

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades *Doctor rerum naturalium*
der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Rolle von GSK-3 β in der strukturellen Spine-Plastizität

Simon Moritz Ochs

aus Bad Dürkheim an der Weinstraße

2013



Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Außerdem versichere ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt wurde und ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

Erklärungen

Die Betreuung der Dissertation erfolgte durch Prof. Dr. Jochen Herms, deren offizielle Vertretung durch Prof. Dr. Rainer Uhl an der biologischen Fakultät der LMU.

Ich bin mit der Einstellung dieser Arbeit in Fachbibliotheken einverstanden.

Im Rahmen der GNU General Public License begrüße ich die Verbreitung sowie die Verbesserung der von mir entwickelten Algorithmen.

München, im September 2013

Simon Ochs

Einreichungsdatum:	19.09.2013
Erstgutachter:	Prof. Dr. Rainer Uhl
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Barbara Conradt
Verteidigungsdatum:	27.01.2014

Für meine Familie
Für meine Saskia

To boldly go where no one has gone before.

Captain Jean-Luc Picard, 2364

Inhaltsverzeichnis

Glossar	IV
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Synaptische Plastizität	3
2.2 Dendritische Spines	6
2.2.1 Morphologie und Funktion	7
2.2.2 Strukturelle Spine-Plastizität	8
2.3 Die intravitale Zweiphotonenmikroskopie	11
2.4 Dendritische Spine-Stabilität	15
2.5 Signalkaskaden und Plastizität	16
2.6 GSK-3 β und synaptische Plastizität	17
2.7 Zielsetzung dieser Arbeit	19
3 Ergebnisse	21
3.1 Die GSK-3 β ^{LoxP(EX2)} \times SlickV-Mauslinie	21
3.2 Validierung des GSK-3 β -Einzelzell Knockouts	23
3.3 GSK-3 β -Knockout reduziert dendritische Spine-Dichten	24
3.4 Dosis-Wirkungs-Beziehung	26
3.5 Pharmakologische GSK-3-Inhibition reduziert die Spine-Dichte	26
3.6 Die Spine-Dichte-Reduktion ist β -Isoform spezifisch	27
3.7 Die Spine-Dichte-Reduktion hat keine präsynaptische Ursache	28
3.8 GSK-3 β -Knockout verändert Spine-Morphologien	30
3.9 GSK-3 β -Knockout beeinträchtigt die dendritische Spontanaktivität	32
3.10 Die GSK-3 β -medierte Spine-Dichte-Reduktion ist persistent	33
3.11 Der Einfluss eines Enriched Environments auf GSK-3 β -Knockout-Neurone	35
3.12 GSK-3 β beeinflusst die Spine-Kinetik	36
3.13 Zugrunde liegende molekulare Mechanismen	39
3.13.1 Sondierung putativer GSK-3 β -Mediatoren	41
3.13.2 β -Catenin-Stabilisierung mediiert den Effekt des GSK-3 β -Knockouts	43
3.13.3 BACE1 mediiert nicht die GSK-3 β -Effekte	45
4 Diskussion	49
4.1 GSK-3 β und Spine-Dichte	49
4.2 GSK-3 β und die Spine-Funktion	52
4.3 GSK-3 β und die Spine-Stabilität	54

4.4	Zugrunde liegende molekulare Mechanismen	57
4.5	GSK-3 und neurodegenerative Erkrankungen	61
4.6	Hypothese	64
5	Material und Methoden	66
5.1	Experimente an Mäusen	66
5.1.1	Haltung	66
5.1.2	Tamoxifen-Verabreichung	67
5.1.3	Pharmakologie	67
5.1.4	Enriched Environment	67
5.1.5	Kraniale Fensterimplantation	68
5.1.6	Intravitale Zweiphotonenmikroskopie	69
5.2	Immunhistochemie	70
5.2.1	Gewinnung fixierter Hirnschnitte	70
5.2.2	Färbungen	71
5.3	Konfokalmikroskopie	72
5.4	IT-Lösungen	73
5.4.1	Hardwareapplikation <i>Heizpad</i>	73
5.4.2	Softwareapplikation <i>SpineMiner(XT)</i>	75
5.4.3	Generelle Bildprozessierung	80
5.4.4	Spine-Dichte-Analyse	80
5.4.4.1	<i>in vivo</i>	80
5.4.4.2	<i>ex vivo</i>	81
5.4.5	Morphologieanalysen	81
5.4.6	Quantifizierung Immunhistochemischer Daten	81
5.4.6.1	Tau	81
5.4.6.2	Synapsin/PSD-95	82
5.4.6.3	Synapsin/YFP-Distanz	82
5.4.6.4	MAP1b	83
5.5	Elektrophysiologie	83
5.6	Statistik	83
5.7	Mausmodelle	84
5.7.1	SlickV	84
5.7.2	GSK-3 β ^{LoxP(EX2)}	85
5.7.3	catnb ^{LoxP(EX3)}	86
5.7.4	GFP-M	87
5.7.5	BACE1-Knockout	88
5.8	Ingredienzien	89
5.9	Rezepte	90
5.10	Materialien, Geräte, Werkzeuge	92
5.11	Elektronische Bauteile	93
5.12	Software	94
6	Literaturverzeichnis	95

