP behandeltem Schnitt zu sehen.

C Nach 30 Hz Stimulation kann man eine deutliche Reduzierung der Potenzierung gegenüber der Kontrolle erkennen. Das Inset zeigt exemplarische Feldpotentiale der Kontrolle (schwarz) und nach CNP Behandlung (rot)

D Nach 10 Hz ist die Reduzierung der Potenzierung durch CNP geringfügig

Vergleicht man die reduzierende Wirkung von CNP auf die LTP der PS Amplitude und auf den FP slope, so ist die reduzierende Wirkung von CNP auf LTP am stärksten im SP (Tabelle 3).



	Reduzierung der PS Amplitude	Reduzierung des FP slope
<b>30 Hz</b>	55%	35%
<b>50 Hz</b>	68%	59%

Tabelle 3: Vergleich der reduzierenden Wirkung von CNP auf die LTP der PS Amplitude und auf die LTP des FP slope.

#### 4.1.6. Wirkung des C-Typ natriuretischen Peptides auf den slope des Feldpotentials während homosynaptischer Langzeitdepression

Betrachtet man den FP slope während homosynaptischer LTD, so konnte man auch hier eine Verstärkung der LTD nach CNP Applikation registrieren. Nach einer 5 Hz LFS Stimulation erreicht der FP slope im unbehandelten Schnitt  $88 \pm 0,8\%$  der Baseline (Abb. 21 A). Nach der einstündigen CNP Applikation betrug die Depression des Feldpotentials slopes  $85 \pm 0,3\%$  der Baseline. Die CNP behandelte Gruppe war gegenüber der Kontrollgruppe signifikant kleiner, die LTD des initialen FP slopes ist verstärkt worden. Ein 1 Hz Stimulationsprotokoll führt zu einer Depression von  $90 \pm 0,6\%$  der Baseline (Abb. 21 B). Nach CNP Applikation wurde ein Wert von  $77 \pm 0,6\%$  der Baseline registriert. Nach einer 5 Hz LFS wurde die LTD des FP slopes durch CNP um 3% verstärkt. Nach einer 1 Hz LFS bewirkte CNP eine Erhöhung der LTD um 23%.

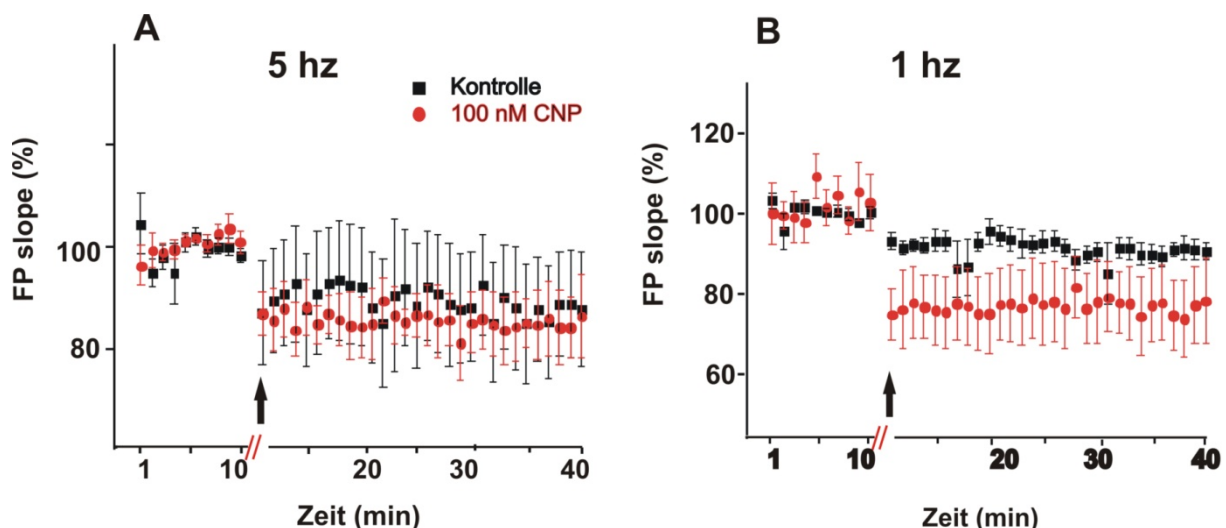


Abbildung 21: Änderung des FP slope während homosynaptischer LTD in Area CA1. Die LTD des FP slopes wird verstärkt durch CNP Applikation.

A LTD durch 5 Hz Stimulation evoziert mit und ohne CNP (100nM).

B LTD induziert mit 1 Hz Protokoll mit und ohne CNP (100nM).

Vergleicht man die Wirkung von CNP auf die LTD in SP und SR, so ist die verstärkende Wirkung von CNP auf LTD am deutlichsten im SP (Tabelle 4), was bedeuten könnte, dass der Effekt von CNP auf LTD hauptsächlich postsynaptisch verursacht wird.

	Verstärkung der PS Depression	Verstärkung der FP slope Depression
<b>5 Hz</b>	15%	3%
<b>1 Hz</b>	23%	13%

Tabelle 4: Vergleich der verstärkenden Wirkung von CNP auf die LTD der PS Amplitude und auf den slope des FP

#### **4.1.7. Effekt des C-Typ natriuretischen Peptides auf den Langzeitdepressions/-potenzierungs Schwellenwert des Feldpotential slopes**

Wie in Abbildung 19 kann man auch für die LTD/P Induktion des FP slope gemessen im SR der Area CA1 einen Schwellenwert angeben.

Dieser lag bei den FP Antworten im SR in Kontrollschnitten bei  $\theta_{LTD/P} = 7,5$  Hz.

Hierbei ist auffällig, dass die Messungen nach CNP Applikation die LTD/P Schwelle,  $\theta_{LTD/P}$  nicht erreichen (Abb. 22 B).

In Gegenwart von CNP lösten alle Reizungen LTD anhand der SR Antworten aus, obwohl im SP auch Steigerungen der PS Antworten gefunden wurden. Dies deutet auf einen kombinierten Effekt von CNP auf Transmitterfreisetzung und postsynaptische Erregbarkeit hin.

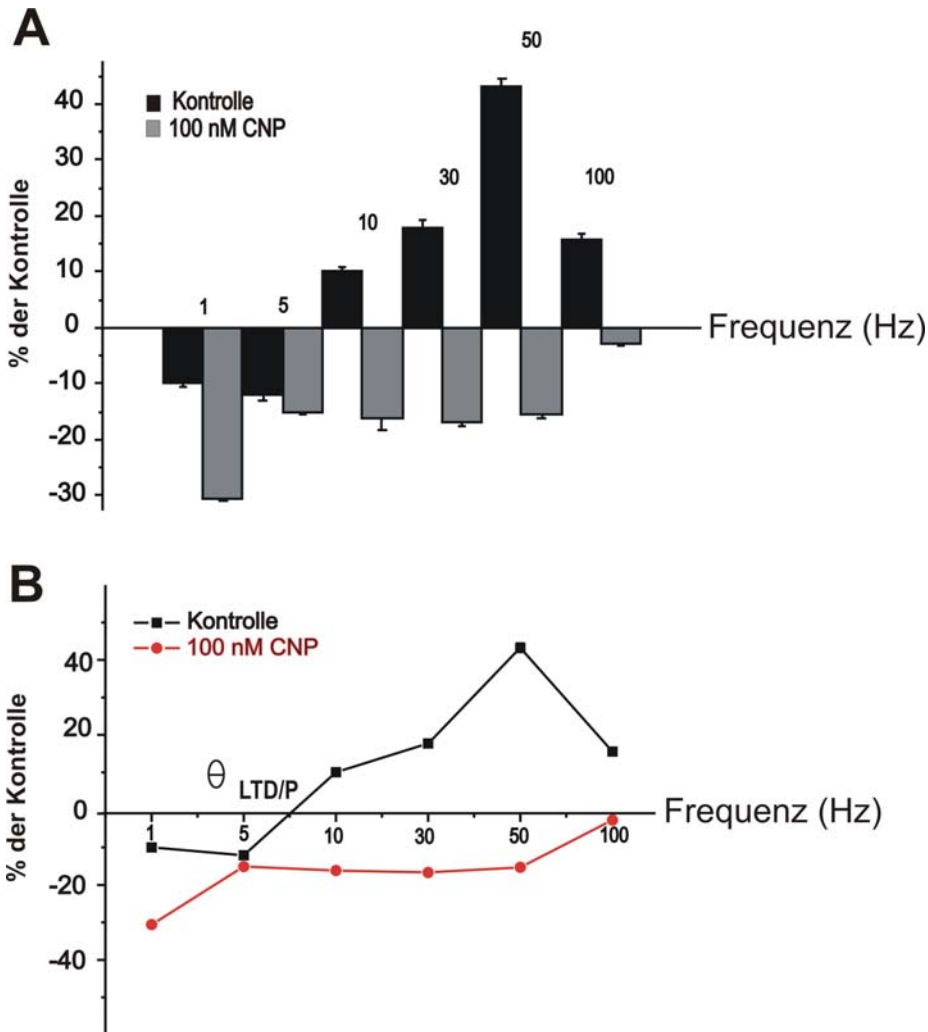


Abbildung 22: Änderung des FP slopes im SR aufgetragen über der Frequenz. Benutzt wurden die letzten 10 Minuten der Aufnahmen

A Auftragung als Balkendiagramm mit Standardfehler des Durchschnitts

B Auftragung ohne Standardfehler mit Darstellung der Schwellenfrequenz  $\theta_{LTD/P} = 7,5$  Hz. Die Messungen nach CNP Applikation erreichen den Schwellenwert nicht.

#### 4.1.8. Analyse der reduzierenden Wirkung von C-Typ natriuretischem Peptid auf die Langzeitpotenzierung des Populationsspikes

Die evozierten Signale im SR reflektieren einen negativen PS gefolgt von einem positiven Nachpotential, welches teilweise durch Feed-Forward und Feedback Hemmung vermittelt wird. Ich habe deshalb die Amplituden des negativen Potentials und des positiven Nachpotentials getrennt ausgewertet. Dies wurde innerhalb der Frequenzen untersucht, bei denen der CNP Effekt am ausgeprägtesten auftrat, nämlich bei 30 und 50 Hz (Abb. 23B und C).

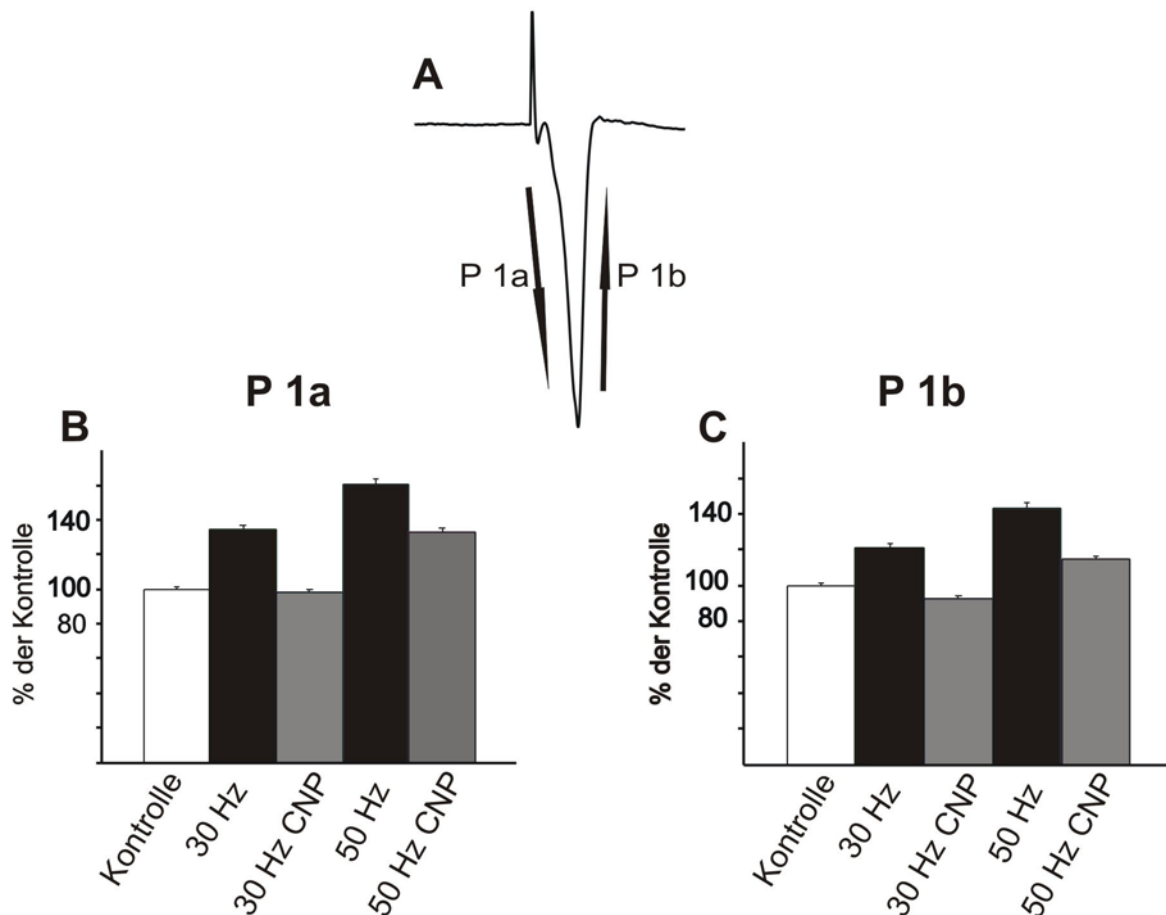


Abbildung 23: Analyse der Einwärtskomponente P 1a und der Auswärtskomponente P 1b des PS im SP nach CNP Applikation.

A schematische Veranschaulichung der vermessenen Einzelkomponenten des Populationsspikes

B Darstellung der Einwärtskomponente P 1a nach 30 und 50 Hz Stimulation

C Darstellung der Auswärtskomponente P 1b nach 30 und 50 Hz Stimulation

Nach einer 30 Hz HFS ist die Einwärtskomponente P1 a CNP behandelter Schnitte um 36 % reduziert gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Mittelwert 30 Hz Kontrolle =  $134 \pm 2,5\%$ ; Mittelwert 30 Hz+CNP =  $98 \pm 1,6\%$ ). Nach einer 50 Hz Stimulation ist P 1a um 27 % reduziert in CNP behandelten Schnitten (Mittelwert 50 Hz Kontrolle =  $160 \pm 3,2\%$ ; Mittelwert 50 Hz + CNP=  $133 \pm 2,3\%$ ; Abb. 23 A und B)

Die Auswärtskomponente P1b ist nach 30 Hz HFS in der CNP Gruppe um 28% kleiner als die Kontrolle (Mittelwert Kontrolle  $121\% \pm 2,4$ ; Mittelwert CNP  $93\% \pm 1,5$ ; Abb. 23). CNP reduziert P1b um 30% nach einer 50 Hz HFS (Mittelwert Kontrolle  $144 \pm 2,9\%$ ; Mittelwert CNP  $114 \pm 1,8\%$ ; Abb. 23 A und B).

CNP wirkt auf die Einwärts - als auch auf die Auswärtskomponente des Populationsspikes gleichmäßig reduzierend, wobei keine Unterschiede zwischen einer 30 und 50 Hz HFS festzustellen waren.

Um die Auswärtskomponente P 1b genauer zu betrachten wurde nun nur das isolierte Nachpotential untersucht, an dessen Genese Feed-Forward und Feedback Hemmung beteiligt sind. Ich analysierte diesen Wert nach einer 50 Hz HFS (Abb. 24).

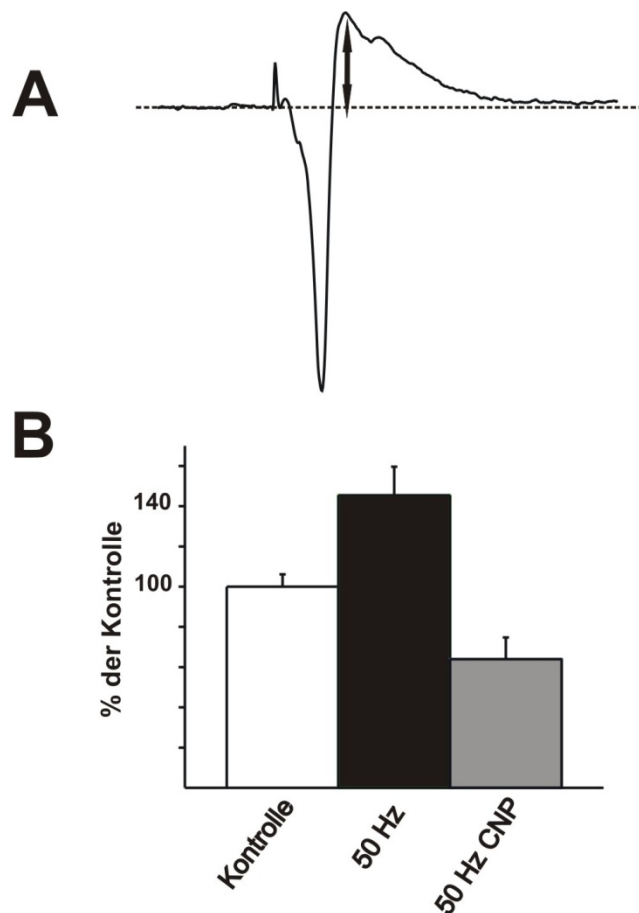


Abbildung 24: das Nachpotential P1b wird durch CNP reduziert.  
A schematische Darstellung der Vermessung des Nachpotentials  
B CNP vermindert die Cl<sup>-</sup> Auswärtskomponente

Hierbei wurde deutlich, dass die Reduzierung des Nachpotentials nach CNP Einwirkung mit 81% (Mittelwert 50 Hz = 145 ± 14%; Mittelwert 50 Hz CNP = 64 ± 11%; T-test  $p < 0,0001$ ) deutlich größer ausfällt, als die Reduzierung der gesamten Auswärtskomponente P 1b (30%) durch CNP. Diese Daten deuten auf eine reduzierte Feed-Forward und Feedback Hemmung in Gegenwart von CNP hin.

## 4.2. Beitrag inhibitorischer Netzwerke zu dem Effekt von C-Typ natriuretischen Peptid

### 4.2.1. Wirkung des C-Typ natriuretischen Peptides auf Langzeitpotenzierung ohne inhibitorischen Input

Da CNP homosynaptische LTP im SP reduziert und dabei hauptsächlich das Nachpotential reduziert wird, liegt die Hypothese nah, dass CNP inhibitorische Netzwerke im Hippokampus moduliert. Um diese Hypothese zu testen wurde die Area CA3 chirurgisch entfernt und gleichzeitig GABA<sub>A</sub> Rezeptoren mit 5  $\mu$ M Bicucullin blockiert (siehe auch Material und Methoden 3.1.13.). Hiernach wurden HFS und LFS Stimulationsprotokolle, die einen deutlichen Effekt von CNP aufweisen verwendet, nämlich 30 Hz für ein LTP Protokoll und 1 Hz für ein LTD Protokoll. Mit einem 30 Hz LTP Protokoll wurde die Amplitude des PS um  $12 \pm 0,8\%$  gegenüber der Baseline potenziert (3 Schnitte von 3 Tieren; Abb.25 A). Nach CNP Einwirkung bewirkte eine 30 Hz Stimulation keine Potenzierung gegenüber der Baseline, sondern eine Depression ( $86 \pm 0,5\%$ ; 5 Schnitte von 5 Tieren). Der FP slope wurde in der Kontrolle nach 30 Hz Stimulation um  $102 \pm 0,4\%$  potenziert (3 Schnitte von 3 Tieren). Nach der Einwirkung von CNP bewirkte eine 30 Hz Stimulation eine Depression auf  $91 \pm 0,5\%$  der Baseline (3 Schnitte von 3 Tieren; Abb.25 B).

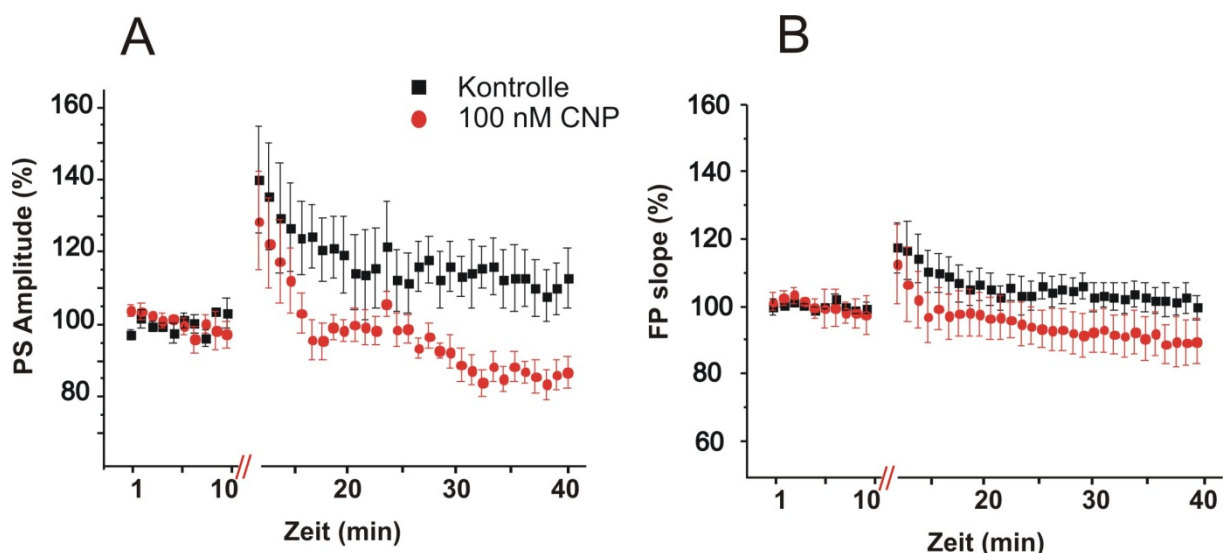


Abbildung 25: 30 Hz Stimulation in Schnitten mit dissektiertem CA3 und 5  $\mu$ M Bicucullin.  
A Potenzierung der Amplitude des Populationsspikes  
B Potenzierung des Feldpotential slope

In Schnitten ohne CA3 betrug der Unterschied zwischen der Kontrollmessung und der CNP Messung in der Potenzierung des PS nach einer 30 Hz HFS nur 26 %. In

Schnitten mit CA3 und ohne Bicucullin hingegen betrug der Unterschied noch 55 % (Tabelle 5). Genauso verhielt es sich, betrachtete man die Änderung des FP slopes. Nach 30 Hz Stimulation im unbehandelten Schnitt unterschieden sich Kontrolle und mit CNP behandelte Schnitte um 35% (Tabelle 5). In den Schnitten mit verringertem inhibitorischen Input betrug der Unterschied nur noch 11%.

	Reduzierung der PS Amplitude	Reduzierung des FP slope
Schnitte <u>mit</u> CA3 <u>ohne</u> Bicucullin	55%	35%
Schnitte <u>ohne</u> CA3 <u>mit</u> Bicucullin	26%	11%

Tabelle 5: Vergleich der reduzierenden Wirkung von CNP auf PS Amplitude und FP slope nach 30 Hz HFS in Schnitten mit und ohne inhibitorische Netzwerke.

Das bedeutet, dass der input von Feed-Forward und Feedback Hemmung auf CA1 Neurone, mehr als die Hälfte der reduzierenden Wirkung von CNP auf die LTP trägt.

Bei der Analyse des Nachpotentials in Schnitten ohne CA3 und mit Bicucullin zeigte sich, dass der ausgeprägte Effekt von CNP auf das Nachpotential des PS nicht mehr vorhanden war (Abb. 26).

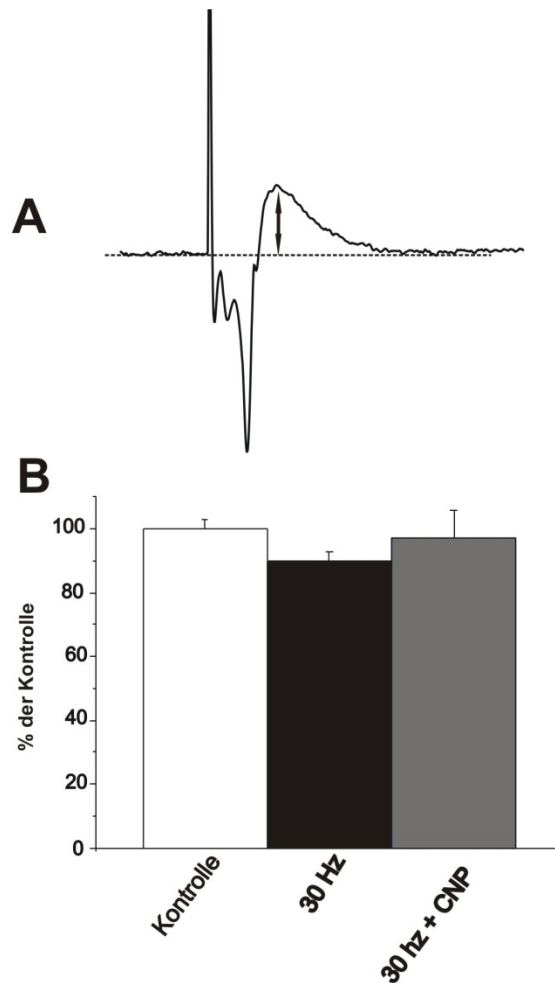


Abbildung 26: das Nachpotential P1b wird nach Dissektion von CA3 und Bicucullin Applikation nicht durch CNP moduliert.

A schematische Darstellung der Vermessung der „gemischten“  $\text{Cl}^-$  Komponente  
 B In Gegenwart von CNP ist keine Veränderung der positiven Auswärtskomponente zu beobachten

Ohne CA3 und mit Bicucullin war kein signifikanter Unterschied des Nachpotentials nach einer 30 Hz Stimulation ( $90 \pm 2,5\%$ ) mehr zu sehen im Vergleich zur Baseline ( $p > 0,05$ ). Außerdem verringerte CNP das Nachpotential nicht mehr nach einer 30 Hz Stimulation ( $97 \pm 8,9\%$ ). Das beweist, dass das Nachpotential des PS vollständig von Feed-Forward und Feedback Hemmung getragen wird und das CNP spezifisch diese hemmenden Anteile des PS beeinflusst.

#### 4.2.2. Beitrag inhibitorischer Netzwerke zu dem Effekt von C-Typ natriuretischem Peptid auf Langzeitdepression

In Schnitten ohne Area CA3 wird die Amplitude des PS in Anwesenheit von Bicucullin nach einer 1 Hz Stimulation reduziert auf  $94 \pm 2,7\%$  des Baselinewert (4 Schnitte von



4 Tieren; Abb.27 A). Nach einstündigem Einwaschen von CNP jedoch, wird die LTD auf  $37 \pm 0,9\%$  der Baseline verstärkt (4 Schnitte von 4 Tieren). Die Änderung des FP slope hingegen war nach CNP Applikation nur geringfügig gegenüber der Kontrolle. In der Kontrolle bewirkte ein LFS eine LTD des FP slope von  $89 \pm 3,5\%$ , die LTD der mit CNP behandelten Schnitte wurde verstärkt auf  $78 \pm 0,4\%$  (Abb.27 B). Die Depression der PS Amplitude und die Depression des FP slopes wurden signifikant verstärkt nach Applikation von CNP.

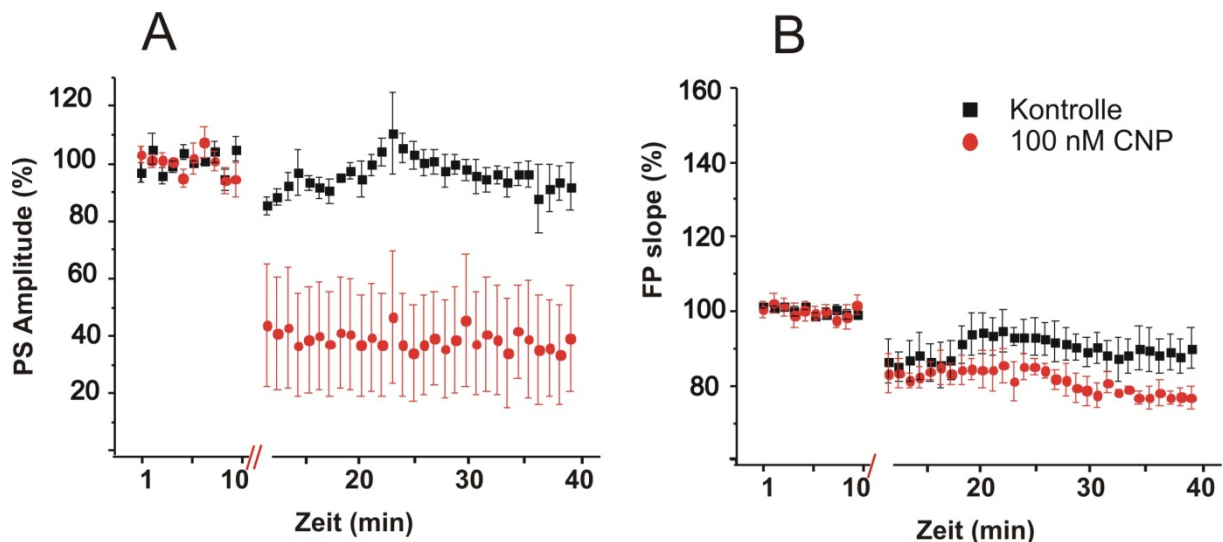


Abbildung 27: 1Hz Stimulation in Schnitten mit disseziertem CA3 und  $5 \mu\text{M}$  Bicucullin.  
 A Depression der Amplitude des Populationsspikes  
 B Depression des Feldpotential slopes

Im Vergleich der Wirkung von CNP auf die Depression im SP und SR zeigte sich, dass in intakten Schnitten die PS Amplitude durch CNP stärker inhibiert wird als der FP slope (Tabelle 6). In Schnitten ohne CA3 mit  $5 \mu\text{M}$  Bicucullin jedoch wurde die Wirkung von CNP auf den PS mehr als verdoppelt, wohingegen der Fp slope fast gleich blieb im Vergleich zu Schnitten mit CA3 und ohne Bicucullin.

	Verstärkung der PS Depression	Verstärkung der FP slope Depression
Schnitte <u>mit</u> CA3 <u>ohne</u> Bicucullin	23%	13%
Schnitte <u>ohne</u> CA3 <u>mit</u> Bicucullin	57%	11%

Tabelle 6: Vergleich der verstärkenden Wirkung von CNP auf die Depression der PS Amplitude und den FP slope nach 1 Hz LFS in Schnitten mit und ohne inhibitorischen Input.

### **4.3. Wirkung von C-Typ natriuretischen Peptid auf Kurzzeitplastizität**

#### **4.3.1. Analyse der präsynaptischen Komponente**

Da das C-Typ natriuretische Peptid einen deutlichen Effekt auf die präsynaptische Komponente des FP slope im SR ausübte, lag es nah diese vermeintlich präsynaptische Wirkung auch mit anderen Mitteln zu untersuchen. Hierzu wurde eine Paired Pulse Messung mit 5 Doppelpulsen und einem Intervall von 50 Millisekunden gewählt. Diese Messung gibt ein Indiz für plastische Kurzzeitänderungen der Präsynapse. Analysiert wurde der Paired Pulse Index  $pp_2/pp_1$ . Nach einer CNP Badapplikation wurde die Potenzierung des Paired-Pulse Index, gemessen nach der Baseline, gegenüber der Kontrolle reduziert (zweiseitiger, gepaarter T-test;  $P < 0,0001$ ; Abb. 28 B). Behandelte man den Schnitt gleichzeitig mit dem GC-B Agonist CNP und dem Antagonist HS-142-1, so gab es keinen signifikanten Unterschied in der Potenzierung des Paired Pulse Index im Vergleich zur Kontrolle (Abb.28 B).

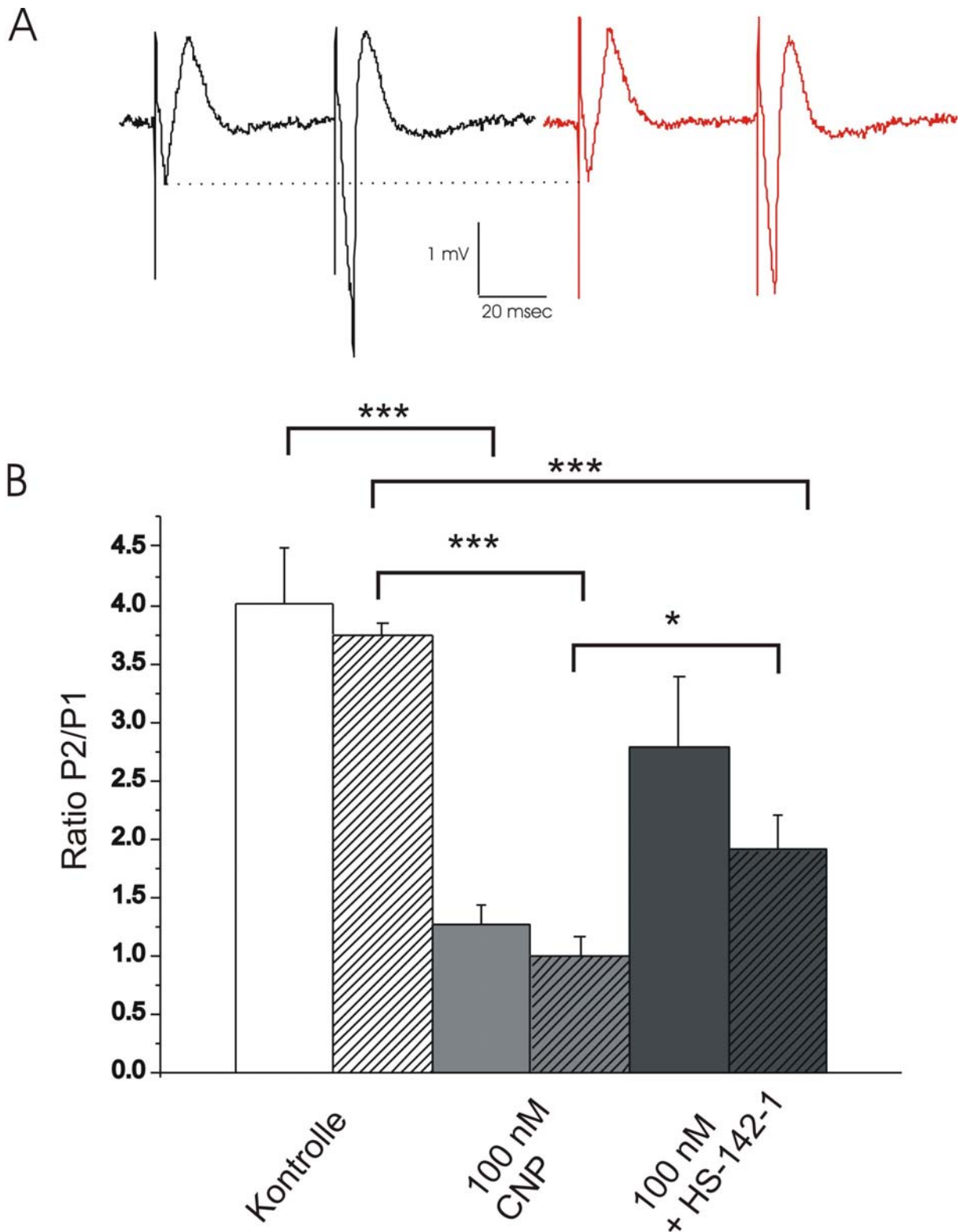


Abbildung 28: reduzierende Wirkung von CNP auf die Potenzierung des Paired Pulse Index. A Beispiel einer pp Messung nach der Baseline ohne CNP (schwarz), nach Applikation von 100 nM CNP (rot).

B Paired pulse Ratio nach Baseline (transparenter Balken) und nach 30 Hz Stimulation (Querstreifen). Drei Gruppen sind dargestellt: unbehandelte Kontrolle, nach dem Einwaschen von 100 nM CNP und nach dem Einwaschen von 100 nM CNP zusammen mit dem GC-B Antagonisten HS-142-1 (100 µg/mL) (\*\*\*) =  $P < 0,0001$ ; \* =  $P < 0,05$ ).

Ähnlich verhielt sich der Paired Pulse Index gemessen nach einer 30 Hz Stimulation. Nach der Applikation von CNP beobachtete man eine signifikante Reduzierung der Potenzierung des Paired Pulse Index gegenüber der Kontrolle (T-test,  $P < 0,0001$ ; Abb. 28 B). Der Antagonist bewirkte hier jedoch keine vollständige Wiederherstellung der Kontrollverhältnisse, jedoch war die HS-142-1 Gruppe noch signifikant potenziert gegenüber der 100 nM CNP Gruppe nach 30 Hz Stimulation (Abb. 28 B).

Der Paired Pulse Index in hippokampalen Akutschnitten ohne CA3 in Anwesenheit von  $5\mu\text{M}$  Bicucullin zeigte keinen Unterschied in der Potenzierung in CNP behandelten Schnitten nach der Baseline (Abb.29). Nach einer 30 Hz Stimulation in CNP behandelten Schnitten war die Potenzierung des Paired Pulse Index jedoch signifikant reduziert gegenüber der Baseline (T-test;  $p < 0,05$ ; Abb. 29).

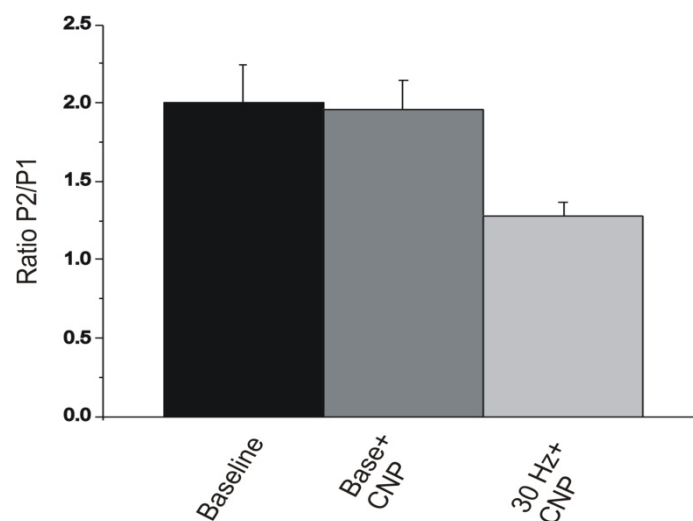


Abbildung 29: Paired Pulse Ratio gemessen in hippokampalen Schnitten ohne CA3 mit  $5\mu\text{M}$  Bicucullin.

#### **4.4. Kontrolle der Spezifität des C-Typ natriuretischen Peptid Effektes auf Langzeitpotenzierung**

Um zu testen, ob der gemessene Effekt von CNP auf die synaptische Plastizität auch wirklich durch die Aktivierung der GC-B vermittelt wurde und nicht durch das aktivieren anderer Rezeptoren, wie der GC-A, benutzte ich einen Antagonisten der GC-B, HS-142-1 (Tian und Yang, 2006) und applizierte diesen zusammen mit CNP (6 Schnitte von 5 Tieren).

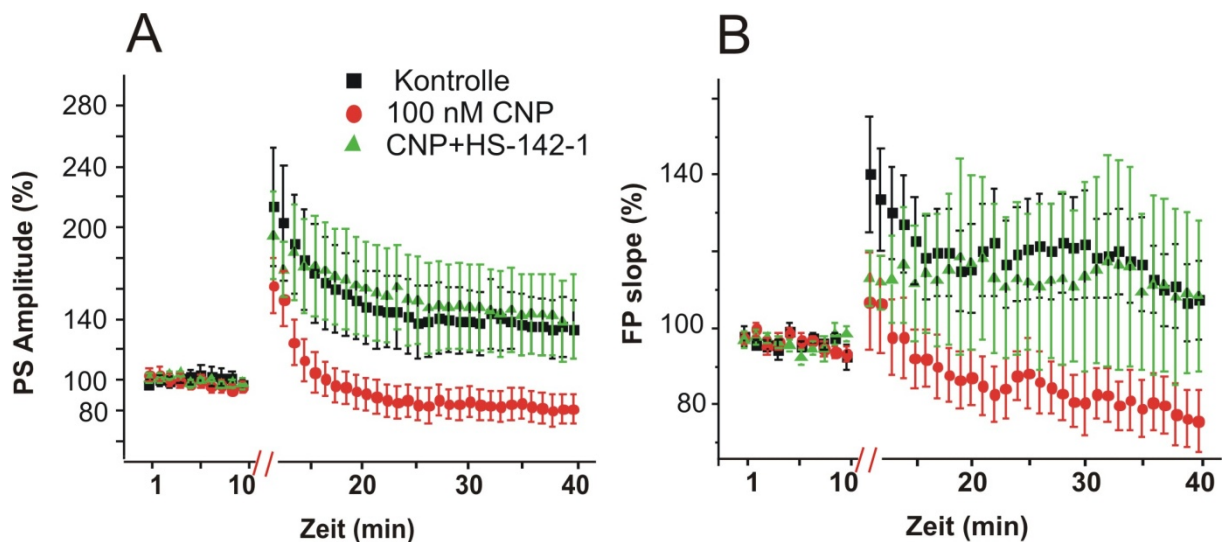


Abbildung 30: Applikation des GC-B Antagonisten HS-142-1 zusammen mit CNP vor einer 30 Hz Stimulation.

A Effekt auf die Potenzierung der Amplitude des Populationsspikes

B Effekt auf die Potenzierung des slopes der Feldpotentiales

Wäscht man den Antagonisten HS-142-1 zusammen mit CNP eine Stunde vor einer 30 Hz Stimulation ein, so wird der CNP Effekt auf die PS Amplitude rückgängig gemacht und es ist kein statistischer Unterschied im Vergleich zur Kontrolle mehr vorhanden (zweiseitiger, ungepaarter T-test,  $p > 0,05$ ; Abb. 30A). Dies trifft sowohl auf die Potenzierung der Amplitude des PS im SP als auch auf die Potenzierung des FP slope im SR zu.

#### 4.5. Analyse zellulärer Signalwege, welche möglicherweise an der Wirkung von C-Typ natriuretischem Peptid auf synaptische Plastizität teilhaben

Um die Wirkung von CNP auf synaptische Plastizität im Hippokampus, auf molekularer Ebene zu charakterisieren, setzte ich ein immunozytochemisches Verfahren in einer primären, dissoziierten Zellkultur ein. Nach Aktivierung durch CNP produziert der Rezeptor GC-B intrazellulär cGMP, somit wird der Effekt einer CNP Applikation wahrscheinlich über einen cGMP-Signalweg intrazellulär vermittelt. Schon länger ist bekannt, dass an einer Induktion von LTP in hippokampalen Zellkulturen eine schnelle, koordinierte Umverteilung prä- und postsynaptischer Proteine involviert ist. Präsynaptisch sind Vesikelproteine wie Synaptophysin und Synapsin I von dieser Umverteilung betroffen (Antonova et al., 2001). Postsynaptisch

spielt insbesondere die GluR1 Oberflächenexpression eine wichtige Rolle bei der LTP und LTD Expression (Malenka, 2003; Citric, Malenka, 2008). So wurde nach Glutamat und 8-Br-cGMP Stimulation eine erhöhte, postsynaptische Oberflächenexpression der GluR1 Untereinheiten beobachtet (Antonova et al., 2001; Wang et al., 2005). Diese Zunahme von prä- und postsynaptischen Punkten kann blockiert werden durch den Einsatz von Inhibitoren des NO/cGMP/PKG Signalweges, was darauf hindeutet, dass dieser Signalweg an der Generierung der prä- und postsynaptischen Effekte beteiligt ist (Wang et al., 2005).

Als präsynaptischen Marker benutzte ich in dieser Arbeit einen Antikörper gegen das Vesikelprotein Synapsin I und als postsynaptischen Marker einen Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop der AMPA Rezeptoruntereinheit GluR1. Eine Glutamatstimulation wurde als interne Positivkontrolle benutzt. Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl die Anzahl von postsynaptischen, GluR1 immunoreaktiven Punkten, als auch von präsynaptischen immunoreaktiven Punkten und die Kolokalisation beider nach einer Glutamat Stimulation zunimmt (Antonova et al., 2001; Wang et al., 2005). Eine Stimulierung mit 500  $\mu$ M 8-Br-cGMP konnte als weitere, interne Positivkontrolle dienen, da dieses Protokoll die Effekte einer Glutamat Applikation simulieren sollte (Wang et al., 2005).

Schließlich setzte ich eine aufsteigende Reihe von membrangängigen 8-Br-cGMP Konzentrationen ein und als Stimulator des NO/cGMP/PKG Signalweges den NO Donor SNAP, um die Wirkung von CNP auf Prä- und Postsynapse vergleichend darstellen zu können.