7	Anhang	105
7.1	Hardwareapplikation <i>Heizpad</i>	109
7.1.1	Schaltung	109
7.1.2	Quelltext	113
7.2	Softwareapplikation <i>SpineMiner(XT)</i>	117
8	Danksagung	119
9	Lebenslauf und Eigene Publikationen	120

Glossar

Viele Begrifflichkeiten der Biowissenschaften entspringen dem englischen Sprachraum. Ihre Übersetzung und Integration im Fließtext bewirkt häufig Fachferne und kontextuale Entreiung des diskutierten wissenschaftlichen Gegenstands. Deshalb wurde in einigen Fällen auf die Übersetzung im Text verzichtet. Stattdessen kann an dieser Stelle die Bedeutung des Wortes nachgeschlagen werden.

Begriff	Erklärung
Crosstalk	engl. das Übersprechen eines Signals auf eine benachbarte Bahn
Enriched environment	engl. reizangereicherte Umgebung
Fit	von engl. curve fitting, Einpassung einer math. Funktion in einen Datensatz
Knockout	engl. Inaktivierung eines Gens
Mushroom	engl. pilzartig
Patch-Clamp	engl. Messmethode der Elektrophysiologie
Range-Indicator	engl. Darstellungsweise einer Bildinformation in Abhängigkeit zur Pixelintensität
Rendering	engl. grafische 3D-Oberflächenmodellierung
Scanning	engl. rasterförmige Oberflächenabtastung
Spine	engl. dendritischer Dornfortsatz
Stubby	engl. stummelig
Tangles	engl. neurofibrilläre Tau-Aggregate, Diagnosemerkmal bei Morbus Alzheimer
Thin	engl. dünn

1 Zusammenfassung

Im neurophysiologischen Kontext versteht man unter dem *Gedächtnis* die Fähigkeit, Sinnesinformationen aus der Außenwelt zu behalten und langfristig abrufbar zu verwerten. Die fundamentale Basis des Gedächtnisses bilden Lern- und Erinnerungsprozesse, was sich im Allgemeinen in der Plastizität neuronaler Netzwerke abbildet. Die Ablage von Gedächtnisinhalten hängt im Wesentlichen von der synaptischen Effizienz ab. Dies ist die Fähigkeit von Nervenzellen, Synapsen auszubilden, zu stabilisieren und die Übertragung zwischen ihnen zu verbessern. Die molekulare Maschinerie hinter der Ausbildung und Stabilisierung von Prä- und Postsynapsen (Spines) ist noch immer nicht ganz verstanden.

Das Enzym Glycogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) wurde in licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen in großen Mengen in Neuronen und deren Spines lokalisiert. Elektrophysiologisch konnte dem Enzym bereits eine Rolle bei der exzitatorischen Neurotransmission zugeordnet werden. Dennoch ist unklar, welche Funktion GSK-3 β in der Postsynapse ausübt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein neuartiges Mausmodell etabliert, bei dem in vereinzelt Nervenzellen des Gehirns GSK-3 β zeitkontrolliert ausgeschaltet werden kann. Die daraus erhobenen Befunde zeigen, dass ausschließlich die β -Isoform von GSK-3 ein kritischer Regulator dendritischer Spine-Dichten im Hippocampus und des somatosensorischen Cortex ist. Es existiert ein direkter Zusammenhang zwischen Gendosis und hippocampaler Spine-Dichte. GSK-3 β beeinflusst die Spine-Funktion hinsichtlich ihrer morphologischen Beschaffenheit und glutamatergen Neurotransmission. Intravitalmikroskopische Untersuchungen und die Exposition der Mäuse in einer reizangereicherten Umgebung führen zur Hypothese, dass GSK-3 β im Wesentlichen die Stabilität persistenter und neu ausgebildeter Spines bestimmt. Darüber hinaus konnte β -Catenin als molekularer Mediator der GSK-3 β -Effekte herausgearbeitet werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten komplettieren das aktuelle Bild über Lern- und Erinnerungsprozesse. Hinsichtlich neurodegenerativer Erkrankungen liefern die hier gezeigten Befunde wichtige Erkenntnisse über GSK-3 β , die bei der Ausarbeitung neuer therapeutischer Strategien berücksichtigt werden müssen.