Diese Versuchsanordnung sollte bei der Beantwortung folgender Fragestellungen hilfreich sein:

1. Zeigt das verwendete Zellkultursystem nach Glutamat und cGMP Stimulation dieselben prä- und postsynaptischen Effekte wie in der Literatur beschrieben und sind diese vergleichbar mit einer Aktivierung des NO/cGMP-Signalweges?
2. Was passiert nach einer CNP Stimulation prä und postsynaptisch?
3. Lässt sich der Effekt einer CNP Stimulation einer intrazellulären cGMP Konzentrationserhöhung zuordnen.
4. Wie stellt sich eine CNP Stimulation im Vergleich zu einer Stimulierung des NO Signalweges dar?

#### 4.5.1. Kontrolle der Qualität der GluR1 Oberflächenfärbung

Um sicher sein zu können, dass der benutzte Antikörper auch tatsächlich die oberflächenexprimierte Fraktion der GluR1 Untereinheit markiert, und nicht auch intrazelluläre Fraktionen, verglich ich das Färbemuster mehrerer GluR1 Antikörper.

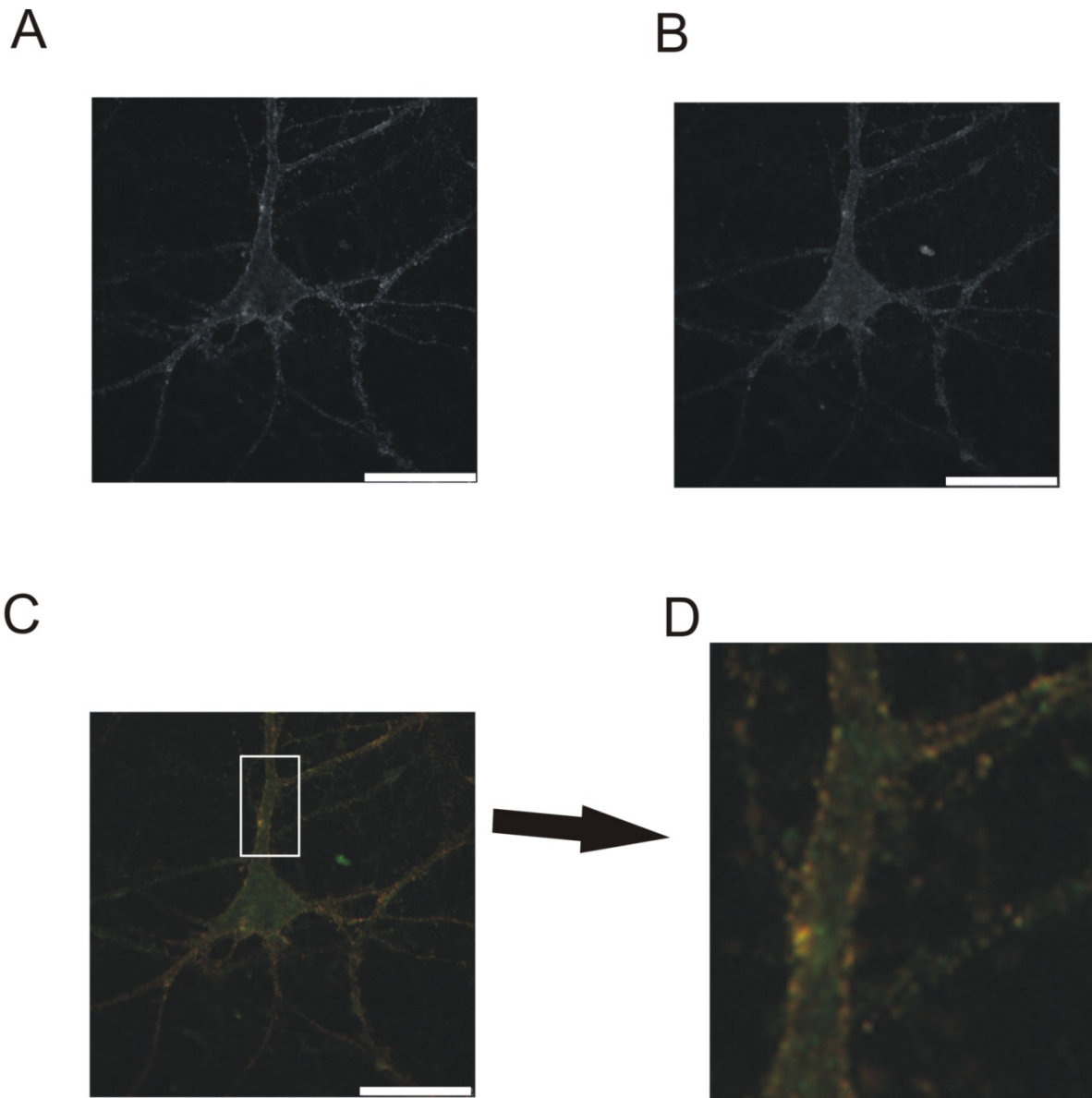


Abbildung 31: Rezeptoroberflächen Färbemuster zweier GluR1 Antikörper (nicht permeabilisierende Bedingungen). Balken = 25  $\mu$ m

A Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop der GluR1 Untereinheit anti- Kaninchen (Calbiochem; rot).

B Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop der GluR1 Untereinheit anti-Maus (Santa Cruz; grün).

C übereinandergelegter grüner und roter Kana.l

D Detailausschnitt, digital vergrößert.

Die Antikörper der Firmen Calbiochem und Santa Cruz zeigten eine weitgehende Kolokalisation in ihrem Färbemuster (Abb. 31). Getestet wurden Antikörper der Firmen Calbiochem, Santa Cruz und Upstate (Abb.32) gegen extrazelluläre Epitope der GluR1 Untereinheit des AMPA Rezeptors. Verwendet wurde im späteren Experiment der Antikörper der Firma Santa Cruz, da er qualitativ gesehen die Vitalität der Neuronenkultur weniger beeinträchtigte, als derjenige der Firma Upstate (Abb.32) und der Calbiochem Antikörper zum Zeitpunkt der Anfertigung der initialen Experimente nicht erhältlich war.

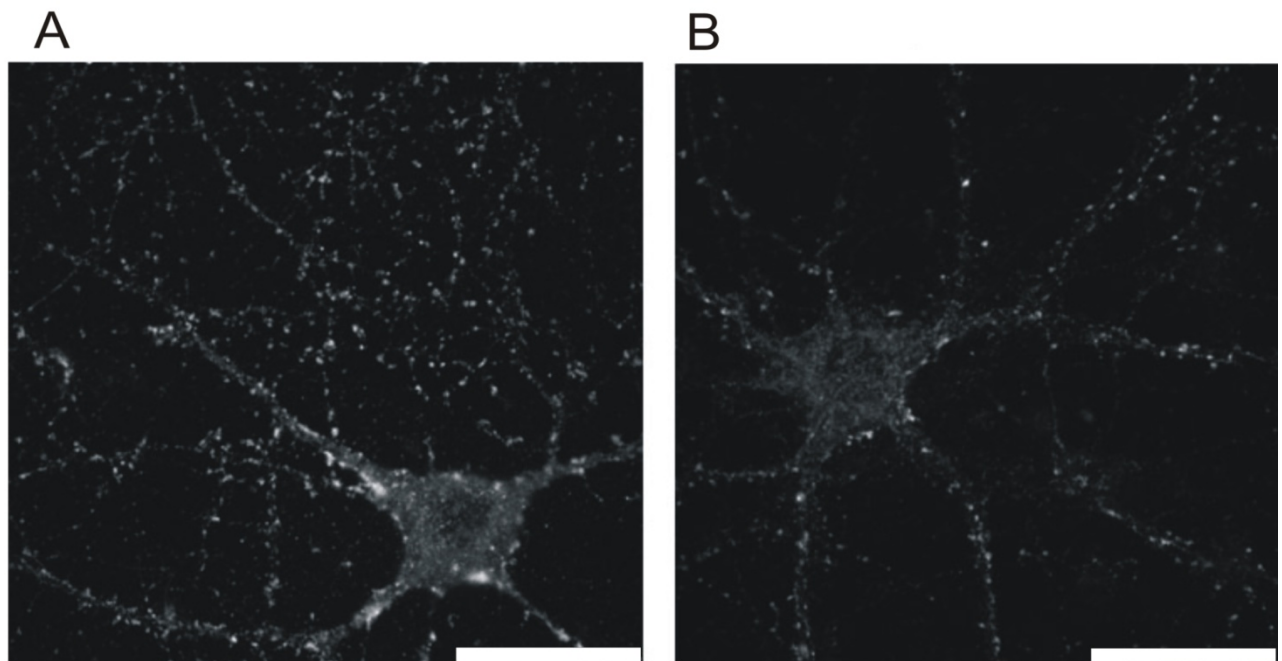


Abbildung 32: Färbemuster einer Rezeptoroberflächenfärbung (nicht permeabilisierende Bedingungen) mit zwei verschiedenen GluR1 Antikörper. Beide pyramidale Neurone stammen aus der gleichen Präparation. Balken = 25 $\mu$ m

A Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop der GluR1 Untereinheit anti-Maus (Santa Cruz).

B Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop der GluR1 Untereinheit anti-Maus (Upstate).



#### 4.5.2. Kontrolle der Spezifität des GluR1 Antikörpers

Um sicher sein zu können, dass der GluR1 Antikörper (Santa Cruz) tatsächlich spezifisch für glutamaterge Synapsen ist, machte ich in einer zweiten Kontrolle eine Doppelfärbung mit dem präsynaptischen Glutamattransporter Protein VGlut1 (anti-Meerschwein) und GluR1 (anti-Maus). Da VGlut1 als Glutamattransporterprotein in Vesikeln glutamaterger Terminalien vorkommt, sollte der Antikörper gegen GluR1 eine vollständige Kolokalisation mit der Immunoreaktivität gegen VGlut1 aufweisen.

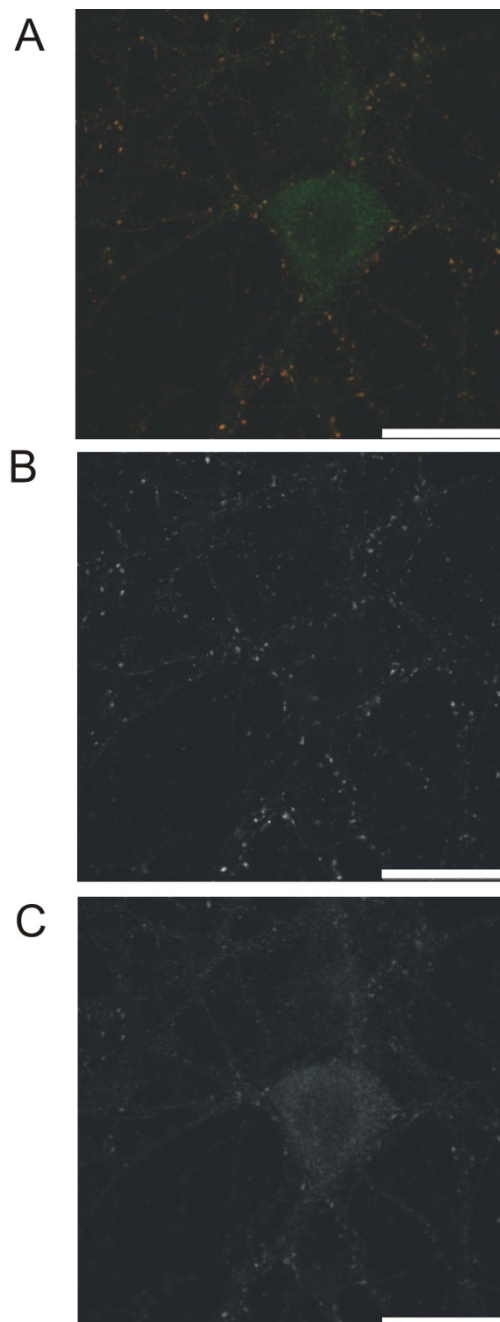


Abbildung 33: Doppelfärbung gegen VGlut1 (anti-Meerschwein; rot; permeabilisierende Bedingungen) und GluR1(anti-Maus;grün; Santa Cruz; nicht permeabilisierende Bedingungen). Balken = 25  $\mu$ m

A Bild mit übereinander gelegten Kanälen  
B Vglut1 (rot), intrazelluläre Färbung.  
C GluR1 (grün) Oberflächenfärbung.

In der Spezifitätskontrolle zeigte sich, dass VGlut1 positive, glutamaterge Terminalien erwartungsgemäß mit der postsynaptischen GluR1 Immunoreaktivität vollständig kolokalisierten (Abb.33). Somit ist der verwendete GluR1 Antikörper spezifisch für glutamaterge Synapsen.

### 4.5.3. Kontrolle der Lokalisation des präsynaptischen Vesikelproteins SynapsinI in primärer, hippocampaler Zellkultur

Um die synaptische Verteilung von SynapsinI in den verwendeten Zellkulturen zu testen, machte ich eine VglutI (anti-Meerschwein) - SynapsinI (anti-Maus) Doppelfärbung (Abb.34)

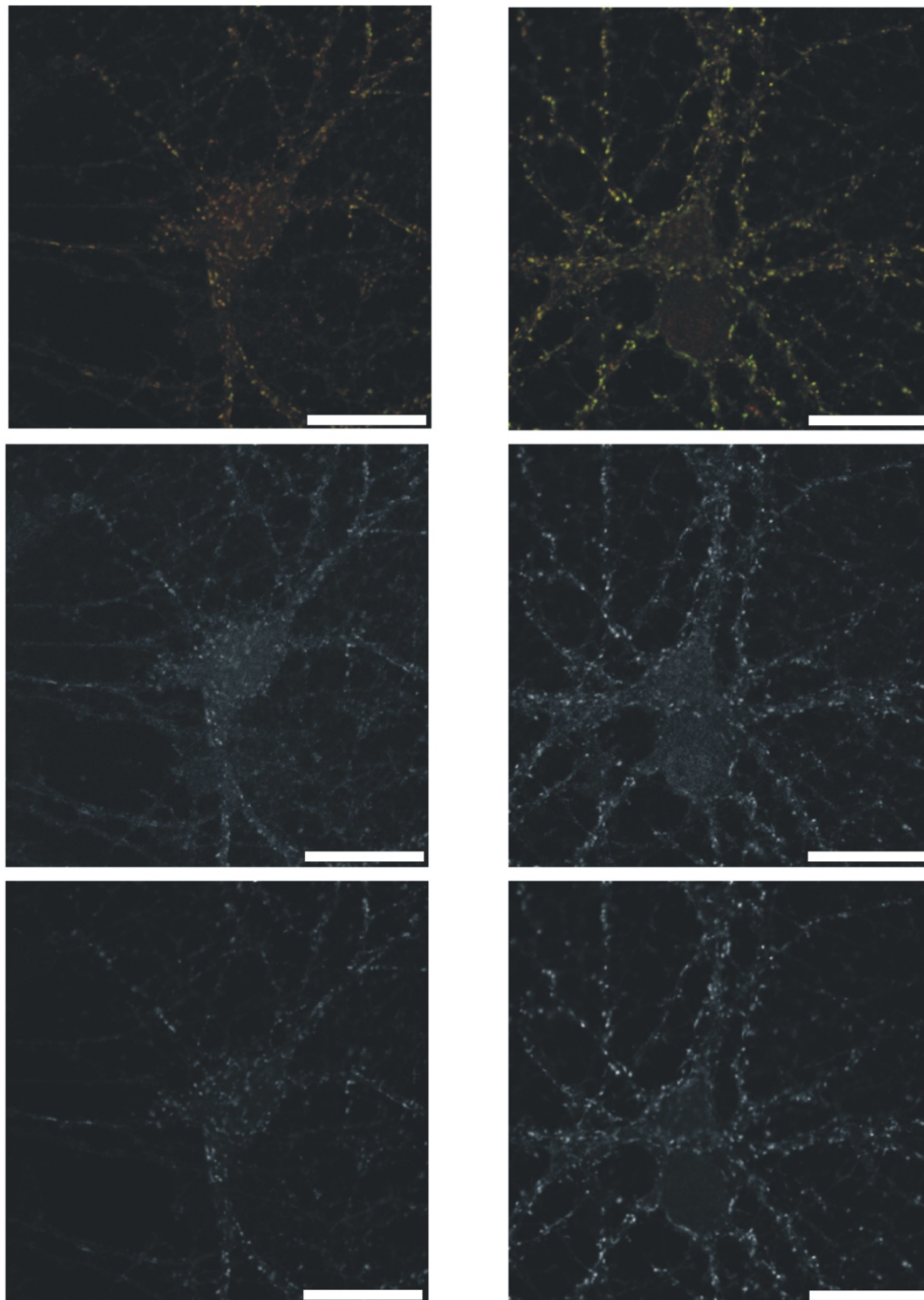


Abbildung 34: Zwei verschiedene Zellen aus einer Präparation, immunopositiv gegen SynapsinI (anti-Maus; grün; permeabilisierende Bedingungen) und VGLUT1 (anti-Kaninchen; rot; permeabilisierende Bedingungen). Die erste Reihe zeigt die übereinander gelegten Kanäle. Die zweite Reihe zeigt SynapsinI Immunoreaktivität. Die dritte Reihe zeigt VGLUT1 Immunoreaktivität. Balken = 25µm

77% der Punkte für das präsynaptische Vesikelproteins SynapsinI kolokalisierten mit immunpositiven Punkten für das präsynaptischen Vesikelproteins VGlutI (Abb.35). Dieser Anteil stellt den glutamatergen Anteil der Terminalien dar. Da bekannt ist, dass SynapsinI in nahezu allen Synapsen vorkommt (Rosahl et al., 1995), müssen die nicht kolocalisierenden 23% der SynapsinI Punkte GABAerge Terminalien darstellen.

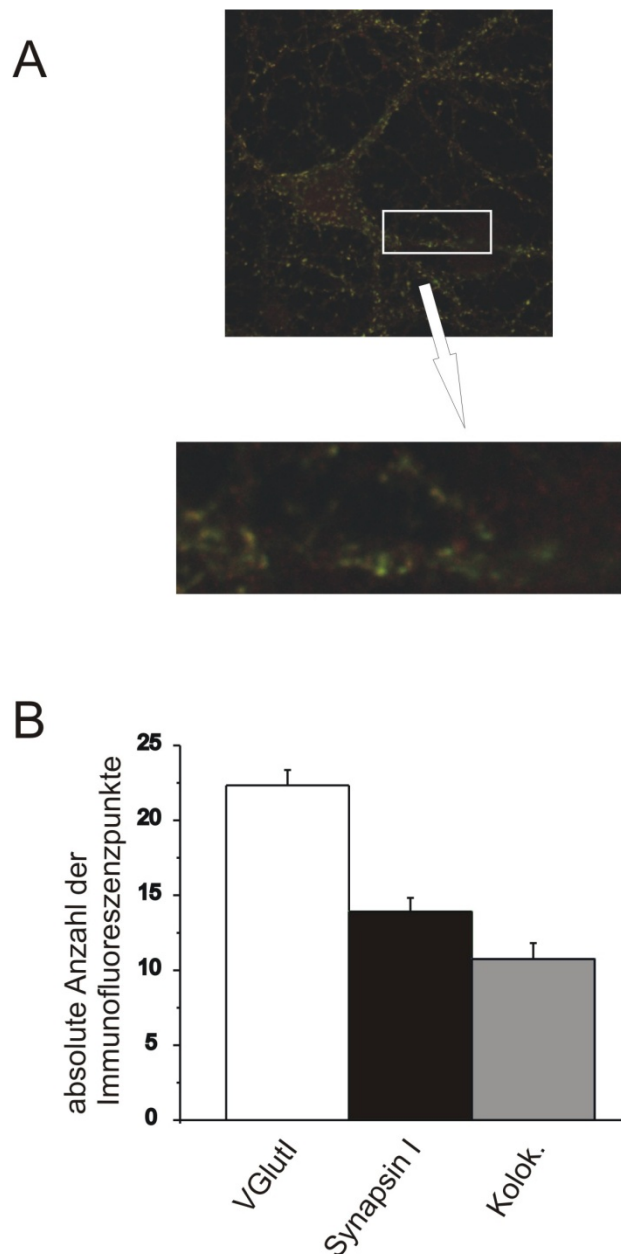


Abbildung 35: Anteil der glutamatergen Terminalien in pyramidalen Hippokampus Neuronen. A Beispiel für den ausgewerteten proximalen Bereich eines Neurons: SynapsinI (anti-Maus; grün) VGlutI(anti-Meerschwein; rot)  
 B Quantifizierung der absoluten Anzahl der Immunofluoreszenzpunkte

Antikörper gegen Synaptophysin und SynapsinI können beide als präsynaptische Marker verwendet werden. Ein Referenzwerte aus der Literatur für das

kolokalisierende Vorkommen der beider Vesikelproteine zeigte eine Kolokalisation von circa 60% (Wang et al., 2005). Im vorliegenden Fall wurde eine Kolokalisation von 47% gemessen (Abb.36).

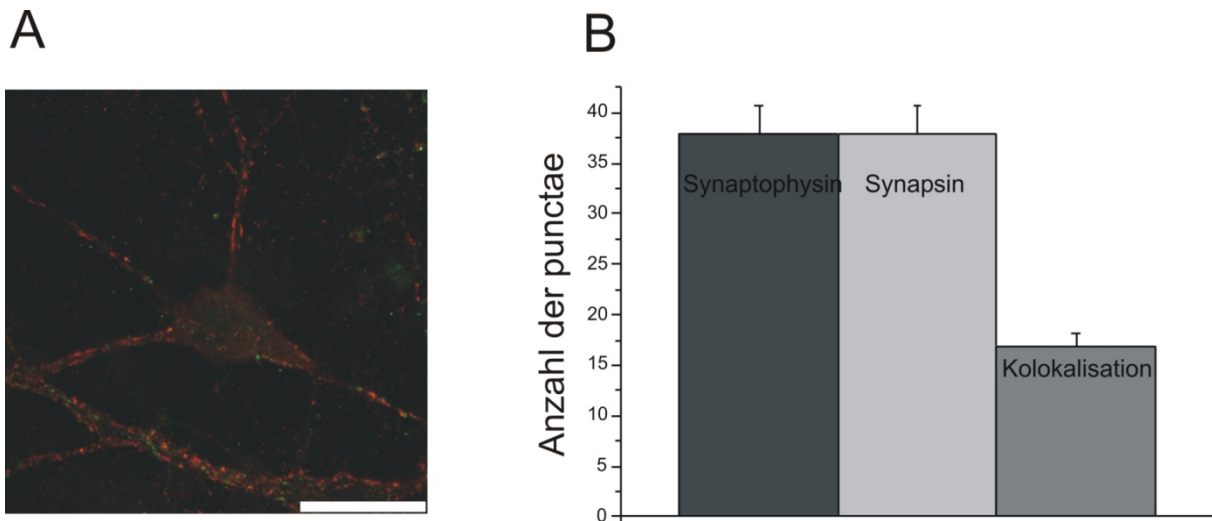


Abbildung 36: Kolokalisation von Synaptophysin und Synapsin I.  
Balken = 25  $\mu$ m

A Synaptophysin (anti-Maus; grün) und Synapsin I (anti-Kaninchen; rot) in einem Kanal übereinandergelegt abgebildet.

B Quantifizierung in absoluten Zahlen der Punkte (Fehler=SEM)

Da die Kolokalisation von Synapsin I mit Synaptophysin ähnlich groß war, wie der Literaturwert konnte man davon ausgehen, dass Synapsin I als präsynaptischer Marker valide ist.

#### 4.5.4. Kontrolle der Wirkung von Glutamat in hippocampaler Zellkultur

Es ist bekannt, dass allgemeine Netzwerkaktivität in hippocampaler Zellkultur die Oberflächenexpression von GluR1 nicht aber die von NR1 beeinflusst (Lissin DV et al., 1998). Weiterhin weiß man, dass eine Glutamatstimulation in Zellkultur schnelle Änderungen in der dendritischen Verteilung von AMPA Rezeptoruntereinheiten, nicht aber von NMDA Rezeptoruntereinheiten zur Folge hat (Lissin D.V. et al. 1999), deswegen testete ich die Wirkung von der von mir eingesetzten Glutamat Stimulation auf die Oberflächenexpression von NR1 in Zellkultur.

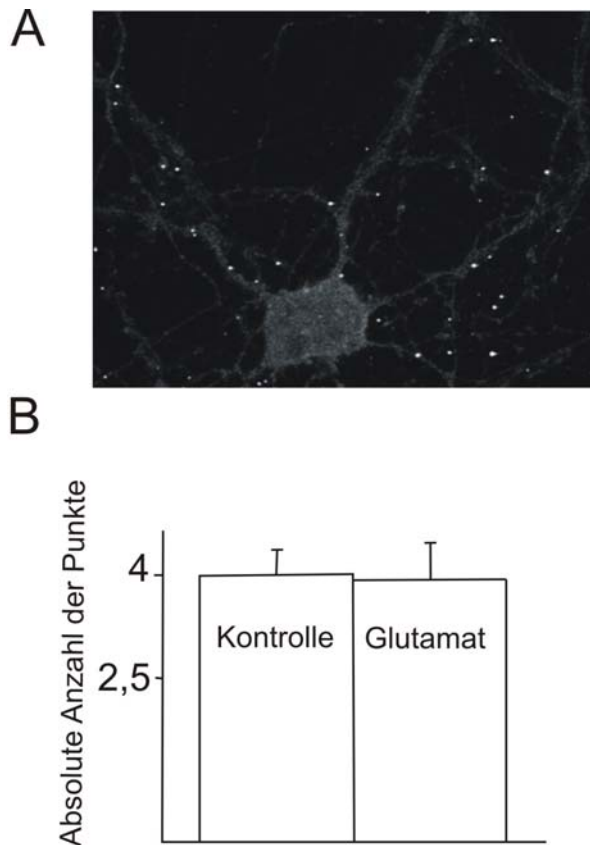


Abbildung 37: Wirkung einer Glutamat 100 $\mu$ M/Glycin10 $\mu$ M Stimulation in primärer, hippocampaler Zellkultur auf die Oberflächenexpression von NR1 in proximalen Dendriten. A Beispiel für ein NR1(anti-Maus; grün; nicht permeabilisierende Bedingungen) immunopositives Neuron.

B Quantifizierung der Oberflächenexpression in absoluten Zahlen der NR 1 immunoreaktiven Punkte in Kontrollzellen und Glutamat/Glycin stimulierten Zellen.

Bei der Betrachtung proximaler Dendriten fiel auf, dass eine 5 minütige Glutamat/Glycin Stimulation keine Auswirkung auf die NR1 Oberflächenexpression hatte. Also konnte man davon ausgehen, dass die Glutamat Stimulation wie in der Literatur beschrieben eine schnelle Umverteilung der GluR1 immunopositiven Punkte bewirken sollte, aber keine schnellen Änderungen der Verteilung von NR1 immunopositiven Punkten.

#### 4.6. Wirkung der Stimulation mit C-Typ natriuretischem Peptid in Zellkultur

In ersten Experimenten wurde CNP in der Zellkultur appliziert und Bildausschnitte von proximalen Dendriten mit denen auf sie projizierenden Terminalien betrachtet und mit Kontrollkulturen verglichen, um zu sehen, ob nach CNP Applikation qualitative Änderungen erkennbar waren.

Qualitativ waren nach einer 100nM CNP Stimulation vermehrt SynapsinI Punkte zu sehen im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollgruppe (Abb. 38 B, dritte Reihe). Scheinbar hat eine 20 minütige CNP Applikation einen präsynaptischen Effekt.

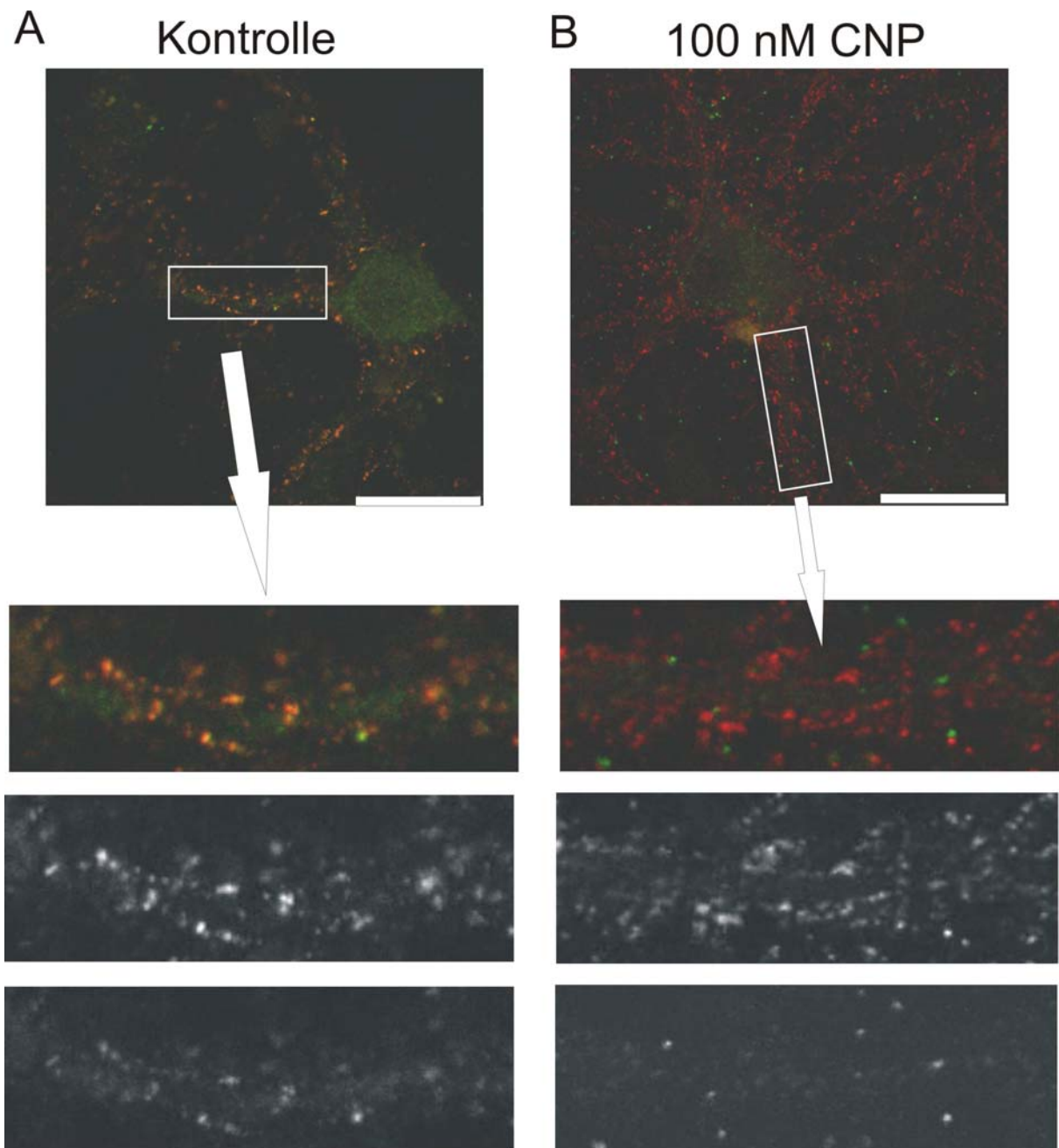


Abbildung 38: Beispiel für ein Stimulationsexperiment:  
 die Ausschnittvergrößerungen zeigen in der ersten Reihe übereinandergelegte Kanäle des Gesamtbildes, die zweite Reihe zeigt den übereinandergelegten Kanal von vergrößerten Bildausschnitten proximaler Dendriten und den auf sie projizierenden Terminalien. Die dritte Reihe zeigt SynapsinI Immunoreaktivität, die vierte Reihe zeigt GluR1 Immunoreaktivität. SynapsinI (anti-Kaninchen; rot; permeabilisierende Bedingungen) GluR1 (anti-Maus; grün; nicht permeabilisierende Bedingungen). Balken= 25µm  
 A ein unstimuliertes pyramidales Neuron.  
 B ein mit 100 nM CNP stimuliertes Neuron.

#### **4.6.1. Quantifizierung des Effektes von C-Typ natriuretischen Peptid auf die GluR1 Oberflächenexpression**

Der Parameter der Oberflächenexpression von GluR1 kann als postsynaptischer Marker für die Expression von synaptischer Plastizität in Zellkultur dienen.

Um zu sehen, ob eine CNP Stimulation ähnliche Auswirkungen auf die postsynaptische GluR1 Oberflächenexpression hat, wie nach Stimulation mit verschiedenen cGMP Konzentrationen, wurde die Anzahl der GluR1 immunpositiven Punkte nach Stimulation in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt.

Die GluR1 Oberflächenexpression der mit Glutamat stimulierten Positivkontrolle war um  $136 \pm 22,3\%$  erhöht gegenüber der Kontrolle. Die zweite Positivkontrolle ( $500\mu\text{M}$  cGMP) hatte den ausgeprägtesten Effekt auf die Rezeptoren Oberflächenexpression ( $364 \pm 40\%$ , Abb. 39). Die aufsteigende Reihe von 8-Br-cGMP Konzentrationen zeigte einen anscheinend Dosis abhängigen Effekt ( $1\mu\text{M}$  8-Br-cGMP =  $78 \pm 6\%$ ;  $10\mu\text{M}$  8-Br-cGMP =  $116 \pm 7,4\%$ ;  $100\mu\text{M}$  8-Br-cGMP =  $234 \pm 14\%$ ; Abb. 39).



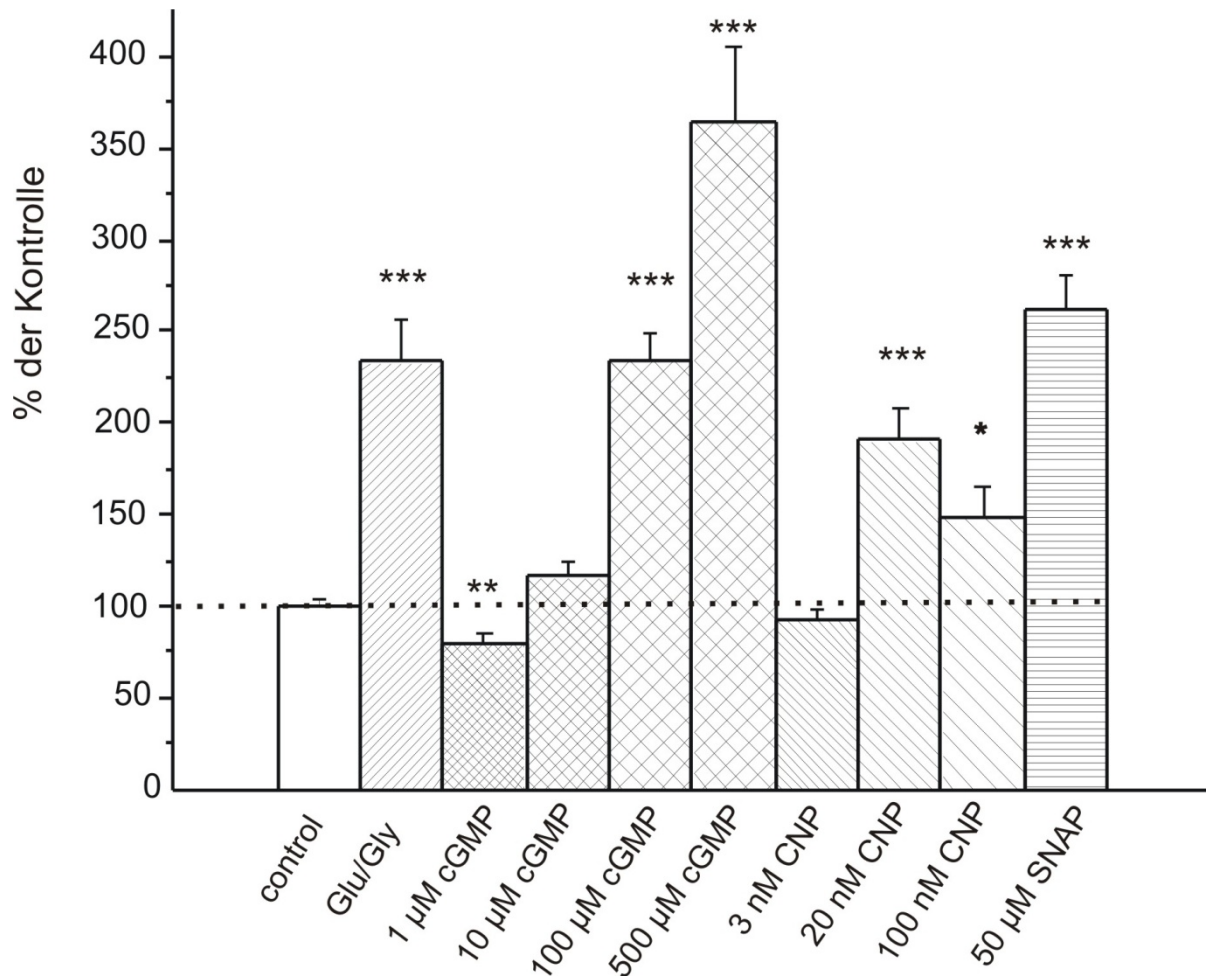


Abbildung 39: GluR1 Immunoreaktivität nach verschiedenen Stimuli. Angegeben ist die Anzahl der Immunofluoreszenzpunkte als % der Kontrolle. Die angegebenen Fehler sind Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Signifikanzen sind angegeben als zweiseitige, ungepaarte t-Tests der jeweiligen Stimulationsgruppe gegen die Kontrolle (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\* =  $p < 0,0001$ ). Glu/Gly = Glutamat 100 $\mu$ M/ Glycin 10 $\mu$ M.

Eine Stimulation mit dem NO-Donor SNAP sollte postsynaptisch die GluR1 Expression ähnlich beeinflussen, wie eine Potenzierung nach der Stimulation mit den Positivkontrollen. 50 $\mu$ M SNAP erhöhte die Oberflächenexpression um  $262 \pm 17\%$ , was erwartungsgemäß mit dem Wert der Positivkontrollen Glu/Gly und 500 $\mu$ M 8-Br-cGMP vergleichbar war.

Nach einer Stimulation mit 100 nM CNP erhöhte sich die Immunoreaktivität der an der Oberfläche exprimierten GluR1 Rezeptoruntereinheiten um  $49 \pm 16,3\%$ , nach 20 nM CNP Stimulation um  $90 \pm 1,8\%$  und nach einer Stimulation mit 3 nM erniedrigte sich die Anzahl der GluR1 Punkte um 8% gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 39). 20nM CNP erhöhte die GluR1 Punkte signifikant (zweiseitiger, ungepaarter T-test,  $p < 0,0001$ ), 100nM erhöhte GluR1 Punkte ebenfalls signifikant

( $p < 0,05$ ), 3nM CNP hingegen veränderte die Anzahl der GluR1 Punkte nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (zweiseitiger, ungepaarter T-test,  $p > 0,05$ ). Somit ist die 100nM Stimulation vergleichbar mit einer 10-100  $\mu\text{M}$  8-Br-cGMP Stimulation, die 2 nM Stimulation ist vergleichbar mit einer 100  $\mu\text{M}$  8-Br-cGMP Stimulation und eine 3nM Stimulation mit einer 1  $\mu\text{M}$  8-Br-cGMP Stimulation. Eine Applikation von 20 und 100 nM CNP zeigte einen Effekt auf die Postsynapse in Form einer Erhöhung der Oberflächenexpression von GluR1 gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Der Effekt von CNP auf die GluR1 Oberflächenexpression ist allerdings weniger ausgeprägt, als in den Positivkontrollen und nach NO-Stimulierung, was auf eine anscheinend geringere, intrazelluläre cGMP Erhöhung nach CNP(10-100 $\mu\text{M}$  cGMP) Stimulation im Vergleich zur cGMP Konzentrationserhöhung nach einer NO-Stimulation zurück zu führen ist (100-500  $\mu\text{M}$  cGMP).

#### **4.6.2. Effekt des C-Typ natriuretischen Peptides auf die Verteilung des präsynaptischen Vesikelproteins SynapsinI**

Da bekannt ist, dass präsynaptische Vesikelproteine nach einer Glutamat Stimulation vermehrt in Terminalien anzutreffen sind, testete ich wie sich eine CNP Stimulation auf die präsynaptische Verteilung im Vergleich zu einer NO Stimulation auswirkt. Die Glu/Gly Positivkontrolle erhöhte die präsynaptische Immunoreaktion auf  $49 \pm 15\%$  der Kontrolle. Auch die Positivkontrolle mit 500  $\mu\text{M}$  8-Br-cGMP Stimulation erhöhte die präsynaptischen Punkte auf  $96 \pm 16\%$  der Kontrolle (Abb.40). Die aufsteigende 8-Br-cGMP Konzentration schien Dosis abhängig auf die Präsynapse zu wirken (1 $\mu\text{M}$  8-Br-cGMP =  $110 \pm 6\%$ ; 10  $\mu\text{M}$  8-Br-cGMP =  $137 \pm 7,4\%$ ; 100  $\mu\text{M}$  =  $201 \pm 15,7\%$ ; Abb.40)

Nach 20 minütiger CNP Stimulation mit 100 nM CNP stieg die Anzahl der präsynaptischen Punkte um  $57 \pm 10,4\%$  an, was vergleichbar war mit dem Anstieg der Anzahl nach einer NO-Donor Stimulation ( $41 \pm 9\%$ ).

Die Anzahl der immunopositiven SynapsinI Punkte nach einer 20 nM CNP Stimulation ( $183 \pm 12,4\%$ ), war vergleichbar mit einer 500  $\mu\text{M}$  8-Br-cGMP ( $196 \pm 16\%$ ) Stimulation. Eine 3nM CNP Stimulation ( $110 \pm 6,7\%$ ) war vergleichbar mit einer 1  $\mu\text{M}$  8-Br-cGMP Stimulation ( $110 \pm 9,5\%$ ).

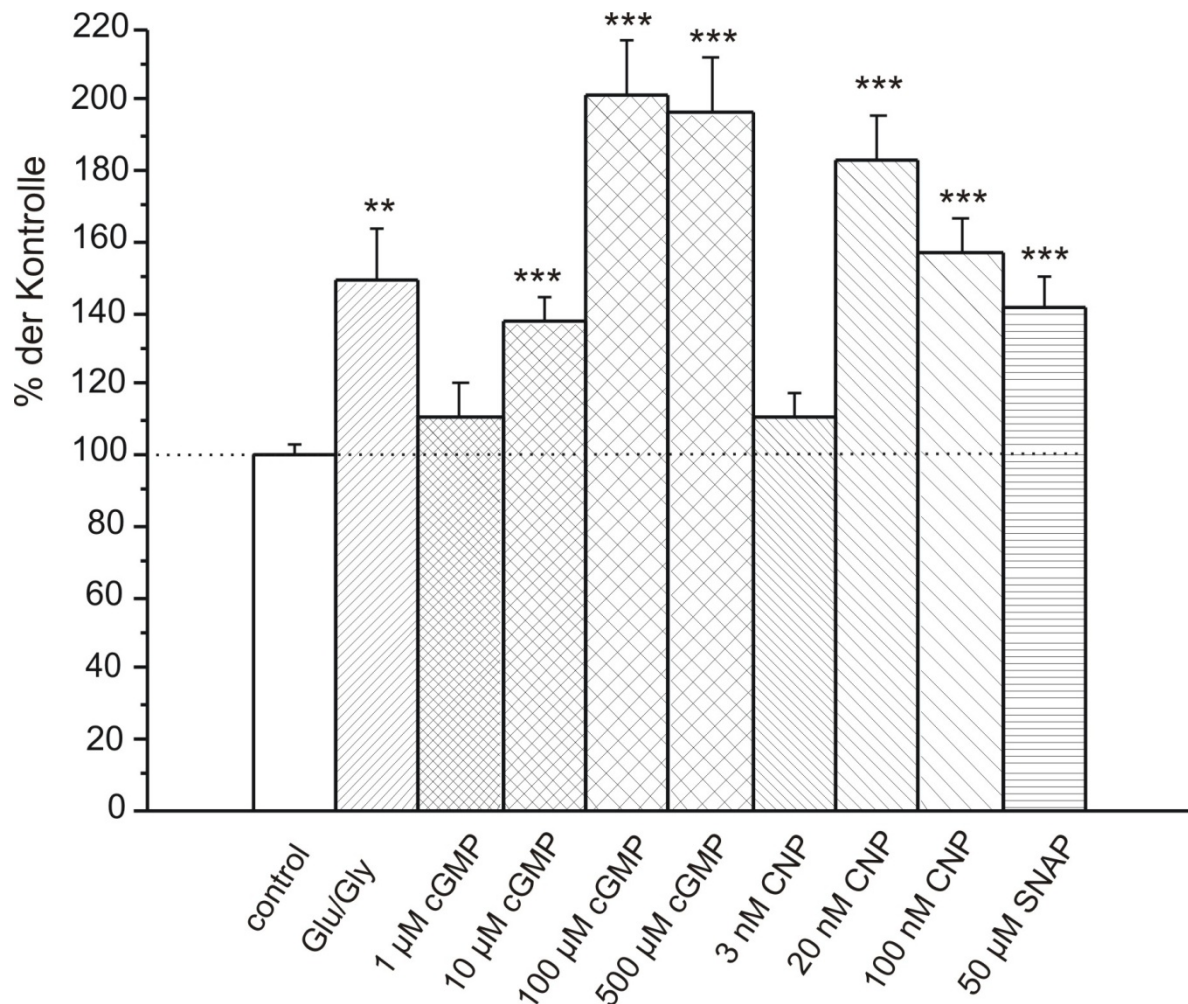


Abbildung 40: Anzahl der relativen SynapsinI immunoreaktiven Punkten nach verschiedenen Stimuli. Die angegebenen Fehler sind Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Statistische Signifikanzen sind angegeben als zweiseitige, ungepaarte t-Tests (\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\* =  $p < 0,0001$ ).