Summary

In neurophysiology, memory refers to the ability of all living beings to gather, store and process information from the outside world. The fundamental basis of learning and memory is constituted of highly dynamic processes of neurons, which are reflected in the plasticity of neuronal networks. Memory formation basically depends on the synaptic efficacy, a capability to form and stabilize pre- and postsynapses (spines). The underlying molecular mechanisms still remain poorly understood.

Electron- and light microscopy revealed the enzyme Glycogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) to be highly enriched in the mammalian brain, especially in neurons and spines. By electrophysiological means, GSK-3 β was associated with excitatory neurotransmission. However, the function of GSK-3 β in spines and in structural spine plasticity is still unclear. To address this question, a new mouse model was generated, which enables a conditional single cell knockout of GSK-3 β in a sparse subset of pyramidal neurons at any time. The results obtained in this work prove that the β -isoform of GSK-3 is a critical regulator of dendritic spine density in hippocampus and somatosensory cortex. A direct connection between gene-dosage and spine density was demonstrated. GSK-3 β modulates spine function by its ability to change spine morphology and glutamatergic neurotransmission. In vivo imaging and exposing knockout mice into an enriched environment revealed that GSK-3 β controls dendritic spine stability and turnover of persistent and new formed spines. Furthermore, β -Catenin was identified to mediate the effects caused by GSK-3 β -knockout.

These data complement the current view of learning and memory formation. In context of neurodegenerative diseases, where GSK-3-Inhibition is proposed as therapeutic target, this study illuminates new synaptic functions of GSK-3 β . They have to be considered when designing new therapeutic strategies based on GSK-3-Inhibition.

2 Einleitung

Es kann Jahrhunderte dauern, um zu lernen, dass es nicht Jahrhunderte dauert, um zu lernen. Mit dieser Erkenntnis musste Captain Jean-Luc Picard wohl leben^[178]. Die Fähigkeit, Informationen in Kürze zu speichern und über die Lebenszeit hinweg abzurufen bildet eine fundamentale Basis für unser Gedächtnis. Es ist eine kognitive Leistung, die durch das größte Organ des zentralen Nervensystems, dem Gehirn, ermöglicht wird. Die Aufnahme und Speicherung von Informationen im Gehirn wird generell von Nervenzellen (Neuronen) bewerkstelligt. Wie jede Zelle im Körper ist auch die Nervenzelle hinsichtlich Beschaffenheit und Organisation genetisch fest bestimmt. Im Kontrast dazu ist die Vernetzung der einzelnen Neurone zu einem neuronalem Netzwerk sehr flexibel.

Der spanische Neuroanatom und Nobelpreisträger Ramón y Cajal postulierte bereits im späten 19. Jahrhundert, dass die Hauptaufgabe der Informationsspeicherung von den Kontaktstellen zwischen den Neuronen, den Synapsen, übernommen wird^[174]. Auf Basis dieses Wissens ersann Donald O. Hebb das Prinzip der synaptischen Plastizität, welches für die Beschreibung von Lern- und Erinnerungsvorgängen bis heute anerkannt ist: „cells that fire together, wire together“^[88] (engl. Zellen, die zusammen aktiv sind, verbinden sich miteinander). Demzufolge sind Synapsen modulierbar und je häufiger zwei Neurone miteinander aktiv sind, umso stärker wird der synaptische Kontakt zwischen ihnen. Nach Hebbs Vorstellung wird eine Information nicht an einer einzelnen Synapse gespeichert, sondern manifestiert sich durch eine Verkettung mehrerer Synapsen über ein neuronales Netzwerk hinweg. Dass ein Erlebniseindruck eine Art Gedächtnisspur (Engramm) auch auf organischem Niveau hinterlassen müsse, bewegte Neurowissenschaftler dazu, nach den Grundlagen des Lernens und Erinnerns zu forschen^[128].

2.1 Synaptische Plastizität

Das menschliche Gehirn enthält zwischen 100 Milliarden bis einer Billion Nervenzellen und bildet mit geschätzten einer Billiarden Synapsen ein mannigfaltiges

komplexes Netzwerk^[91,205]. Die pyramidale Nervenzelle setzt sich aus dem Zellkörper (Soma), den Dendriten und genau einem Axon zusammen (siehe Abbildung 2.1A,B). Die Dendriten sind vom Soma auswachsende baumartige Verästelungen, die dem Empfang neuraler Erregungen dienen. Das Axon ist ein langer, faserartiger Fortsatz und überträgt das vom Soma ausgehende Signal. Synapsen zeichnen sich durch drei funktionelle und morphologisch voneinander getrennte Komponenten aus. Erstens die vom Axon ausgehende Präsynapse, an der Signalbotenstoffe (Neurotransmitter) zur transneuronalen chemischen Kommunikation ausgeschüttet werden. Zweitens der synaptische Spalt, in den die Neurotransmitter freigesetzt werden. Drittens die Postsynapse, an der spezifische Rezeptoren für die Neurotransmitter lokalisiert sind und komplexe Signalkaskaden fortschreiten (siehe Abbildung 2.1C). Größtenteils erfolgt die Reizweiterleitung entlang der Nervenzelle durch sogenannte elektrische Potenziale. Zwischen den Nervenzellen geschieht dies dagegen meist chemisch über die Neurotransmitter und den synaptischen Spalt^[205].

Tim Bliss und Terje Lomø konnten die von Hebb postulierte synaptische Plastizität durch die Etablierung der Langzeit-Potenzierung (LTP) beweisen. Die hochfrequente elektrische Stimulation von Nervenfasern führte zu einer verstärkten Antwort nachgeschalteter Neurone. Die Verstärkung der synaptischen Verbindungen blieb auch lange nach der Stimulation nachhaltig erhalten^[15]. Dieser Effekt ist durch die Anwendung des Protokolls für Langzeit-Depression (LTD) umkehrbar. Dabei führt die verminderte Stimulation der Synapsen zur anhaltenden Schwächung der synaptischen Kontakte^[194]. LTP- und LTD-Protokolle finden in der Elektrophysiologie, also bei der direkten Ableitung elektrischer Signale von Neuronen, bis heute Anwendung. Auf genau diese Art konnte der Nobelpreisträger Eric Kandel und andere Wissenschaftler durch einfache Untersuchungen am intakten Nervensystem des kalifornischen Seehasen belegen, dass die Informationsverfestigung mit strukturellen sowie molekularen Veränderungen und einer Variation der Synapsenanzahl einhergeht^[9,10,111].

Mechanistisch betrachtet führen exzitatorische Aktionspotenziale durch spannungsabhängige Kalzium-Kanäle an der Präsynapse zum Eintritt von Kalzium-Ionen (Ca^{2+}). Dies bewirkt die Fusion von Vesikeln, die mit dem anregenden Neurotransmitter Glutamat gefüllt sind, mit der Zellmembran (siehe Abbildung 2.1C). Dadurch wird das Glutamat in den synaptischen Spalt freigesetzt. An der postsynaptischen Membran kann das Glutamat an α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptoren (AMPA-Rezeptor) binden und damit die Umwandlung