Präsynaptisch kam eine NO Stimulation einer Wirkung von 100 nM CNP gleich und war mit einer intrazellulären cGMP Erhöhung um 10-100 µM cGMP vergleichbar. Eine 20 nM CNP Konzentration war vergleichbar mit der Wirkung einer intrazellulären cGMP Konzentrationserhöhung um 500 µM cGMP und verdoppelte die präsynaptische SynapsinI Punkte im Vergleich zu der Aktivierung des NO-Signalweges.

### **4.6.3. Effekt des C-Typ natriuretischen Peptides auf die Kolokalisation von SynapsinI mit GluR1**

Der Parameter der synaptischen Lokalisation von GluR1 Rezeptoren gibt Auskunft über die synaptische Aktivität in einem Netzwerk beziehungsweise über die Anzahl funktioneller Synapsen (Wang et al. 2005). Mit Hinblick auf diesen Parameter wollte ich prüfen, ob CNP einen Einfluss auf die Netzwerkaktivität in der Zellkultur hat.

Die Glu/Gly Stimulation erhöhte die Kolokalisation um  $98 \pm 25\%$ , die  $500 \mu\text{M}$  8-Br-cGMP Stimulation erhöhte die Kolokalisation am stärksten um  $311 \pm 43\%$  gegenüber der Kontrolle (Abb.41). Die aufsteigenden 8-Br-cGMP Stimulationen wies bei der Kolokalisation, wie auch schon bei den bei den anderen Parametern anscheinend eine dosisabhängige Wirkung auf ( $1 \mu\text{M}$  8-Br-cGMP =  $98 \pm 13\%$ ;  $10 \mu\text{M}$  8-Br-cGMP =  $134 \pm 20,4\%$ ;  $100 \mu\text{M}$  =  $301 \pm 30\%$ ; Abb.41).

Nach einer Stimulation mit  $100 \text{ nM}$  CNP erhöhte sich die Kolokalisation um  $38 \pm 14,5 \%$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Dieser Wert ist vergleichbar mit dem Wert nach der Gabe des NO-Donors SNAP von  $29 \pm 10,6\%$ . Eine  $20 \text{ nM}$  CNP Stimulation bewirkte eine Steigerung der Kolokalisation von  $103 \pm 18,6\%$ . Somit bewirkt die CNP Stimulation einen Anstieg der Kolokalisation, wie nach einer intrazelluläre cGMP Konzentrationserhöhung zwischen  $10 \mu\text{M}$  cGMP und  $100 \mu\text{M}$  cGMP. Nach  $3 \text{ nM}$  CNP Stimulation wurde die Kolokalisation hingegen signifikant reduziert und machte nur noch  $69 \pm 5,3 \%$  der Kontrolle aus.

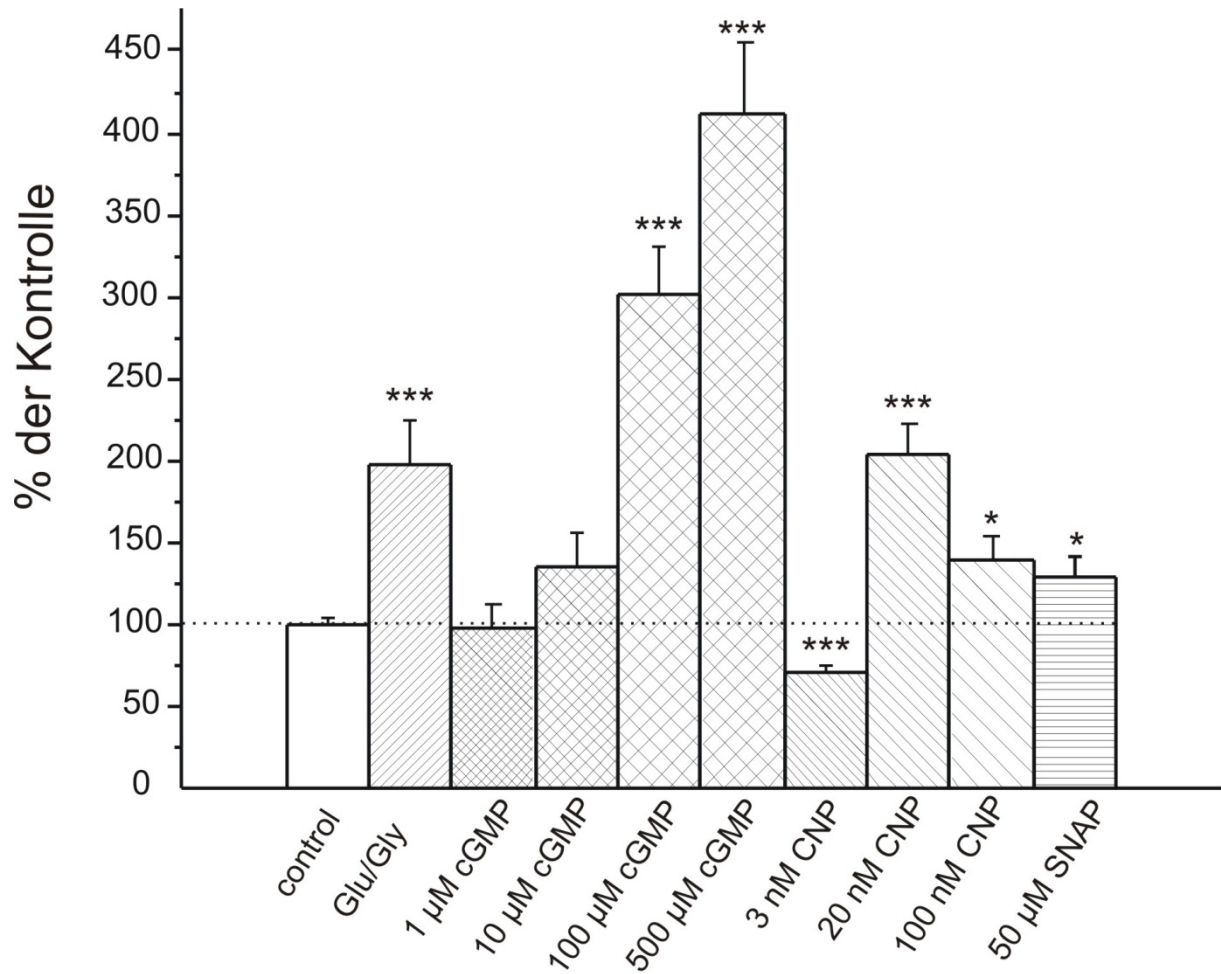


Abbildung 41: Darstellung der Wirkung von CNP auf die Kolokalisation von SynapsinI mit GluR1. Statistische Signifikanzen sind angegeben als zweiseitige, ungepaarte t-Tests (\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,0001$ ). Die angegebenen Fehler sind Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

## **5. Diskussion**

### **5.1. C-Typ natriuretisches Peptid und zelluläre Aspekte des Lernens**

Das natriuretische Peptid CNP ist das am häufigsten im humanen Liquor vorkommende Hormonpeptid (Kaneko et al., 1993). Es verstärkt durch das Corticotropin Releasing Hormon (CRH) die Adrenocorticotropin (ACTH) Ausschüttung (Kellner et al., 1997). In geringen Dosen von 100-200ng intraventrikulär injiziert wirkt CNP anxiolytisch (Biro et al., 1996), in höheren Dosen jedoch anxiogen (Montkowski et al., 1998). Außerdem faszilitiert CNP Lernen in einem passiven Vermeidungstest (Telegdy et al., 1999). Der Rezeptor GC-B und CNP selbst sind weitläufig im Hippokampus exprimiert (Herman et al., 1993; Langub et al., 1995). Insbesondere findet man eine starke GC-B Expression in der temporalen CA1 Region, der septalen CA2 Region und dem Gyrus Dentatus (Herman et al., 1996). Die Expression im Gyrus Dentatus stimmt mit Befunden überein, dass natriuretische Afferenzen aus dem Entorhinalen Cortex über den Tractus perforans den Gyrus Dentatus und wahrscheinlich auch die Area CA1 innervieren (Herman et al., 1996). Die mRNA des CNP precursor Peptides ppCNP wurde in CA1, CA2 und CA3 nachgewiesen (Langub et al., 1995). Damit wurde die ursprüngliche Annahme relativiert, dass die in der Area CA1 exprimierten GC-B Rezeptoren nur durch lokale CNP Produktion aktiviert werden, da wenig Peptid in den Afferenzen der pyramidalen Neuronen gebildet wird (Swanson et al., 1987). Außer der Lokalisation gibt es keine Daten über die spezifische physiologische Funktion des Hormonpeptides im Hippokampus.

Der Rezeptor GC-B wird hauptsächlich in Neuronen exprimiert, wohingegen GC-A in Neuronen und Astrozyten exprimiert wird (Wiedemann et al., 2000). Mit immunozytochemischen Methoden konnte eine starke somatische Immunoreaktivität, wie auch eine Immunoreaktivität in dendritischen Fortsätzen in hippokampaler Zellkultur beobachtet werden (Brackmann et al., 2005). GC-B produziert intrazellulär den „second-messenger“ cGMP, der im Hippokampus eine wichtige Rolle im NO/cGMP/PKG Signalweg, während Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression spielt. Die durch CNP verbesserte Konsolidierung der Gedächtnisbildung in einem passiven Vermeidungslerntest konnte über dopaminerge, muskarinische und

cholinerge Rezeptoren und NO moduliert werden (Telegdy et al., 1999). Die Autoren nahmen an, dass CNP die NO Synthase stimuliert und das produzierte NO die Konsolidierung der gespeicherten Information verbessert. Alternativ kann ein „Crosstalk“ zwischen intrazellulären Signalkaskaden angenommen werden. Diese Daten führten zu der in dieser Arbeit untersuchten Hypothese, dass CNP Corticosteroid unabhängige Wirkungen auf zelluläre Aspekte des Lernens im Hippokampus haben könnte, welche möglicherweise über den cGMP Signalweg vermittelt sind.

### **5.1.1. C-Typ natriuretisches Peptid moduliert Metaplastizität in CA1**

Tatsächlich konnten wir Effekte von CNP auf synaptische Plastizität nachweisen, wobei das Ausmaß von LTP reduziert und die Induktion von LTD erleichtert wurde. Dieser Effekt auf die Metaplastizität war nicht durch einen direkten Effekt auf neuronale Erregbarkeit bedingt, da die basalen Signale durch CNP nicht modifiziert worden sind (Ergebnisse, Abb.16).

Gegenüber unbehandelten Schnitten zeigten jene, welche mit einstündiger Badapplikation von 100nM CNP behandelt wurden, eine Reduzierung der LTP im Stratum Pyramidale (SP). Dies war bei LTP Induktion mit 100, 50, 30 und 10Hz Stimulation der Fall (Ergebnisse, Abb.17). Die stärkste Reduzierung der LTP durch CNP gegenüber unbehandelten Schnitten zeigte sich nach 30 und nach 50 Hz Induktionsprotokollen (Ergebnisse, Tabelle 1).

LFS Protokolle von 5 und 1 Hz bewirkten in Schnitten, die zuvor mit CNP behandelt wurden, eine verstärkte LTD der Populationsspike (PS) Amplitude, wobei der CNP Effekt nach einer 1 Hz LFS am ausgeprägtesten war (Ergebnisse, Abb. 18).

Trägt man HFS und LFS Werte der Änderung der PS Amplitude über der Frequenz auf, so erhält man den Schwellenwert der „sliding threshold“ Funktion (Ergebnisse, Abb.19 B), welcher die Frequenz angibt, bei der LTD in LTP übergeht. Dies war bei den vorliegenden Messungen in Kontrollschnitten bei  $\theta_{LTD/P1} = 15$  Hz der Fall. Eine CNP Applikation hat den Schwellenwert auf  $\theta_{LTD/P2} = 43,3$  Hz verschoben.

Es ist bekannt, dass die bidirektionale Plastizität in CA1 NMDA Rezeptor abhängig ist (Dudek und Bear, 1992). Deshalb ist der LTD/LTP Schwellenwert abhängig von der NMDA Rezeptoraktivität und damit vom  $Ca^{2+}$  Einstrom in die postsynaptische Zelle

(Bear, 1995). Der molekulare Mechanismus einer Verschiebung der Schwellenwertfunktion in unseren Experimenten ist aber unklar. Nach den Experimenten von Bear und Kollegen könnte spekuliert werden, dass ein über NMDA Rezeptoren bedingter  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom zur Aktivierung der NO Synthase und vermehrter Produktion von cGMP führt. Allerdings ist in diesem Szenario die LTP Induktion erleichtert und nicht wie in unserem Szenario erschwert. Jedoch wurde auch hypothetisiert, dass ein geringerer cGMP Anstieg andere Mechanismen aktiviert die keine Potenzierung, sondern synaptische Depression bewirken (Gage et al., 1997).

Eine mögliche präsynaptische Ursache für die Reduzierung der LTP nach CNP Applikation könnte eine Änderung der Transmitterfreisetzungsrates sein. Ein Maß für diese ergibt sich durch die Messung des initialen „slopes“ des Feldpotentials (FP) gemessen im Stratum Radiatum (SR). Nach Induktion von LTP in Gegenwart von CNP ist in Area CA1 der FP slope reduziert (Ergebnisse, Abb.20). Der slope des FP wurde nach einer 30 und 50 Hz HFS am stärksten reduziert und es zeigte sich in den im Stratum Radiatum abgeleiteten Potentialen bei Applikation von CNP noch LTD während im Stratum Pyramidale bereits LTP nachweisbar war. Dies könnte darauf hindeuten, dass die reduzierende Wirkung von CNP auf die LTP in CA1 eine präsynaptische Ursache hat die teilweise durch einen erregbarkeitssteigernden Effekt bei der Induktion von Aktionspotentialen kompensiert wird.

Eine Wirkung von CNP auf homöostatische Plastizität in Form einer Erniedrigung der postsynaptischen Erregbarkeit, könnte in zukünftigen Experimenten *in vitro* mit extrazellulären Ableitungen anhand von heterosynaptischen LTP und LTD Protokollen untersucht werden.

Insgesamt gesehen hatte CNP auf das Summenpotential im Stratum Pyramidale einen ausgeprägteren Effekt als auf den slope des Feldpotentials im Stratum Radiatum nach LTP und LTD Induktion. Dies spricht für eine stärkere Wirkung von CNP auf die intrinsische Erregbarkeit der Zellen im SP, als auf die Transmitterfreisetzung im SR (Ergebnisse, Tabelle 3 und 4). Denkbar wäre auch ein Effekt auf die Interneurone.

Um weitere Hinweise für mögliche Ursachen für die Wirkung von CNP auf die bidirektionale Plastizität zu erhalten, wurden die einzelnen Komponenten reizinduzierter Potentiale im Stratum Pyramidale vermessen. Die initiale Positivität entspricht dem erregenden synaptischen Potential. Das nachfolgende negative



Potential beruht auf der synchronen Induktion von Aktionspotentialen. Die folgende Positivität wird zum größeren Teil durch Feedback -Hemmung mit bedingt. Überlagert ist das Signal schließlich durch Feedforward-Hemmung. Vergleicht man die Wirkung von CNP auf die Einwärtskomponente des PS (Ergebnisse, Abb. 23 A) und auf die rein positive Komponente nach dem PS (Ergebnisse, Abb. 24 A), so wurde dieses positive Nachpotential um 81% (Ergebnisse, Abb. 24) reduziert, wohingegen der PS um 30% reduziert wurde. Damit könnte die Diskrepanz zwischen dem Effekt von CNP auf den Populationsspike und dem Effekt auf das Feldpotential im SR teilweise erklärt werden. Dies bestätigte sich durch die Analyse der Nachpotentiale in Schnitten ohne CA3 und mit 5  $\mu$ M Bicucullin. In diesen Messungen wurde das rein positive Nachpotential nicht mehr durch CNP reduziert (Ergebnisse, Abb. 26).

### **5.1.2. Die Wirkung des C-Typ natriuretischen Peptides auf Langzeitpotenzierung ist spezifisch**

Um zu testen, ob CNP spezifisch im Hippokampus exprimierte GC-B Rezeptoren anspricht, wurde ein Antagonist des Rezeptors gleichzeitig mit dem Agonisten appliziert. Es zeigte sich, dass der GC-B Antagonist HS-142-1 (Tian und Yang, 2006) die CNP Wirkung vollständig aufheben konnte, das heißt bei gleichzeitiger Applikation war nach einer HFS kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle mehr festzustellen (Ergebnisse, Abb. 30).

### **5.1.3. Wirkung von C-Typ natriuretischem Peptid ohne inhibitorische Netzwerkkomponente**

Der Hypothese folgend, dass es einen Zusammenhang zwischen der Änderung der bidirektionalen Plastizität und einer Modulierung der inhibitorischen Netzwerkkomponente durch CNP geben könnte, wurden Experimente mit dissektierter CA3 und 5  $\mu$ M Bicucullin durchgeführt. In diesen Schnitten war also der größte Teil der GABAergen, inhibitorischen Wirkungen ausgeschaltet (Empson und Heinemann 1995).

Hierbei zeigte sich, dass CNP Applikation immer noch zu einer Reduzierung der LTP des PS im SP und des FP im SR nach einer 30 Hz HFS führte. Allerdings betrug die reduzierende Wirkung von CNP nur noch ungefähr die Hälfte der Wirkung in Schnitten mit intakter Inhibition (Ergebnisse, Tabelle 5).

Die reduzierende Wirkung von CNP auf die LTP der PS Amplitude und auf den FP slope, wird in Schnitten ohne CA3 mit Bicucullin um ungefähr 50% abgeschwächt. Nach Applikation von CNP und 30 Hz HFS befanden sich die PS Amplitude und der FP slope im LTD Bereich. In intakten Schnitten ohne Bicucullin war dies ebenfalls der Fall. Allerdings sah man in Schnitten ohne CA3 in Anwesenheit von Bicucullin im FP slope nach CNP Applikation nur eine Depression von 91%, wo in intakten Schnitten eine Depression von 83% zu sehen war. Dies deutet darauf hin, dass CNP eine Disinhibition bewirkt.

Hingegen wurde der Effekt von CNP auf LTD nach 1 Hz LFS in Schnitten mit abgetrenntem CA3 noch verstärkt (Ergebnisse, Abb.27). Die LTD der PS Amplitude wurde nach CNP Applikation auf 57% mehr als verdoppelt. Die Depression des FP slopes nach 1 Hz LFS blieb hingegen nahezu gleich in Schnitten mit und ohne CA3 (Ergebnisse, Tabelle 6).

Das Nachpotential des PS im SP wurde durch CNP nach HFS Stimulationen stark reduziert. In Schnitten ohne CA3 mit Bicucullin war eine solche Reduzierung des Nachpotentials nicht mehr feststellbar, was ebenfalls auf eine durch CNP bewirkte Disinhibition hindeutet. Um eine Interneuron spezifische Wirkung von CNP nachzuweisen, könnte man in zukünftigen Patch-Clamp Experimenten IPSC (Inhibitory Postsynaptic Currents) und mIPSCs (miniature Inhibitory Postsynaptic Currents) nach CNP Applikation untersuchen.

#### **5.1.4. Applikation des C-Typ natriuretischen Peptides führt zu einer Modulierung von Kurzzeitplastizität**

Neben unterschiedlichen Wirkungen auf erregende und hemmende synaptische Transmission könnte CNP über cGMP auch die präsynaptische Transmitterfreisetzung beeinflussen. Allerdings ist zur Zeit unklar, ob es überhaupt präsynaptische CNP Rezeptoren gibt. Jedoch konnte ich in meinen Zellkulturexperimenten einen präsynaptischen Effekt nachweisen. Ich habe deshalb die Wirkung von CNP auf Kurzzeitplastizität untersucht.

Synaptische Faszilitierung, gemessen als Zunahme im Paired Pulse Index wurde bereits unter Baseline Bedingungen durch CNP signifikant reduziert. (Ergebnisse, Abb.28). Diese Reduzierung wurde wie der Effekt auf LTP durch den GC-B Antagonist HS -142-1 aufgehoben. Die Reduzierung des Paired Pulse Indexes zeigte sich auch, wenn der Paired Pulse Index nach einer 30 Hz HFS vermessen wurde. Auffällig waren die Ergebnisse, die in Gegenwart von 5  $\mu$ M Bicucullin erhoben wurden. In diesen Experimenten hatte CNP keinen Effekt auf den Paired Pulse Index (Ergebnisse, Abb.29). Dies könnte bedeuten, dass die Veränderung des Paired Pulse Index hauptsächlich auf eine Modulation von GABAerger Übertragung im Hippokampus zurückzuführen ist. Inwieweit auch präsynaptische Transmitterfreisetzung, eventuell differenziert auf Primärzellen und Interneurone an diesen Effekten beteiligt ist, muss sich in Patch-clamp Experimenten zeigen. In diesen kann Einblick auf die präsynaptische Transmitterfreisetzung genommen werden, indem man die Frequenz von miniature Excitatory Postsynaptic Currents betrachtet.