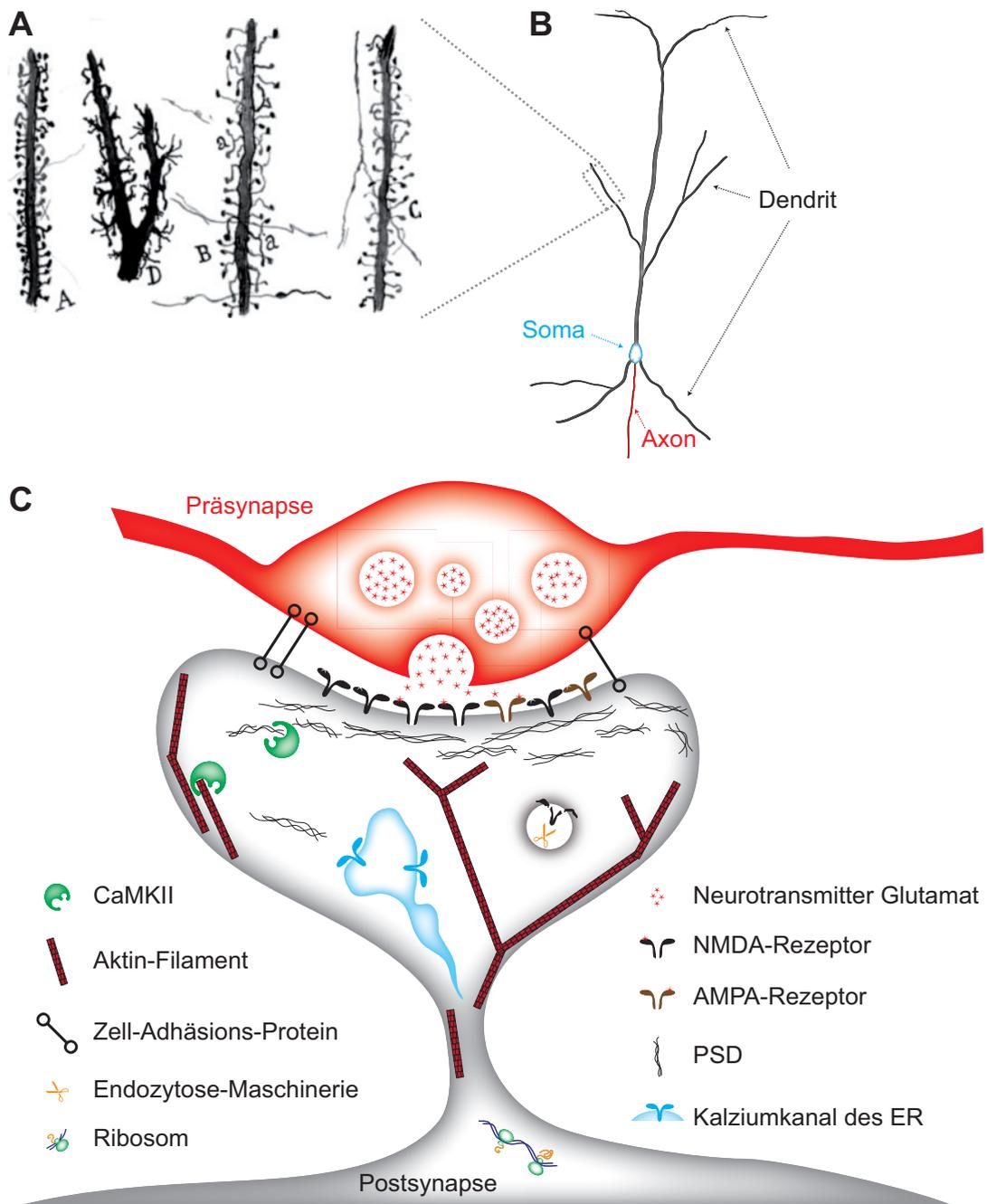


Abbildung 2.1: Dendritische Spines. (A) Ramón y Cajals Originalzeichnung von Dendriten. (B) Schematischer Aufbau eines Pyramidal-Neurons. (C) Skizzierung einer Synapse. CaMKII: Calcium/Calmodulin-abhängige Protein-Kinasell, AMPA: α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure, NMDA: N-Methy-D-Aspartat, PSD: Postsynaptische Dichte, ER: Endoplasmatisches Reticulum.

des chemischen Neurotransmittersignals in ein elektrisches Signal einleiten. Ein anderer Rezeptor, der N-Methy-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor), kann ebenfalls durch Glutamat aktiviert werden. Dabei kommt es aber nur dann zum Einstrom von Ca^{2+} , wenn die postsynaptische Membran gleichzeitig depolarisiert ist.

Dieser Zustand tritt dann ein, wenn Prä- und Postsynapsen parallel aktiv sind, wie z.B. bei der Langzeit-Potenzierung.

Ca²⁺ bewirkt eine Vielzahl von Modifikationen in der Postsynapse, um sie auf zukünftige Aktivierung zu justieren. Folgend sind einige postsynaptische Effektoren genannt, die sensibel auf präsynaptische Signale reagieren können^[23,91,185,186,202] [68,190,231].

- Die Aktivierung der Calcium/Calmodulin abhängigen Protein-Kinasell (CaMKII). Die Modulation der synaptischen Stärke geschieht hierbei z.B. direkt durch die Phosphorylierung von Glutamat-Rezeptoren oder Strukturproteinen wie Stargazin, oder indirekt durch die Erhöhung der AMPA-Rezeptorenzahl an der postsynaptischen Membran.
- Die Organisation weiterer Neurotransmitter-Rezeptoren durch ein komplexes System von Signal- und Strukturbildenden Proteinen wie z.B. PSD-95, Homer oder Shank. Zusammen erscheint dieses Protein-Geflecht in ultrastrukturellen Untersuchungen als elektronendichte Struktur, die als postsynaptische Dichte (PSD) bezeichnet wird.
- Die Konzentration von N-Cadherin, Integrin, Neurexin/Neuregulin und Ephrin/Ephrin-Rezeptoren.
- Die morphologische Variation der Postsynapse durch das Aktin-Zytoskelett.
- Der dendritische Transport von mRNA und die lokale Translation aktivitätsregulierter Gene. Dies findet an Polyribosomen statt, die an Ausläufern des Endoplasmatischen Reticulums (ER) in der Postsynapse lokalisiert sind.