## **5.2. Signalwege welche möglicherweise den Effekt von CNP vermitteln**

Man hat in den letzten 10 Jahren herausgefunden, dass in Zellkulturen ähnliche Plastizitätsvorgänge nach chemischer oder elektrischer Stimulation zu beobachten sind wie in Akutschnitten. Mit Hilfe des Zellkultursystems ist es möglich prä- und postsynaptische Änderungen von Proteinverteilungen während Plastizitätsvorgängen in Dendriten und Terminalien zu beobachten (Lissin et al., 1998; 1999; Antonova et al., 2001; Wang et al., 2005). Dabei scheint der NO/cGMP/PKG Signalweg an prä- und postsynaptischen Änderungen der Verteilung synaptischer Proteine während einer LTP beteiligt zu sein (Wang et al., 2005). Postsynaptisch ist besonders die GluR1 Oberflächenexpression von Bedeutung für die LTP und LTD Expression (Citric, Malenka, 2008), während präsynaptisch Änderungen in der Anzahl von Vesikelproteinen wie SynapsinI, Synaptophysin und Synuclein immunozytochemisch gemessen werden konnten (Wang et al., 2005, Ninan et al., 2006). Aufgrund meiner elektrophysiologischen Befunde zur CNP Wirkung auf Metaplastizität, wählte ich ein System, welches die Wirkung von CNP im Vergleich zu einer Aktivierung des NO/cGMP Signalweges prä- und postsynaptisch darstellen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde der NO/cGMP Signalweg in Zellkultur mit Hilfe des NO-Donor SNAP aktiviert, darüber hinaus wurde mit aufsteigenden, membrangängigen 8-Br-cGMP Konzentrationen und mit 3, 20 und 100 nM CNP stimuliert, um die prä- und postsynaptische Wirkung von CNP im Vergleich einordnen zu können.

Als präsynaptischen Marker wählte ich SynapsinI. SynapsinI zeigte eine Kollokalisationsrate von 77% mit glutamatergen Terminalien (Ergebnisse, Abb.35). Als postsynaptischen Marker benutzte ich GluR1, da es bekannt ist, dass während plastizitätsartigen Stimulationen mit Glutamat in Zellkultur nur GluR1 AMPA Rezeptoruntereinheiten von einer schnellen dendritischen Umverteilung betroffen sind, nicht aber NR1 NMDA Rezeptor Untereinheiten (Lissin et al., 1999). In dem von mir verwendeten Zellkultursystem konnte ich zeigen, dass eine Glutamat Stimulation keine Auswirkung auf die Oberflächenexpression der NR 1 Untereinheit hat (Ergebnisse, Abb.37).

Es wurden 3 verschiedene Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop der AMPA Rezeptor Untereinheit GluR1 getestet und schließlich ein Antikörper der Firma Santa Cruz gewählt (Ergebnisse, Abb.31 und 32), da dieser Antikörper qualitativ besser erschien als derjenige der Firma Upstate und der Antikörper der Firma Calbiochem zum Zeitpunkt meiner initialen Experimente nicht erhältlich war. Nach dem Test des Antikörpers der Firma Santa Cruz in einer Doppelfärbung mit dem Antikörper der Firma Calbiochem stellte sich heraus, dass der Santa Cruz Antikörper ein stärkeres Hintergrundsignal als der der Firma Calbiochem ergab, ansonsten kollokalisierte das Muster der Rezeptoroberflächenfärbung der beiden GluR1 Antikörper (Ergebnisse, Abb.31). Das Rezeptorsignal des Santa Cruz Antikörpers war im Vergleich zum Hintergrundsignal sehr viel stärker, so dass dies kein Problem in der Bildverarbeitung und anschließenden Analyse darstellte. Die Spezifität des Santa Cruz GluR1 Antikörpers für glutamaterge Synapsen wurde mit einer Doppelfärbung GluR1-VglutI getestet. Man konnte feststellen, dass der benutzte GluR1 Antikörper spezifisch für glutamaterge Synapsen ist (Ergebnisse, Abb.33).

Als interne Positivkontrolle diente eine Stimulation mit Glutamat 100µM Glutamat/ 10µM Glycin. Ich setzte eine Glutamat Stimulation von 100 µM für 5 Minuten ein, als Kompromiss zwischen zwei Stimulationen aus der Literatur, wo 100 µM Glutamat für 15 Minuten als Stimulus verwendet wurde (Lissin et al., 1999) und 200 µM Glutamat in 0 Mg<sup>++</sup> ACSF für eine Minute (Wang et al.2005). Die von mir gewählte Glutamat

Stimulation sollte statt mit  $0 \text{ Mg}^{2+}$  ACSF die NMDA Rezeptoren durch  $10 \text{ }\mu\text{M}$  Glycin verstärkt aktivieren. Als zweite Positivkontrolle wurde eine Stimulation mit  $500 \text{ }\mu\text{M}$  8-Br-cGMP gewählt, welche die Glutamatwirkung simulieren sollte (Wang et al.2005). Die Glutamat und 8-Br-cGMP Stimulationen konnten als Positivkontrollen dienen, da für beide Stimulationen gezeigt wurde, dass sie die GluR1 Oberflächenexpression, die Anzahl präsynaptischer Punkte und deren Kolokalisation erhöhen (Wang et al., 2005). Mit Blockern der PKG und der sGC wurde gezeigt, dass an diesem Vorgang der NO/cGMP/PKG Signalweg beteiligt ist (Wang et al.2005). Die Glutamat Stimulation funktionierte wie erwartet in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle, sie erhöhte erwartungsgemäß die Anzahl der postsynaptischen GluR1 Punkte, der präsynaptischen SynapsinI Punkte, als auch die Kolokalisationsrate der beiden (Ergebnisse, Abb. 39, 40, 41).

Auch die Positivkontrolle  $500\mu\text{M}$  8-Br-cGMP erhöhte GluR1 Oberflächenexpression, SynapsinI Verteilung in Terminalien und Kolokalisation erwartungsgemäß gegenüber der Kontrolle (Ergebnisse Abb. 39, 40,41). Die hier beobachtete stärkere Wirkung von  $500 \text{ }\mu\text{M}$  cGMP auf alle drei Parameter im Vergleich zu einer Glutamat Stimulation ist auf eine längere Applikationszeit von 5 Minuten im Vergleich zur Literatur, wo nur eine Minute stimuliert wurde, zurück zu führen. Nach der Durchführung der beschriebenen Kontrollen verwendete ich die beschriebenen Antikörper gegen SynapsinI und GluR1, um die Wirkung von CNP im Vergleich mit dem NO/cGMP Signalweg in der Zellkultur zu testen. Wie schon von Wang et al. 2005 gezeigt, hatte cGMP und NO auch in der vorliegenden Arbeit einen Effekt auf die Prä- und Postsynapse, wobei eine Stimulation mit aufsteigenden cGMP Konzentrationen einen anscheinend dosisabhängigen Effekt sowohl in der Prä- als auch in der Postsynapse hervorrief. Bisher hatte man angenommen, dass NO nur präsynaptisch als retrograder Transmitter bei der LTP Induktion eine Rolle spielt. Nur im visuellen Cortex konnte bis dahin eine prä- und postsynaptische Involvierung von cGMP bei der Änderung synaptischer Transmission gezeigt werden (Wei et al., 1998).

Die Befunde der Immunocytochemie dieser Arbeit scheinen mit den Befunden der Elektrophysiologie in einem wichtigen Punkt zu korrelieren, nämlich dass CNP sowohl eine prä- als auch eine postsynaptische Wirkung hat.

Postsynaptisch ist die Wirkung von CNP auf GluR1 Rezeptoruntereinheiten schwächer als die Wirkung, die durch eine Stimulation des NO/cGMP Signalweges

hervorgerufen wird. Präsynaptisch ist der Effekt von CNP stärker als nach einer NO Stimulation.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine 20 und 100 nM CNP Stimulation die Oberflächenexpression von GluR1 gegenüber der Kontrolle signifikant steigerte (Ergebnisse, Abb.39). Eine Stimulation von 3 nM zeigte keinen Effekt, was möglicherweise dadurch erklärbar ist, dass 3 nM eine zu geringe Konzentration ist, um die physiologische Situation in Zellkultur zu simulieren.

Allgemein ist es unklar, welche angewendete CNP Konzentration vergleichbar ist mit der *in vitro* Situation des hippokampalen Akutschchnittes oder der physiologischen *in vivo* Situation. In den Gehirnschnitten wurde CNP 100 nM eine Stunde lang appliziert. Das Hormonpeptid musste also durch eine Zellschicht von ca. 100-150  $\mu\text{M}$  tief durch das Gewebe diffundieren, bis es die Zellschicht erreichte, in der sich die Elektroden befanden. Also kann man annehmen, dass eine 100 nM CNP Applikation im Akutschnitt nicht mehr einer Konzentration von 100 nM in der Zellkultur appliziert entspricht. Eine CNP Konzentration zwischen 20-100 nM dürfte am ehesten der *in vitro* Situation in den elektrophysiologischen Experimenten dieser Arbeit entsprechen.

Der maximale Effekt von CNP auf die GluR1 Oberflächenexpression war bei einer 20nM CNP Applikation zu beobachten, dieser Wert war jedoch immer noch geringer als nach einer SNAP und Glutamat Stimulation. Dies ist dadurch erklärbar, dass die Stimulationen mit SNAP und Glutamat/Glycin einer intrazellulären cGMP Erhöhung um 100  $\mu\text{M}$ -500  $\mu\text{M}$  entsprachen wohingegen die CNP Stimulationen nur einer intrazellulären cGMP Konzentrationserhöhung von 10-100  $\mu\text{M}$  entsprachen.

3 nM CNP bewirkte wiederum keine Veränderung gegenüber der Kontrolle.

Präsynaptisch ist eine Veränderung der SynapsinI Verteilung nach einer 100 nM CNP Stimulation vergleichbar mit einer NO Stimulation und einer intrazellulären 10-100  $\mu\text{M}$  cGMP Konzentrationserhöhung. Die 20 nM CNP Stimulation erhöhte die Anzahl der SynapsinI Punkte jedoch um das doppelte im Vergleich zu einer SNAP Stimulierung, was bedeuten könnte, dass CNP einen besonders ausgeprägten Effekt auf die Präsynapse hat.

Es ist nicht klar wie es zu dem Phänomen von vermehrt auftretenden präsynaptischen Proteinen kurz nach einer Stimulierung kommt. Es wird vermutet, dass die Anhäufung von präsynaptischen Proteinclustern einen frühen Prozess der durch Plastizität induzierten Neubildung von Synapsen darstellt. Man nimmt an, dass

NO nach einer HFS die Neubildung von präsynaptischen Proteinclustern in Terminalien triggert, welche dann Filopodien bilden. Diese Filopodien könnten anschließend eine Rolle bei der Neubildung postsynaptischer, dendritischer Spines spielen (Wang et al., 2005). Da man schon nach 1-10 Minuten nach einer Glutamat Stimulation neue präsynaptische Punkte beobachtet hat (Wang et al., 2005), sollte es sich bei diesem Prozess um einen Transportprozess handeln. In der vorliegenden Arbeit ist eine Stimulation mit CNP für 20 Minuten wahrscheinlich ebenfalls zu kurz um Expressionsänderungen zu bewirken, was letztendlich jedoch in Western Blot Experimenten überprüft werden müsste.

Synapsine sind eine durch das ganze Tierreich hoch konservierte Familie von Vesikel assoziierten Phosphoproteinen (Greengard et al., 1993). Funktionell wurden sie mit dem Vorgang der Neurotransmitterfreisetzung assoziiert. Synapsine sind die am häufigsten vorkommenden Vesikelproteine, alleine SynapsinI stellt ca. 6 % der Gesamtmasse an Vesikelproteinen dar. Es gibt 3 verschiedene Gene für Synapsin: SynapsinI, SynapsinII und SynapsinIII (Hilfiker et al., 1998; Hosaka and Sudhof, 1998; Kao et al., 1998; Südhof et al., 1989). Diverse biochemische Studien haben zu einer Hypothese des physiologischen Verhaltens geführt. Im Ruhezustand der Zelle befestigt Synapsin Vesikel am Zytoskelett. Im Zustand der synaptischen Aktivität hingegen werden Synapsine phosphoryliert, dissoziieren weg von den Vesikeln und erlauben eine Mobilisierung der Vesikel und schließlich eine Fusion mit der Zellmembran (De Camilli et al., 1990; Greengard et al., 1993). So dissoziiert SynapsinI während der Aktionspotentialgenerierung weg von Vesikeln und verteilt sich neu in Axonen (Chi P et al., 2001). Die Rate dieser „Umverteilung“ wird von CAMK II kontrolliert. Speziell bei Stimulierung mit tieferen Frequenzen (5 Hz) ist die Kinetik der Vesikelmobilisierung stark von Synapsin 1 und dessen Phosphorylierung abhängig (Chi P. et al., 2003). Es ist bekannt, dass SynapsinI einen „negativen“, verlangsamenden Effekt auf den Prozess des „vesicle cyclings“ hat (Chi et al., 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass SynapsinI nach direkter Injektion in präsynaptische Terminalien die Transmitterfreisetzung inhibiert (LLinas et al., 1990). In diesem Zusammenhang könnte die immunozytochemisch gemessene Steigerung der SynapsinI Punkte, durch CNP eine Änderung der Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit bedeuten.

Dafür gab es in dieser Studie elektrophysiologische Hinweise in Form der Reduzierung des FP slopes im SR und in Form der Wirkung von CNP auf den Paired Pulse Index.

Aus Experimenten mit SynapsinI Knockout Mäusen ist bekannt, dass der Knockout eine Paired Pulse Faszilitierung gegenüber dem Wildtyp bewirkt (Rosahl et al. 1995). Im vorliegenden Fall wurde der SynapsinI Gehalt in präsynaptischen Terminalien durch CNP Stimulation erhöht und man sah eine Reduzierung der Paired Pulse Faszilitierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Aus weiteren SynapsinI Knockout Studien weiß man, dass besonders inhibitorische Terminalien betroffen sind, schaltet man das Gen aus. (Baldelli et al., 2007). Der readily releasable pool (RRP) inhibitorischer Synapsen wird durch das Vorhandensein von weniger SynapsinI Molekülen, als in Wildtyp Tieren, reduziert. So könnte man im Umkehrschluss annehmen, dass eine Erhöhung des SynapsinI Gehaltes durch CNP in präsynaptischen Terminalien, zu einer Erhöhung des RRP speziell an inhibitorischen Synapsen führt und durch seinen negativen Effekt auf das „vesicle cycling“ die Transmitterfreisetzungsgeschwindigkeit verlangsamt.

Man weiß, dass SynapsinI/II Knockout Mäuse Epilepsie entwickeln. Die Knockouts der einzelnen Allele jedoch zeigen seltene „seizures“ als der Doppel-knockout und nur eine leichte Reduzierung des synaptischen Vesikel Pools (Rosahl et al., 1995). Insbesondere GABAerge Interneurone, welche hochfrequent feuern, könnten so vermutete man, von Veränderungen des synaptischen SynapsinI Gehaltes betroffen sein (Rosahl et al., 1995). Genetische Deletion von Synapsin Genen (SYN) erzeugen einen epileptischen Genotyp mit „seizures“, welche im Alter von 2-3 Monaten auftauchen und danach vermehrt entstehen (Rosahl et al., 1995; Gitler et al., 2004). Darüberhinaus wurde von einer nonsense Mutation in dem SynapsinI Gen SYN I berichtet, welche assoziiert wurde mit einer familiären X-linked Epilepsie (Garcia et al., 2004). Der epileptische Phänotyp legt nahe, dass SynapsinI eine Rolle spielt bei der Kontrolle der Erregbarkeit kortikaler Netzwerke. Betrachtet man exzitatorische Synapsen, so bewirkt eine SYN Deletion eine Reduzierung der Größe des RP von synaptischen Vesikeln (Li et al., 1995; Takei et al., 1995; Ryan et al., 1996; Siksou et al., 2007) ohne die Transmitterfreisetzung nach einem einzelnen, isolierten Aktionspotential zu verändern.

Bei Inhibitorischen Synapsen in SynapsinI Knockout Mäusen hingegen wird der IPSC nach einem einzelnen Aktionspotential vermindert (Baldelli et al., 2007).



Eine Erhöhung des SynapsinI Gehaltes in präsynaptischen, glutamatergen Terminalien könnte durch eine Verlangsamung des „vesicle cyclings“ zu dem beobachteten, reduzierenden Effekt von CNP nach HFS auf den glutamatergen Teil der postsynaptischen Antwort beitragen.

Eine Steigerung des SynapsinI Gehaltes in präsynaptischen, GABAergen Terminalien hingegen könnte auf demselben Weg zu dem reduzierenden Effekt von CNP auf das Nachpotential der postsynaptischen Antwort führen. Ein möglicher Mechanismus für eine präsynaptische Modulation der Transmitterfreisetzungsgeschwindigkeit durch ein erhöhtes SynapsinI Vorkommen in Terminalien durch CNP Applikation, könnte über den cGMP/PKG/CAMKII Weg führen, denn SynapsinI wird durch CAMKII reguliert und reguliert selbst wiederum die Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit (LLinas et al., 1990).

Um einen direkten Zusammenhang zwischen vermehrtem SynapsinI Vorkommen in Terminalien durch eine CNP Wirkung und den hier gezeigten Effekten von CNP auf Metaplastizität zu demonstrieren, könnte man die extrazellulären Messungen dieser Arbeit in Akutschnitten von SynapsinI Knockout Tieren nach CNP Applikation wiederholen und würde einen verminderten Effekt von CNP auf die PS Amplitude im SP und einen ebenfalls verminderten Effekt auf den FP slope im SR im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit erwarten.

Vergleicht man die synaptische Lokalisation von GluR1 als Parameter der Anzahl von funktionalen Synapsen, so lag eine 100 nM CNP und 20 nM CNP Stimulation statistisch signifikant über der Kontrollgruppe, jedoch fiel die Kolokalisation weit geringer aus als nach einer 100 beziehungsweise 500  $\mu$ M 8-Br-cGMP Stimulation. Eine verringerte Kolokalisation im Vergleich zu 100  $\mu$ M und 500  $\mu$ M 8-Br-cGMP der CNP Stimulationsgruppe, könnte auch auf eine gesteigerte Anzahl von SynapsinI Punkten in GABAergen, präsynaptischen Terminalien zurückzuführen sein, welche nicht mit einem GluR1 positivem Immunostaining kolokalisieren würden. Die CNP Stimulationen entsprachen im Hinblick auf den Parameter Kolokalisation wiederum einer intrazellulären cGMP Konzentrationserhöhung von 10-100  $\mu$ M 8-Br-cGMP. Auffällig ist, dass eine CNP Stimulation, betrachtet man die Parameter Kolokalisation und GluR1 Oberflächenexpression, einer intrazellulären cGMP Konzentrationserhöhung von 10-100  $\mu$ M cGMP entsprach. Betrachtet man jedoch die Veränderung der SynapsinI Verteilung, so entsprach die CNP Stimulation eher einer

100-500  $\mu\text{M}$  cGMP Konzentrationserhöhung. Dies könnte daraufhin deuten, dass CNP präsynaptisch eine stärkere cGMP Produktion bewirkt als postsynaptisch vielleicht dadurch verursacht, dass präsynaptisch mehr GC-B Rezeptoren exprimiert werden.

Allgemein müsste man CNP in zusätzlichen Experimenten zusammen mit einem Blocker der PKG (KT 2853, siehe auch Einleitung, Abb.2) applizieren, um eine direkte Wirkung von CNP über den cGMP/PKG Signalweg nachweisen zu können. In nicht stimulierten Zellen kolokalisierten in den vorliegenden Experimenten nur circa 20% der SynapsinI Punkte mit GluR1 Punkten, in der Literatur ist ein Wert von 30% für die Kolokalisation von Synaptophysin mit GluR1 beschrieben (Wang et al., 2005). Dies wird auch reflektiert in der relativ geringen Kolokalisation von Synaptophysin mit SynapsinI von 47% (Ergebnisse Abb. 36) im Vergleich zu 60% in der Literatur (Wang et al., 2005). Unterschiedliche Stadien der Synaptogenese in den hier verwendeten Zellkulturen im Vergleich zur Literatur könnten solche Unterschiede in der Rezeptorverteilung und Kolokalisation bedingen oder aber auch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper und unterschiedliche Protokollbedingungen, wie die Fixierung der Kulturen.

Die nicht mit GluR1 kolocalisierenden SynapsinI Punkte sollten mit NMDA Rezeptoren oder GABA Rezeptoren kolocalisieren oder Teil von Transportpaketen sein (Ahmari et al., 2000) oder sie werden während der Synaptogenese vor den postsynaptischen Punkten gebildet (Cohen-Cory, 2002).

Die relativ niedrige Kolokalisation könnte hervorgerufen sein durch eine nicht abgeschlossene Synaptogenese oder durch eine methodische Limitierung der Detektion von Kolokalisation.

Die Verstärkung der LTD nach CNP Applikation könnte über den bekannten cGMP/PKG/cADPR /Ryano-dinrezeptor Signalweg erklärbar sein, denn *in vitro* wurde gezeigt, dass eine erhöhte cGMP Konzentration in Akutschnitten die cADPR Konzentration erhöht, welche die  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung aus Ryanodinrezeptoren steuert und LTD induziert (Reyes-Harde et al., 1999). Dies könnte in zukünftigen Experimenten mit Hilfe eines Ryanodinrezeptor Blockers (Thapsigargin, siehe auch Einleitung, Abb.2) gezeigt werden, den man zusammen mit CNP vor einer LFS im Schnitt applizieren könnte.

### **5.3. Mögliche physiologische Funktionen der beobachteten Wirkung des C-Typ natriuretischen Peptides im Hippokampus**

Der in dieser Arbeit beschriebene Effekt, den CNP auf Metaplastizität in CA1 ausübt, nämlich die erschwerte Induktion von LTP und gleichzeitig eine verstärkte LTD, wurde in der CA1 Area auch nach einem induzierten Stressparadigma beobachtet (Kim et al., 1996). Wird eine Situation als „stressreich“ empfunden, so aktiviert das Gehirn viele verschiedene neuronale Schaltkreise, um sich den Anforderungen anpassen zu können. Zwei Neuropeptide, das Corticotropin Releasing Hormone (CRH) und Vasopressin (APV) sind essentiell bei der Koordinierung der Verhaltens- und Stoffwechselreaktionen auf Stress. CRH und APV Steuern vom Hypothalamus ausgehend die Hypothalamic-Pituitary- Adrenocortical (HPA) Achse. CNP verstärkt über CRH die Cortisol Sekretion im Menschen (Kellner et al., 1997), welche eine Antwort auf akuten Stress aus der Umwelt signalisiert.

Über das Blut erreichen Corticosteroide ihre Zielorgane und koordinieren die Anpassung von Hirn und Körperfunktionen. Die Rezeptoren, die die Corticosteroidwirkung vermitteln sind Mineralcorticoid Rezeptoren (MR) und Glucocorticoid Rezeptoren (GR). MR ist ein hochaffiner Rezeptor für Corticosteroide, wohingegen GR ein niederaffiner Rezeptor für Corticosteroide ist (Reul und de Kloet, 1985). MR und GR kolokalisieren im Hippokampus in fast allen Spezies (Patel et al., 2000). Eine gut beschriebene neuroendokrine Funktion des Hippokampus ist es durch einen negativen Feedback auf die HPA Achse, die Stressantwort zu beenden (McEwen und Sapolsky, 1995). Die Effekte von Stress auf hippokampale Funktionen, wie Lernen und Gedächtnis, scheinen von den niederaffinen GR vermittelt zu werden (Joels und de Kloet, 1990; Oitzlet al., 2001). Es wurde postuliert, dass außer Glucocorticoiden auch noch andere, nicht identifizierte Neuromodulatoren (Kim und Diamond, 2002) bei diesem Prozess involviert sein müssen. Viele Studien der letzten beiden Dekaden haben die Hypothese unterstützt, dass Stress und Stresshormone Hippokampus abhängige Formen des Gedächtnisses beeinflussen (de Kloet et al., 1999) und das bei diesem Prozess die Amygdala involviert ist (Kim et al., 2001). Auch CNP hat einen Effekt auf die Amygdala (Biro et al. 1996) und wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, einen funktionalen Effekt auf synaptische Plastizität im Hippokampus.

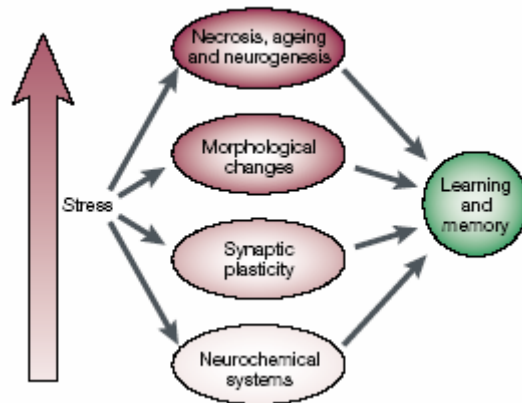


Abbildung 42: Verschiedene Effekte von Stress auf Lernen und Gedächtnis (nach Kim J.J. und Diamond D.M., 2002).

Herrscht ein milder Stresslevel, so beeinflussen Neuromodulatoren, wie Catecholamine, Opiate und Glucocorticoide das Lernen. Steigt das Stresspensum an, so werden synaptische Plastizität, morphologische Änderungen und Neurogenese beeinflusst.

Insbesondere konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass in Area CA1 in einem „restraint-tailshock“ und in einem „exposure to brightly lit“ Paradigma LTD verstärkt wird und LTP reduziert (Xu et al., 1997; Kim et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte ein analoger Effekt auf CA1 LTD und LTP nach CNP Applikation nachgewiesen werden.

CNP spielt über die CRH Sekretion bei der akuten Stressantwort der HPA Achse eine ansatzweise beschriebene Rolle (Kellner et al., 1997). Es konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass CNP im Hippokampus *in vitro* Metaplastizität in einer Art und Weise moduliert, wie sie beschrieben worden ist während einer Renormalisierungsphase nach einer akuten Stressantwort (für eine Übersicht: Joels, 2008). Dies könnte bedeuten, dass CNP im Hippokampus, an dem negativen feedback-loop, zur Beendigung einer Stressantwort beteiligt ist.

Um tatsächlich eine Involvierung der beobachteten Modulation von Metaplastizität im Hippokampus durch CNP, bei der Beendigung einer Stressantwort zeigen zu können, müsste man den GC-B Antagonisten HS-142-1 intraventrikulär injizieren und danach Stress nach dem Protokoll von Kim et al. 1996 induzieren. Wenn die hier beobachtete Änderung der Metaplastizität in CA1 nach einem solchen Experiment nicht auftreten würde, wäre dies ein erster Nachweis für eine mögliche Beteiligung des hippocampalen CNP Effektes bei einer physiologischen Beendigung einer Stressantwort.



## 6. Zusammenfassung

### Wirkung des C-Typ natriuretischen Peptides (CNP) auf Metaplastizität im Hippokampus

Der Hippokampus ist der Teil des Gehirns, der die zentrale Umschalt- und Verarbeitungsstation des Informationsstroms aus der Umwelt zu ihrem Speicherort, dem Cortex darstellt, sofern räumliche Orientierung und Bildung eines deklarativen Gedächtnisses betroffen sind. Mit Hilfe von *in vivo* Elektrophysiologie wurde im Hippokampus eine langanhaltende Änderung synaptischer Transmission (Langzeitpotenzierung, Langzeitdepression) gefunden, welche fortan als zelluläres Korrelat für Lernen und Gedächtnis galt (Bliss und Lomo, 1973). Synaptische Plastizität wird durch eine Reihe von modulatorischen Neuropeptiden beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal demonstriert werden, dass das natriuretische Peptid CNP, welches im gesamten Hippokampus exprimiert wird (Herman et al., 1993; Langub et al., 1995) über den cGMP produzierenden Rezeptor, Guanylylzyklase B, synaptische Plastizität beeinflussen kann.

Die Wirkung von CNP auf Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression wurde in der vorliegenden Arbeit in Area CA1 von akuten Hippokampusschnitten mit elektrophysiologischen Feldpotentialmessungen untersucht.

CNP reduzierte die Langzeitpotenzierung gegenüber Kontrollschnitten und verstärkte gleichzeitig das Ausmaß der Langzeitdepression. CNP moduliert also bidirektionale Plastizität oder Metaplastizität im Hippokampus, indem es die LTP Induktion erschwert und gleichzeitig die LTD Induktion erleichtert was sich in einer Verschiebung der Schwellenwertfunktion nach rechts hin ausdrückt.

Diese Modulierung scheint präsynaptisch eine Ursache in einer Veränderung der Transmitterfreisetzung zu haben. Eine mögliche postsynaptische Ursache für den Effekt von CNP ist die Modulierung der intrinsischen Erregbarkeit der pyramidalen Neurone in CA1, sowie eine Modulation GABAerger Netzwerke. Darüberhinaus moduliert CNP den „Paired pulse Index“, der ein Maß für die präsynaptische Transmitterfreisetzung ist.

Die den beschriebenen physiologischen Effekten von CNP zugrunde liegenden Mechanismen betrachtete ich auf molekularer Ebene in einem primären, hippokampalen Zellkultursystem. Das Hormonpeptid CNP wirkt modulierend auf die Verteilung von Proteinclustern in der Prä- und Postsynapse. Dies wurde in Zellkultur

mit Co-Immunofärbungen gegen ein extrazelluläres Epitop der AMPA Rezeptor Untereinheit GluR1 und einem Antikörper gegen das präsynaptische Vesikelprotein SynapsinI untersucht.

Präsynaptisch beeinflusst CNP die Verteilung des Vesikelproteins SynapsinI, wodurch mögliche Veränderungen der Transmitterfreisetzung erklärt werden können. Dieser Effekt war ausgeprägter als nach einer Stimulation mit dem NO-Donor SNAP, der den cGMP-Spiegel über die lösliche Guanylylzyklase beeinflusst. Postsynaptisch verändert CNP die Oberflächenexpression der AMPA Untereinheit GluR1, die eine wichtige Rolle bei der Expression von Langzeitdepression und Langzeitpotenzierung spielt. Im Vergleich zu einer Stimulation mit SNAP ist der postsynaptische CNP Effekt deutlich schwächer.

Schließlich hatte CNP auch eine Wirkung auf die Anzahl funktioneller Synapsen in pyramidalen Neuronen in Kultur.

Das Hormonpeptid CNP scheint somit prä-und postsynaptisch über einen cGMP abhängigen Signalweg Metaplastizität und Kurzzeitplastizität im Hippokampus zu modulieren. In zukünftigen Experimenten kann die modulatorische Rolle von CNP auf synaptische Plastizität in Patch-Clamp Experimenten und in Zellkulturexperimenten mit pharmakologischen Blockern von Komponenten des cGMP-Signalwegs weiter aufgeklärt werden.

## 7. Summary

Effect of C-type natriuretic peptide (CNP) on metaplasticity in the hippocampus

The hippocampus is the part of the brain that constitutes a central “relay station” of information flow from the environment to the cortex, as far as orientation and declarative memory are concerned. By *in vivo* electrophysiology the basic cellular mechanism of long lasting memory formation in the hippocampus was revealed and termed long term potentiation (Bliss and Lomo, 1973). Synaptic plasticity is modulated by several neuropeptides. In this thesis it could be demonstrated for the first time that the natriuretic peptide CNP, which is expressed throughout the hippocampus (Herman et al., 1993; Langub et al., 1995) is able to influence synaptic plasticity via the cGMP producing receptor guanylyl-cyclase B.

The effect of the peptide hormone CNP on long term potentiation and long term depression in the hippocampus was investigated in acute, hippocampal slice preparations by extracellular field recordings in area CA1.

It could be demonstrated that CNP decreases long term potentiation and increases long term depression. Due to these findings CNP modulates bidirectional plasticity or metaplasticity by impairing LTP and favoring LTD induction and thereby shifting the sliding threshold function to the right. This modulation seems to arise presynaptically from a change in transmitter release probability. A possible postsynaptic cause could be the change in intrinsic excitability of CA1 neurons as well as a GABAergic network modulation.

Moreover CNP modulates short term plasticity by changing the paired pulse behavior of the presynapse which is a parameter accounting for presynaptic transmitter release.

In primary cell culture I investigated possible signaling mechanism of the modulatory CNP effect on a molecular scale. The peptide hormone CNP modulates pre-and postsynaptic protein clusters in the cell culture system which was confirmed by co-immunostainings of surface expressed GluR1 AMPA receptor subunits and with an antibody against the presynaptic vesicular protein synapsinI.

Presynaptically CNP influences the distribution of the vesicle Protein synapsinI, what could account for a change in transmitter release. It does so in a more pronounced



fashion than after a stimulation with the NO donor SNAP, which increases the cGMP concentration via the soluble guanylyl-cyclase.

At the postsynapse CNP changes the surface expression of the AMPA receptor subunit GluR1 which is a determining factor in the expression of long term potentiation and long term depression. This postsynaptic effect of CNP was smaller than the effect after a stimulation with SNAP. Finally CNP had an effect on the amount of functional synapses in cultured neurons.

Taken together CNP seems to exert a profound effect on metaplasticity in the hippocampus via a pre-and postsynaptical, cGMP dependent modulation mechanism. Future experiments will reveal the modulatory effect of CNP on synaptic plasticity more precisely via patch-clamp experiments and in cell culture experiments with blockers of different components of the cGMP signaling pathways.

## **8. Zitierte Literatur**

Abbott LF, Regehr WG (2004) Synaptic computation. *Nature* 431:796–803.

Abraham WC, Bear MF (1996) Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 19:126–130.

Ahmari SE., Buchanan J, Smith, SJ (2000) Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci* 3:445-451.

Alger BE, Teyler TJ (1976) Long-term and short-term plasticity in CA1, CA3 and dentate region of the rat hippocampal slice. *Brain Res* 110:463-480.

Amaral, DG (1978) A golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 182:851-914.

Amaral, DG & Witter, MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 3: 571-591.

Andersen P, Holmqvist B, Voorhoeve PE (1966) Excitatory synapses on hippocampal apical dendrites activated by entorhinal stimulation. *Acta Physiol Scand* 66:461-472.

Andersen P, Lomo T (1967) Control of hippocampal output by afferent volley frequency. *Prog Brain Res* 27:400-412.

Andreassi MG, Del Ry S, Palmieri C, Clerico A, Biagini A., and Giannessi D (2001) Up-regulation of 'clearance' receptors in patients with chronic heart failure: a possible explanation for the resistance to biological effects of cardiac natriuretic hormones. *EurJ Heart Fail* 3:407-14.

Arancio O, Kandel ER, and Hawkins, RD (1995) Activity-dependent Hippocampal LTP is accompanied by enhanced 3', 5'-cyclic cGMP in cultured hippocampal neurons. *Nature* 376:74-80.

Arancio O, Kiebler M, Lee CJ, Lev-Ram V, Tsien RY, Kandel ER, Hawkins RD (1996) Nitric Oxide Acts directly in the presynaptic Neuron to produce Long-Term potentiation in cultured Hippocampal neurons. *Cell* 87:1025-1035.

Arancio O, Antonova I, Gambaryan S, Lohmann SM, Wood JS, Lawrence DS, and Hawkins RD (2001) Presynaptic role of cGMP-Dependent Protein Kinase during Long Lasting Potentiation. *J Neurosci* 21:143–149.

Ashby MC, De La Rue SA, Ralph GS, Uney J, Collingridge GL, Henley JM (2004) Removal of AMPA receptors (AMPA-Rs) from synapses is preceded by transient endocytosis of extrasynaptic AMPARs. *J Neurosci* 24: 5172–5176.

Baldelli P, Fassio A, Valtora F, Benfenati F (2007) Lack of synapsin I reduces the readily releasable pool of synaptic vesicles at central inhibitory synapses. *J Neurosci* 27:13520-13531

Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR (1997) Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 276: 2042–2045.

Bartels CF, Bukulmez H, Padayatti PR, DK. Ravenswaaijart C, Pauli RM (2004) Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type maroteaux. *Am J Hum Genet* 75:27-34

Bayer S (1985) Hippocampal region. In G. Paxinos (Ed.) *The Rat Nervous System Vol1; Forebrain and Midbrain* (pp. 335-352), New York, Academic Press.

Beattie EC, Carroll RC, Yu X, Morishita W, Yasuda H, von Zastrow M et al (2000) Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. Nat Neurosci 3:1291–1300.

Bear MF (1995) Mechanism for a Sliding Synaptic Modification Threshold. Neuron 15:1-4

Bear MF (2003) Bidirectional synaptic plasticity: from theory to reality. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 358:649-655

Behr J, Gloveli T, Schmitz D, Heinemann U.(2000) Dopamine depresses excitatory synaptic transmission onto rat subicular neurons via presynaptic D1-like dopamine receptors. J Neurophysiol 84:112-9.

Bienenstock EL, Cooper LN, Munro PW (1982) Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. J Neurosci 2:32-48.

Biro E, Toth G, Telgdy G (1996) Effect of receptor blockers on brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide caused anxiolytic state in rats. Neuropeptides 30: 59-65

Blanpied TA, Scott DB, Ehlers MD (2002) Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. Neuron 36:435–449.

Bliss TV, Gardner-Medwin AR (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol 232:357-374.

Bliss TV, Lømo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol 232:331-356.

Brackmann M, Schuchmann S, Anand R, Braunevel KH (2005) Neuronal Ca<sup>++</sup> sensor protein VILIP-1 affects cGMP signalling of guanylyl cyclase B by regulating clathrin dependent receptor recycling in hippocampal neurons. *Journal of Cell Science* 118:2495-2505.

Bradley J, Zhang Y, Bakin R, Lester HA, Ronnett GV, Zinn K (1997) Functional expression of the heteromeric "olfactory" cyclic nucleotide-gated channel in the hippocampus: a potential effector of synaptic plasticity in brain neurons. *J Neurosci* 17:1993-2005.

Bredt DS, Nicoll RA (2003) AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 40: 361–379.

Cajal SRY (1888a) Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Revista Trimestral de Histologia Normol y Patologica*, 1:1-10.

Cajal SRY (1888b) Sobre las fibras nerviosas de la capa molecular del cerebelo. *Revista Trimestral de Histologia Normol y Patologica*, 1:33-49.

Cajal SRY (1911) *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres. Vol.II.* Maloine, Paris. -1960 *Studies on Vertebrate Neurogenesis.* Translated by L. Guth. Charles C Thomas, Springfield, Illinois. Paris: Maloine

Callahan W, Nankervis S, and Toop T (2004) Natriuretic peptides inhibit adenylyl cyclase activity in dispersed eel gill cells. *J Comp Physiol* 174:275-80.

Carroll RC, Beattie EC, Xia H, Luscher C, Altschuler Y, Nicoll RA et al (1999) Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14112–14117.

Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ et al (2000) Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408:936–943.

Chi P, Greengard P, and Ryan TA (2001) Synapsin dispersion and recluster during synaptic activity. *Nat Neurosci* 4:1187–1193.

Chi P, Greengard P and Timothy AR (2003) Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct Synapsin I Phosphorylation Pathways at different frequencies. *Neuron* 38:69-78.

Citric A, Malenka RC (2008) Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18-41.

Cohen-Cory S (2002) The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science* 298:770-776..

Cummings JA, Mulkey RM, Nicoll RA, Malenka RC (1996) Ca<sup>2+</sup> signaling requirements for long-term depression in the hippocampus. *Neuron* 16: 825–833.

De Camilli P, Benfenati F, Valtorta F, Greengard P (1990) The Synapsins. *Annu Rev Cell Biol* 6:433-460.

de Kloet E R, Oitzl MS& Joels M (1999) Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 22:422–426

De No (1934) Studies on the Structure of the cerebral Cortex. *Journal f Psychologie und Neurologie*.

Derkach VA, Oh MC, Guire ES, Soderling TR (2007) Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 8: 101–113.

DiCicco-Bloom E, Lelievre V, Zhou X, Rodriguez W, Tam J, Waschek JA (2004) Embryonic expression and multifunctional actions of the natriuretic peptides and receptors in the developing nervous system. *Dev. Biol* 271:161-175.

Dobrunz LE, Stevens CF (1997) Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18: 995–1008.

Dudek SM, Bear MF (1993) Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. *J Neurosci* 13:2910-18.

Duggan AW, Weihe F (1991) Central Transmission of impulses in nociceptors: events in the superficial dorsal horn. In : BasbaumAI, Besson JR(eds) *Towards a new pharmacotherapy of pain*. Wiley New York, pp35-67

Durand GM, Kovalchuk Y, Konnerth A (1996) Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381: 71–75.

Ehlers MD (2000) Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28:511–525.

Empson RM, Heinemann U (1995) Perforant path connections to area CA1 are predominantly inhibitory in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice preparation. *Hippocampus* 5:104-107.

Finkbeiner S, Greenberg ME (1998) Ca<sup>2+</sup> channel-regulated neuronal gene expression. *J Neurobiol* 37:171-89.

Fowkes RC, McArdle CA (2000) C-type natriuretic peptide: an important neuroendocrine regulator? *Trends Endocrinol Metab* 11:333-338.

Fukunaga K, Muller D, Miyamoto E (1995) Increased phosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and its endogenous substrates in the induction of long-term potentiation. *J Biol Chem* 270: 6119–6124.

Fulle HJ, Vassar R., Foster DC, Yang RB, Axel R, Garbers DL (1995) A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3571-5.

Gabrieli JDE (1998) Cognitive neuroscience of human memory. *Annu Rev Psychol* 49:87–115.

Gage AT, Reyes M und Stanton PK (1997) Nitric-oxide-guanylyl-cyclase-dependent and independent components of multiple forms of long-term synaptic depression. *Hippocampus* 7:286-295.

Garbers DL, Chrisman TD, Wiegand P, Katafuchi K, Albanesi JP, Bielinski V, Barylko B, Redfield MM, Burnett JC (2006) Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. *Trends in Endocrinol and Metab* 17:251-258.

Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988) Endothelium derived relaxing factor on activation of NMDA receptors suggests a role as intracellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388.

Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, Silva AJ (1998) Autophosphorylation at Thr 286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* 279: 870–873.

Gitler D, Takagishi Y, Feng J, Ren Y, Rodriguiz RM, Wetsel WC, Greengard P, Augustine GJ (2004) Different presynaptic roles of synapsins at excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci* 4:11368 –11380.



Gloveli T, Dugladze T, Rotstein HG, Traub RD, Monyer H, Heinemann U, Whittington MA, Kopell NJ (2005) Orthogonal arrangement of rhythm-generating microcircuits in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37:13295–13300.

Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, and Benfenati F (1993) Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259:780–785.

Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B (2004) Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 7:695–696.

Harney SC, Rowan M, Anwyl R (2006) Long-term depression of NMDA receptor-mediated synaptic transmission is dependent on activation of metabotropic glutamate receptors and is altered to long-term potentiation by low intracellular calcium buffering. *J Neurosci* 26:1128–1132.

Haley J, Schaible E, Paulidis P, Murdock A, Madison DV (1996) Basal and apical synapses of CA1 pyramidal cells employ different LTP induction mechanism. *Learn & Mem* 3:289-295.

Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R (2000) Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287: 2262–2267.

Hebb Donald (1949) *The organization of behavior*. Wiley New York

Herman JP, Langub MC, Watson RE (1993) Localization of C-type natriuretic peptide mRNA in rat hypothalamus. *Endocrinology* 133:1903-1906.

Herman JP, Douglas, Drucker und Langub MC Jr (1996) Localization of Natriuretic Peptide-Activated Guanylate Cyclase mRNAs in the Rat Brain. *J Comp Neurol*. 369:165-187.

Heynen AJ, Quinlan EM, Bae DC, Bear MF (2000) Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo. *Neuron* 28: 527–536.

Hilfiker S, Schweizer FE, Kao HT, Czernik AJ, Greengard P, and Augustine GJ (1998) Two sites of action for synapsin domain E in regulating neurotransmitter release. *Nat Neurosci* 1: 29–35.

Hosaka M and Sudhof TC (1998) Synapsin III, a novel synapsin with an unusual regulation by  $Ca^{++}$ . *J Biol Chem* 273:13371–13374.

Isaac JT, Nicoll RA, Malenka RC (1995) Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 15: 427–434.

Jones, EG (1999) Golgi, Cajal and the Neuron Doctrine. *Journal of the History of the Neurosciences* 8:170-178.

Joels M (2008) Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 583:312-321

Kaneko T, Shirakami G, Nakao I, Nakawaga O, Hama N, Suga S, Miyamoto S, Kubo H, Hirai O, Kikuchi H und Imura H (1993) C-type natriuretic peptide (CNP) is the major natriuretic peptide in human cerebrospinal fluid. *Brain Res* 612:104-109.

Kandel ER, Tauc L (1965) Mechanism of heterosynaptic facilitation in the giant cell of the abdominal ganglion of *Aplysia depilans*. *J Physiol* 181: 28–47.

Kao HT, Porton B, Czernik AJ, Feng J, Yiu G, Haring M, Benfenati F, Greengard P (1998) A third member of the Synapsin gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4667–4672.

Katz B und Miledi M (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195:481- 492.

Kellner M, Diehl K, Knaudt K, Schüle C, Jahn H, Wiedemann K (1997) C-type natriuretic peptide exerts opposite effects to atrial natriuretic hormone on the corticotropin-releasing hormone –induced hormones in man. *Eur J Endocrinol* 137:84-5

Kim E, Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5: 771–781.