2.2 Dendritische Spines

1873 entwickelte der italienische Neuroanatom Camillo Golgi ein chemisches Verfahren zur Färbung einzelner Neurone im Hirngewebe. Bei diesem Verfahren werden weniger als ein Prozent aller Neurone markiert. Sie erscheinen in voller Ganzheit, eingeschlossen feinsten verzweigter Strukturen^[74]. Zunächst hielt Golgi die feinen Ausstülpungen am Dendritenschaft für Silberpräzipitate in den verwendeten Chemikalien^[146]. Erst 14 Jahre später beschrieb Ramón y Cajal an Vogelhirnschnitten eben genau diese Ausstülpungen am Dendriten als Spines (siehe Abbildung 2.1A)^[41,43,173].

2.2.1 Morphologie und Funktion

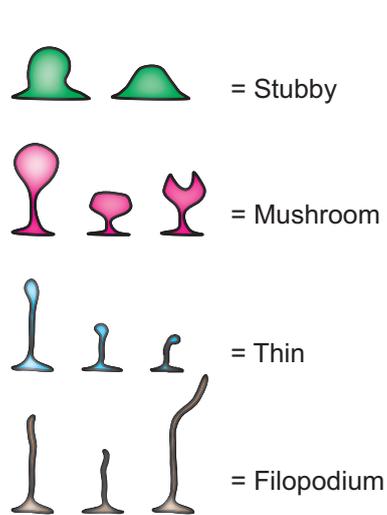


Abbildung 2.2:
Spine-Morphologien

Der typische Spine ist ein ca. 0,5-2µm großes Gebilde mit einem globulären Kopf, der über einen feinen Hals mit dem Dendritenast verbunden ist. Er lässt sich durch seine charakteristische Morphologie sehr gut mit mikroskopischen Methoden analysieren. Neben Spines wurden weitere dünne und flexible Strukturen am Dendritenschaft beobachtet, die als Filopodien bezeichnet werden. Ihnen fehlt die für Spines charakteristische PSD^[42]. Man glaubt, dass die bis zu 10µm langen, hoch flexiblen Fortsätze zunächst den Kontakt zu einem naheliegenden Axon ertasten, um sich dann zum Synapsen-bildenden Spine umzuwandeln^[42,142,238]. Entsprechend kurz ist auch ihre Lebensdauer: sie wurde zwischen einigen Minuten bis Stunden ge-

messen^[39]. Filopodien stellen also eine Art Vorstufe der Spines dar, wobei aber nur ca. 1% von ihnen als funktionelle Spines stabilisiert werden^[239]. In der Hirnrinde (Cortex) adulter Mäuse repräsentieren Filopodien nur noch zwei bis drei Prozent aller dendritischen Ausstülpungen und sind dementsprechend selten anzutreffen^[239].

Bis heute werden Spines grob nach ihrer morphologischen Erscheinungsform kategorisiert^[84,170] (siehe Abbildung 2.2):

Stubby: Stubby Spines sitzen direkt dem Dendritenschaft auf und sind in etwa genauso breit wie lang. Sie haben keinen Hals.

Mushroom: Mushroom Spines besitzen einen voluminösen Kopf auf dünnem Hals.

Thin: Thin Spines haben im Verhältnis zu ihrem langen Hals einen sehr kleinen häufig schwer erkennbaren Kopf.

Allerdings treten im Gehirn vielfältige Variationen dieser Grundformen auf. Die Übergänge sind fließend und bilden ein morphologisches Kontinuum^[231].

Im synaptischen Kontext werden die exzitatorischen Postsynapsen durch Spines repräsentiert. Sie sind den aktiven Zonen der Präsynapsen gegenübergestellt (siehe Abbildung 2.1C). In ihnen befindet sich außerdem die PSD. Wie bereits angedeutet, wird ihre Morphologie durch zytoskelettäre Aktin-Filamente bestimmt^[100]. Daneben finden sich auch Mitochondrien^[131], Polyribosome^[163], Endoplasmatisches Reticulum^[186] sowie Komponenten der Endo- und Exozytose^[155] wieder.

Nach Rafael Yuste sind dendritische Spines spezialisierte Strukturen für die Kommunikation zwischen Nervenzellen mit vollkommen eigenen elektrischen und biochemischen Eigenschaften^[231]. Durch die komplexe Struktur des neuronalen Netzwerks ist jede Zelle mit vielen anderen verbunden^[28]. Dadurch würde ohne Signalprozessierung des empfangenden Neurons eine starke Signalüberlagerung resultieren, was eine Informationsvernichtung zur Folge hätte. Dies geschieht jedoch nicht, wenn die Signale vom postsynaptischen Neuron individuell registriert und am Dendriten integriert werden^[26]. Die Spines können daher als „Empfängermodule“ zur Aufarbeitung und Integration neuronaler Impulse verstanden werden. Die Kompartimentierung wird dabei durch den dünnen Spine-Hals verursacht. Er entkoppelt den Spine vom Dendriten und bewirkt einen hohen elektrischen Widerstand. Durch die biochemische Eigenständigkeit können aufgrund eines Stimulus individuelle Veränderungen an einzelnen Spines stattfinden. In aktivierten Spines verändert sich z.B. die lokale Ca^{2+} -Konzentration, ein wichtiger Indikator der synaptischen Plastizität (siehe Abschnitt 2.1 auf Seite 3), während andere benachbarte Spines nicht beeinträchtigt werden^[231–233].

2.2.2 Strukturelle Spine-Plastizität

Während Dendritenbäume im adulten Gehirn relativ stabil sind und ihre Gestalt weitgehend festgelegt ist, sind Spines hoch flexibel. Sie können einerseits rapide in ihrer Morphologie variieren. Andererseits kann sich die Bestückung von Spines am Dendritenschaft ändern. Während einige etablierte Spines verloren gehen, werden neue gebildet. All diese Phänomene kann man unter dem Begriff der strukturellen Spine-Plastizität zusammenfassen^[68,146,150,210]. Es wurde in organotypischen Hirngewebeschnitten gezeigt, dass es durch die Erregung von Präsynapsen unter Anwendung von LTP-Stimulation zu einer Erhöhung des Spine-Volumens kommt. Dieser Effekt basiert auf einem NMDA-Rezeptorabhängigen

Umbau des Aktin-Zytoskeletts^[144,161]. Dagegen bewirkt die LTD-Stimulation eine reversible Verkleinerung der Spines^[161,235]. Die Spine-Geometrie geht dabei positiv mit der Zahl funktioneller AMPA-Rezeptoren in der PSD einher^[143]. Das Volumen der Thin Spines nimmt nach LTP-Stimulation permanent zu, weswegen diese Spine-Klasse mit Lernvorgängen assoziiert wurde. Die mushroom Spines verhalten sich dagegen sehr stabil und eine Volumenänderung scheint nur vorübergehend zu sein. Man hat sie deswegen mit Erinnerungsvorgängen in Zusammenhang gebracht^[19,144]. Die LTP-Stimulation führt außerdem dazu, dass weitere Spines aus dem Dendritenschaft perturbieren können^[58,138,156]. Die filopodiale Zwischenstufe wird dabei übersprungen und ein direkter physikalischer Kontakt zu Präsynapsen hergestellt. Dies geschieht innerhalb von 15 bis 19 Stunden mit all den dafür charakteristischen ultrastrukturellen Merkmalen^[154]. Verringert sich die neuronale Aktivität, kann dies dagegen zur Eliminierung von dendritischen Spines führen^[156].

Die strukturelle Spine-Plastizität bezieht sich aber nicht nur auf die räumliche Dimension, denn Spines verhalten sich auch hinsichtlich ihrer zeitlichen Kinetik plastisch. Dies konnte am lebenden Maus-Cortex zum ersten Mal im Jahr 2002 beschrieben werden^[80,210]. Als transiente Spines werden jene definiert, die weniger als 8 Tage stabil sind. Dagegen klassifiziert man alle mit längerer Existenzdauer als persistent^[96]. Die transienten Spines sind morphologisch betrachtet häufig klein, während persistente Spines relativ groß sind und in die Kategorie Mushroom fallen^[96,137]. Sie bilden funktionelle Synapsen aus^[120]. Passend dazu konnte man am lebenden Mausgehirn beobachten, dass Spines adulter Neurone relativ lange stabil sind und ca. 70% einen Zeitraum von 18 Monaten überstehen^[80,239]. Im Kontrast dazu dominiert in der postnatalen Entwicklung noch der Auf- und Umbau des neuronalen Netzwerks, weswegen die Mehrheit der Spines eine eher kurze Lebensdauer hat^[96].

Neben der Beobachtung und Beschreibung physiologischer Vorgänge am Dendriten wuchs in den Neurowissenschaften auch das Interesse, die strukturelle Spine-Plastizität zu beeinflussen, um Modelle für Lern- und Erinnerungsvorgänge auszuarbeiten. Darunter führte das Stutzen der Schnauzhaare von Mäusen^[95,210,218,239], der Verschluss eines Auges^[93], die Aufzucht in Dunkelheit^[212] oder die Zerstörung von Teilen der Netzhaut^[114] zu nachhaltigen Veränderungen in den Spine-Dynamiken. Dies geschah in genau den kortikalen Arealen, die die Informationen aus den affektierten Systemen verarbeiteten. Im Wesentlichen wurde dabei ein höherer Umsatz dendritischer Spines zusammen mit permanenten strukturellen Veränderungen beobachtet. Beim Verlust sensorischer Stimulation werden nach-