Kim JJ, Foy MR & Thompson RF (1996) Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through *N*-methyl-D-aspartate receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4750–4753

Kim JJ, Lee HJ, Han J-S & Packard MG (2001) Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation (LTP) and learning. *J Neurosci* 21:5222–5228.

Kim JJ, Diamond DM (2002) The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 3:453-62.

Kleppisch T, Pfeifer A, Klatt P et al (1999) Long Term Potentiation in the CA 1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. *J Neurosci* 19:48-55.

Komatsu Y, Nakao K, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Arai H, Shirikama G, Hosoda K, Nakagawa O, Hama N, Kishimoto I, Imura H (1991) C-type natriuretic peptide (CNP) in rats and humans. *Endocrinology* 129:1104-1106.

Langub MC Jr, Watson RE Jr, Herman JP (1995) Distribution of natriuretic peptide precursor mRNAs in the rat brain *J Comp Neurol*. 356:183-99.

Lei S, Jackson MF, Jia Z, Roder J, Bai D, Orser BA, MacDonald JF (2000) Cyclic GMP-dependent feedback inhibition of AMPA receptors is independent of PKG. *Nature Neurosci* 478 :192-6.

Levenes C, Daniel H, Crepel F (1998) Long-term depression of synaptic transmission in the cerebellum: cellular and molecular mechanism revisited. *Prog Neurobiol* 55:79-91.

Levin ER, Gardner Dg, Samson WK (1998) Natriuretic Peptides. *N Engl J Med* 339:321-328.

Li L, Chin LS, Shupliakov O, Brodin L, Sihra TS, Hvalby O, Jensen V, Zheng D, McNamara JO, Greengard P, Andersen P (1995) Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9235–9239.

Liao D, Hessler NA, Malinow R (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375: 400–404.

Lin JW, Ju W, Foster K, Lee SH, Ahmadian G, Wyszynski M et al (2000) Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. *Nat Neurosci* 3:1282–1290.

Lissin DV, Gomperts SN, Carroll RC, Christine CW, Kalman D, Kitamura M et al (1998) Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7097–7102.

Lissin DV, Carroll RC, Nicoll RA, Malenka RC, von Zastrow M (1999) Rapid activation-induced redistribution of ionotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 19:1263-72.

LLinas R, Gruner JA, Sugimori M, McGuinness TL, Greengard P (1990) Regulation by Synapsin I and Ca<sup>++</sup>-Calmodulin-Dependent Protein Kinase II of Transmitter Release in Squid Giant Synapse. *J Physiol* 436:257-282.

Lopes da Silva FH, Witter MP (1990) Anatomic Organization and Physiology of the Limbic Cortex. *Physiological Review* 70:453-511.

- Lu YF, Hawkins RD (2002) Ryanoide receptors contribute to cGMP-induced late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurophysiol* 88:1270-1278.
- Magleby KL, Zengel JE (1982) A quantitative description of stimulation-induced changes in transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Gen Physiol* 80:613–638.
- Mann E A, Jump M L, Wu J, Yee E and Giannella RA (1997) Mice lacking the guanylyl cyclase C receptor are resistant to STa-induced intestinal secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 239: 463-6.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23: 649–711.
- Minamino N, Aburaya M, Kojima M, Miyamoto K, Kangawa K, Matsuo H (1993) Distribution of C-type natriuretic Peptide and its mRNA in rat central nervous system and peripheral tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 197:326-335.
- Micheva, KD, Buchanan, J, Holz, RW, and Smith, SJ (2003) Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Nat Neurosci* 6:925–932.
- Malenka RC, Nicoll RA (1993) NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends in Neurosci* 16: 521–527.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation a decade of progress? *Science* 285: 1870–1874.
- Malenka RC (1991) Postsynaptic factors control the duration of synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 6:53–60.
- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44: 5–21.
- Malenka RC, Nicoll RA (1997) Silent synapses speak up. *Neuron* 19: 473–476.

Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25: 103–126.

Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309: 261–263.

McEwen BS & Sapolsky RM (1995) Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 5: 205–216.

Michels P, Tarnow J (2001) Natriuretische Peptide: Physiologische, pathophysiologische und klinische Aspekte. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 36:406-416.

Montgomery JM, Zamorano PL, Garner CC (2004) MAGUKs in synapse assembly and function: an emerging view. *Cell Mol Life Sci* 61: 911–929.

Montkowski A, Jahn H, Strohle A, Poetting M, Holösboer F und Wiedemann K (1998) C-type natriuretic peptide exerts opposing those of atrial natriuretic peptide on anxiety-related behaviors in rats. *Brain Res* 792:358-360.

Moore KA, Nicoll RA, Schmitz D (2003) Adenosine gates synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14397-402.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.

Mulkey RM, Malenka RC (1992) Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9: 967–975.

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

Nicoll RA, Schmitz D (2005) Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci* 6:863-76.

Nicoll RA, Kauer JA, Malenka RC (1988) The current excitement in long-term potentiation. *Neuron* 1: 97–103.

Nicoll RA (2003) Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view. *Philos Trans R Soc Lond* 358:721–726.

Ninan I, and Arancio O (2004) Presynaptic CamkII is necessary for synaptic plasticity in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 42:129–141.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307: 462–465.

Park M, Salgado JM, Ostroff L, Helton TD, Robinson CG, Harris KM et al (2006) Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron* 52: 817–830.

Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC (2006) Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313:1141–1144.

Passafaro M, Piech V, Sheng M (2001) Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4: 917–926.

Patel, P. D. et al. (2000) Glucocorticoid and mineralocorticoidreceptor mRNA expression in squirrel monkey brain. *J Psychiatr Res* 34:383–392.

Pavlov IP (1927). *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. Oxford University Press: London.

Potter LR, and Garbers DL (1994) Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *J Biol Chem* 269: 14636-42.

Potter L R (1998). Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptor B: dephosphorylation is a mechanism of esensitization. *Biochemistry* 37:2422-9.

Potter LR, and Hunter T (1998a) Identification and characterization of the major phosphorylation sites of the B-Typ natriuretic peptide receptor. *J Biol Chem* 273: 15533-9.

Potter LR and Hunter T (1998b) Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-Typ natriuretic peptide receptor. *Mol Cell Biol* 18: 2164-72.

Potter LR and Hunter T (2001) Guanylyl Cyclase-linked Natriuretic Peptide Receptors: Structure and Regulation. *J Biol Chem* 276:6057-6060.

Reul J M & de Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117: 2505-2511.

Reyes-Harde M, Empson R, Potter BV, Galione A, Stanton PK (1999) Evidence of a role for cyclic ADP-ribose in long-term synaptic depression in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 : 4061-4066.

Rosahl TW, Geppert M, Spillane D, Herz J, Hammer RE, Malenka RC et al (1993) Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I. *Cell* 75:661–670.

Rosahl TW, Spillane D, Missler M, Herz J, Selig DK, Wolff JR et al (1995) Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature* 375: 488–493.



Ryan TA, Li L, Chin LS, Greengard P, Smith SJ (1996) Synaptic vesicle recycling in synapsin I knock-out mice. *J Cell Biol* 134:1219–1227.

Serulle Y, Zhang S, Ninan I, Puzzo D, McCarthy M, Khatri L, Arancio O, Ziff EB (2008) GluR1-cGKII Interaction Regulates AMPA Receptor Trafficking. *Neuron* 56 :670-688

Schiebler W, Jahn R, Doucet JP, Rothlein J, and Greengard (1986) Characterization of synapsin I binding to small synaptic vesicles. *J Biol Chem* 261:8383–8390.

Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 12:103-113.

Shi S, Hayashi Y, Esteban JA, Malinow R (2001) Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* 105: 331–343.

Siksou L, Rostaing P, Lechaire JP, Boudier T, Ohtsuka T, Fejtova A, Kao HT, Greengard P, Gundelfinger ED, Triller A, Marty S (2007) Three dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix. *J Neurosci* 27:6868–6877.

Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S (1992) Impaired spatial learning in alpha-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257: 206–211.

Simpson, P J, Nighorn, A, and Morton, DB(1999) Identification of a novel guanylyl cyclase that is related to receptor guanylyl cyclases, but lacks extracellular and transmembrane domains. *J Biol Chem* 274:4440-6.

Song I, Huganir RL (2002) Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 25: 578–588.

Squire LR, Zola-Morgan SM (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science* 253:1380-1386.

Stanton PK, Heinemann U, Müller W (2001) FM1-43 Imaging Reveals cGMP-Dependent Long-Term Depression of Presynaptic Transmitter Release J Neurosci 21:RC167.

Stepan H, Leitner E, Siems W E, Maul B, and Walther T (1999) mRNA quantification of C-Typ natriuretic peptide in brain areas of rodents. Peptides 20:1243-5.

Steward O, Scoville SA (1976) Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. J Comp Neurol 169:347-370.

Strosznajder J, Chalimoniuk M, Samochocki M (1996) Activation of serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> receptor reduces Ca<sup>++</sup> and glutamatergic receptor evoked arachidonic acid and NO/cGMP release in hippocampus. Neurochem Int 28:439-444.

Südhof TC, Czernik AJ, Kao HT, Takei K, Johnston PA, Horiuchi A, Kanazir SD, Wagner MA, Perin MS, De Camilli P, et al.(1989) Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. Science 245:1474-80.

Swanson LW (1978) The anatomical organization of septo-hippocampal projections. Functions of the Septo-Hippocampal System: Ciba Foundation Symposium 58 (pp. 25-48), Amsterdam, Elsevier Press.

Swanson LW (1982) Normal hippocampal circuitry. Neuroscience Research Progress Bulletin, 20, 624-637.

Swanson LW, und Kuypers HGJM (1987) The limbic region. I. The septal hippocampal system. In A. Björklund, T. Hökfelt, und L.W. Swanson (eds): Handbook of Chemical Neuroanatomy. Amsterdam: Elsevier, pp. 125-127

Takei Y, Harada A, Takeda S, Kobayashi K, Terada S, Noda T, Takahashi T, Hirokawa N (1995) Synapsin I deficiency results in the structural change in the presynaptic terminals in the murine nervous system. J Cell Biol 131:1789 –1800.

Telegdy G, Kokavsky K und Nyerges A (1999) Action of C-type natriuretic peptide (CNP) on passive avoidance learning in rats: involvement of transmitters. *European J Neurosci* 11:3302-3306.

Tsui J, Malenka RC (2006) Substrate localization creates specificity in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II signaling at synapses. *J Biol Chem* 281: 13794–13804.

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

Tremblay J, Desjardins R, Hum D, Gutkowska J, Hamet P (2002) Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase. *Moll Cell Biol* 230:31-47.

Turrigiano GG, Nelson SB (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 5:97–107.

Tian M and Yang X-L (2006) C-Type Natriuretic Peptide modulates Glutamate Receptors on cultured Rat Retinal Amacrine Cells. *Neuroscience* 139 :1211-20.

Wang HG, Lu FM, Jin I, Udo H, Kandel ER, de Vente J, Walter U, Lohmann SM, Hawkins RD, Antonova I (2005) Presynaptic and Postsynaptic Roles of NO, cGK and RhoA in Long-Lasting Potentiation and Aggregation of synaptic proteins. *Neuron* 45:389-403.

Wang X, Robinson PJ (1997) Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem* 68:443-456.

Wedel BJ, and Garbers DL (1997) New insights on the functions of the guanylyl cyclase receptors. *FEBS Lett* 410:29-33.

Wei JY, Roy D, Leconte L, Barnstable CJ (1998) Molecular and pharmacological analysis of cyclic nucleotide-gated channel function in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 56 :37-64.

Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos II J, Niedzielski AS (1996) Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 16: 1982–1989.

Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313:1093–1097.

Wilson EM and Chinkers M (1995) Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochemistry* 34:4696-701.

Witter MP (1989) Connectivity of the rat hippocampus. V. Chan-Palay & C. Kohler (EDs), *The Hippocampus - New Vistas, Neurology and Neurobiology Vol X* (pp. 53-69), New York, Alan R. Liss Inc.

Xu L, Anwyl R & Rowan MJ (1997) Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. *Nature* 387:497–500 .

Yang RB, Foster DC, Garbers D L, and Fulle H J(1995) Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:602-6.

Zucker RS, Regehr WG (2002) Short term plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405

Zola-Morgan S, Squire LR (1993) Neuroanatomy of memory. *Annu Rev Neurosci* 16: 547–563.

## 9. Anhang

### 9.1. Verbrauchsmaterialien

#### 9.1.1. Allgemeine Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Glutamat	Roth, Karlsruhe
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	Serva, Heidelberg
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Roth, Karlsruhe
Mowiol	Calbiochem, Bad Soden
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Pferdeserum	Gibco BRL, Eggenstein
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-Acetat	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypton	Roth, Karlsruhe

### 9.1.2. Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sterile Kulturröhrchen, 3ml	Simport

Glascoverslips 1cm , 12mm Durchmesser	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Germany
---------------------------------------	---

### 9.1.3. Allgemeine Materialien für die Zellkultur

Produkt	Hersteller
10ml Pipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
15 ml- Zentrifugenröhrchen	Biochrom, Berlin
50 ml- Zentrifugenröhrchen	Biochrom, Berlin
B-27	Gibco BRL, Eggenstein
DNAse I	Boehringer/Roche, Mannheim
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) (4500mg/l Glukose, 584 mg/l L-Glutamin, 110 mg/l Pyruvat)	Gibco BRL, Eggenstein
Filtereinheiten 0,2 µm steril	Schleicher & Schuell, Dassel
Fötales Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein
Hank´s Balanced Salt Solution, Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> frei (HBSS-)	Gibco BRL, Eggenstein
Kanülen (26G, 20G)	Braun, Melsungen
Kulturschalen mit 24 Vertiefungen	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Neurobasal	Gibco BRL, Eggenstein
Nylonnetz	Sefar, Rüslikon, CH
Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B	Gibco BRL, Eggenstein
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin	Gibco BRL, Eggenstein

### 9.1.4. Allgemeine Lösungen

10x PBS

1,5 M NaCl, 83 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,

17 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, pH 7.4

### 9.1.5. Primäre Antikörper

	Eingesetzte Konzentration.....	Firma
Anti-GLUR1 Maus (extrazelluläres Epitop)	1:20	Santa Cruz
Anti-GLUR1- Kaninchen (extrazelluläres Epitop)	1:50	Upstate
Anti-GLUR1- Kaninchen (extrazelluläres Epitop)	1:50	Calbiochem
Anti-Synapsin I Kaninchen	1:1000	Sigma
Anti-Synapsin I- Maus	1:500	Synaptic Systems
Anti-Synaptophysin- Maus	1:1000	Sigma
Anti-Vglut- Meerschwein	1:5000	Chemicon international
Anti-NMDA Rezeptor(Untereinheit 1, NR1)-Maus (extrazelluläres Epitop)	1:1000	Chemicon international

### 9.1.6. Sekundäre Antikörper

Alexa Fluor 488 Ziege anti Maus	1:1000	Molecular Probes
Cy 3 Ziege anti Kaninchen	1:1000	Dianova
Alexa Fluor 555 Ziege anti Meerschwein	1:1000	Molecular Probes



## 9.2. Abkürzungsverzeichnis

ACSF	→ artificial cerebrospinal fluid	→ künstliche Hirnflüssigkeit
AMPA	→ $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionat	
CA	→ Corpora ammonis	→ Ammonshorn
CaMK	→ Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase	
CREB	→ cAMP response element binding protein	
cGMP	→ cyclic Guanosin Monophosphat	
DIV	→ Day in vitro	
EPSP	→ excitatory postsynaptic potential	
FP	→ field potential	→ Feldpotential
GABA	→ $\gamma$ -Aminobutyric acid	→ Gamma-Aminobuttersäure
HFS	→ high-frequency stimulation	→ hochfrequente Stimulation
LFS	→ low-frequency stimulation	→ niederfrequente Stimulation
LTP	→ long-term potentiation	→ Langzeit-Potenzierung
LTD	→ long-term depression	→ Langzeit-Depression
MAPK	→ mitogen-activated protein-kinase	
NO	→ nitric oxide	→ Stickoxid
NMDAR	→ N-Methyl-D-Aspartat receptor	
NR1	→ N-Methyl-D-Aspartat receptor subunit 1	
PS	→ population spike	→ Summenaktionspotential
PKG		→ Proteinkinase G
SC	→ Schaffer collaterals	→ Schaffer-Kollateralen
SLM	→ Stratum lacunosum-moleculare	
SO	→ Stratum oriens	
SP	→ Stratum pyramidale	
SR	→ Stratum radiatum	
ZNS		→ Zentralnervensystem
GC (-A,-B,-C)	→	partikuläre Guanylylzyklasen A,B,C
RRP	→ ready releasable pool	
RP	→ releasable pool	

### 9.3. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1 schematische Struktur der partikulären Guanylatcyclasen mit Funktionsdomänen.
- Abbildung 2 Zusammenfassung der zellulären Signalwegen und daraus resultierenden physiologischen Wirkungen von cGMP auf Plastizitätsphänomene.
- Abbildung 3 schematische Darstellung des AMPA Rezeptor „Traffickings“ während LTP und LTD.
- Abbildung 4 Cajals anatomische Zeichnung der zytologischen Struktur des Hippokampus.
- Abbildung 5 Darstellung eines Rattenhirn mit dem Hippokampus, Fornix und den Corpora Mammillaria.
- Abbildung 6 Querschnitt im Bereich des septalen Pols des Hippokampus.
- Abbildung 7 Übersichtsdiagramm der Verschaltung des Hippokampus mit anderen Hirnarealen
- Abbildung 8 Darstellung der Schnittebenen bei der Herstellung hippokampaler Akutschritte.
- Abbildung 9 Elektrodenpositionierung:
- Abbildung 10 Begriffserklärung zu „homo- und heterosynaptisch“:
- Abbildung 11 Dissektion der CA3 Region und von Teilen des Gyrus Dentatus
- Abbildung 12 Strukturformel von Bicucullin.
- Abbildung 13 Strukturformel des NO-Donors SNAP.
- Abbildung 14 Beispiele für die vermessenen Parameter.
- Abbildung 15 Beispiel der Aufbereitung der am konfokalen Laserscanning Mikroskop aufgenommenen Bilder.
- Abbildung 16 Messung des Effektes von CNP auf die basale synaptische Transmission.
- Abbildung 17 Beeinflussung homosynaptischer LTP durch 100 nM CNP in area CA1.
- Abbildung 18 Wirkung von CNP auf LTD in CA1:
- Abbildung 19 Die letzten 10 Minuten der Aufnahmen der verschiedenen HFS Stimulationen aufgetragen als Änderung der PS Amplitude über der Frequenz.
- Abbildung 20 Reduzierende Wirkung von CNP auf den initialen „slope“ des FP gemessen im SR.
- Abbildung 21 Änderung des FP slope während homosynaptischer LTD in area CA1.
- Abbildung 22 Änderung des FP slopes aufgetragen über der Frequenz.
- Abbildung 23 Analyse der Einwärtskomponente P 1a und der Auswärtskomponente P 1b des PS im SP nach CNP Applikation.
- Abbildung 24 das Nachpotential P 1b wird durch CNP reduziert.
- Abbildung 25 30 Hz Stimulation in Schnitten mit dissektiertem CA3 und 5  $\mu$ M Bicucullin.
- Abbildung 26 das Nachpotential P 1b wird nach Dissektion von CA3 und Bicucullin Applikation nicht durch CNP moduliert.
- Abbildung 27 1Hz Stimulation in Schnitten mit dissektiertem CA3 und 5  $\mu$ M Bicucullin.
- Abbildung 28 reduzierende Wirkung von CNP auf die Potenzierung des Paired Pulse Index.
- Abbildung 29 Paired Pulse Ratio gemessen in hippokampalen Schnitten ohne CA 3 mit 5  $\mu$ M Bicucullin.
- Abbildung 30 Applikation des GC-B Antagonisten HS-142-1 zusammen mit CNP vor einer 30 Hz Stimulation.
- Abbildung 31 Rezeptoroberflächen Färbemuster zweier GluR1 Antikörper (nicht permeabilisierende Bedingungen).

- Abbildung 32 Färbemuster einer Rezeptoroberflächenfärbung (nicht permeabilisierende Bedingungen) mit zwei verschiedenen GluR1 Antikörper.
- Abbildung 33 Doppelfärbung gegen VGlut I (anti-Meerschwein;rot;permeabilisierende Bedingungen) und GluR1(anti-Maus;grün; Santa Cruz;nicht permeabilisierende Bedingungen).
- Abbildung 34 Zwei verschiedene Zellen aus einer Präparation, immunopositiv gegen Synapsin I (anti-Maus; grün;permeabilisierende Bedingungen) und VGlut I (anti-Kaninchen; rot; permeabilisierende Bedingungen).
- Abbildung 35 Anteil der Glutamatergen Terminalien in pyramidalen Hippokampusneuronen.
- Abbildung 36 Kolokalisation von Synaptophysin und Synapsin I
- Abbildung 37 Wirkung von Glutamat/Glycin Stimulation in primärer, hipokampaler Zellkultur auf die Oberflächenexpression von NR1 in proximalen Dendriten.
- Abbildung 38 Beispiel für ein Stimulationsexperiment:
- Abbildung 39 GluR 1 Immunoreaktivität nach verschiedenen Stimuli.
- Abbildung 40 Anzahl der relativen Synapsin I immunoreaktiven Punkten nach verschiedenen Stimuli.
- Abbildung 41 Darstellung der Wirkung von CNP auf die Kolokalisation von Synapsin I mit GluR1.
- Abbildung 42 Verschiedene Effekte von Stress auf Lernen und Gedächtnis.

## Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1 Übersicht über die reduzierende Wirkung von CNP auf homosynaptische LTP.
- Tabelle 2 Übersichtstabelle über das Maß der Reduktion der Transmitterfreisetzungsgeschwindigkeit nach CNP Behandlung.
- Tabelle 3 Vergleich der reduzierenden Wirkung von CNP auf die LTP der PS Amplitude und auf den slope des FP
- Tabelle 4 Vergleich der verstärkenden Wirkung von CNP auf die LTD der PS Amplitude und auf den slope des FP
- Tabelle 5 Vergleich der reduzierenden Wirkung von CNP auf PS Amplitude und FP slope nach 30 Hz HFS in Schnitten mit und ohne inhibitorische Netzwerke.
- Tabelle 6 Vergleich der verstärkenden Wirkung von CNP auf PS Amplitude und FP slope nach 1 Hz LFS in Schnitten mit und ohne inhibitorische Netzwerke.