haltige Anpassungen in der strukturellen Plastizität erzwungen. Es ist daher fraglich, ob es sich hierbei tatsächlich um ein Konzept für Lern- und Erinnerungsvorgänge handelt. Deshalb sind aktuellere Studien wesentlich exakter auf die Frage eingegangen, inwieweit bei Mäusen konkrete Lernaufgaben dendritische Spines beeinflussen^[65,124,226,228]. Der Lernerfolg beim Training einer speziellen Greif- oder Balancierübung führte zur rapiden Ausstülpung neuer Spines im Motorcortex. Diese Spines blieben über Monate hinweg so lange stabil, wie die Übungen fortgeführt wurden. Daher stehen dendritische Spines in direkter Proportionalität zu den erlernten Fähigkeiten und repräsentieren somit auf physikalischer Ebene tatsächlich Lern- und Erinnerungsvorgänge. Im Kontrast zur Stärkung bereits bestehender synaptischer Verbindungen, führt die Ausbildung neuer Spines zur Erhöhung der Speicherkapazität innerhalb eines neuronalen Netzwerks^[27].

Die molekularen Vorgänge des Lernens und Erinnerns im Spine sind größtenteils unbekannt. Die Entschlüsselung der zugrunde liegenden Mechanismen sind Gegenstand aktueller Studien. Erste Fortschritte wurden bereits unter Zuhilfenahme genetischer und pharmakologischer Manipulationstechniken erzielt. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Spine-Destabilisierung nach verminderter neuronaler Aktivität von NMDA-Rezeptoren abhängig ist und von der CaMKII kontrolliert wird^[218,240].

Eine weitere Möglichkeit der kognitiven, sensorischen und motorischen Stimulation kann durch die sogenannte reizangereicherte Umgebung (Enriched Environment) erzielt werden. Das Enriched Environment wurde von Donald O. Hebb entwickelt, nachdem er beobachtete, dass seine als Haustiere gehaltenen Ratten in Laborversuchen besser abschnitten als jene aus standardisierten Zuchtkäfigen^[87]. Das Enriched Environment sieht in der Regel einen größeren Käfig vor, der mit einer Vielzahl wechselnder Spielzeuge ausgestattet ist. Außerdem haben in ihm die Versuchstiere die Möglichkeit, sozial zu interagieren und sich frei zu bewegen^[179,215]. Das Enriched Environment beeinflusst Genexpression^[62], erhöht die Neurogenese im adulten Hippocampus^[116], verändert das Gewicht des Gehirns^[14] und die Komplexität des Dendritenbaums^[79]. Im lebenden Maushirn wurde durch das Enriched Environment die cortikale Spine-Dichte und der Spine-Umsatz nachhaltig erhöht. Außerdem zeichnete sich ab, dass das Enriched Environment die Integration neu gebildeter Spines in ein bestehendes funktionales Netzwerk fördert^[66,110].

Die strukturelle Plastizität der präsynaptischen Endigungen (axonale Boutons) ist relativ unerforscht. Axonale Fasern und Verzweigungen sind teils stabil, können

aber durch sensorische Manipulation entsprechend schrumpfen oder anwachsen^[141,227]. Ähnlich wie Spines sind auch Boutons flexibel und können sich aufgrund entsprechender Stimuli durch Neubildung, Verlust oder Reorganisation plastisch verhalten. Damit tragen Boutons wahrscheinlich ebenfalls zur funktionalen Plastizität neuronaler Netzwerke bei^[13,115].

2.3 Die intravitale Zweiphotonenmikroskopie

Wie ist es überhaupt möglich, Vorgänge in der strukturellen Plastizität zu messen? Die Untersuchungen Cajals basierten hauptsächlich auf lichtmikroskopischen Methoden^[174]. Ausgehend davon hat sich über die Jahrzehnte die Lichtmikroskopie als eines der bedeutungsvollsten Werkzeuge zur Erforschung neurobiologischer Phänomene herauskristallisiert. Allerdings setzen viele Methoden die Fixierung des Hirngewebes und dessen chemische Färbung voraus. Um dynamische Vorgänge am Dendriten beobachten zu können, muss die Nervenzelle jedoch intakt bleiben und in ihrer physiologischen Umgebung eingebettet sein. Für diese Rahmenbedingungen hat sich heute die Zweiphotonen Laser Scanning Fluoreszenz Mikroskopie (kurz Zweiphotonenmikroskopie) bewährt.

Fluoreszierende Farbstoffe absorbieren eintreffende Photonen, wodurch ein Elektron auf ein höheres Energieniveau angehoben wird (siehe Abbildung 2.3A). Dort verbleibt es für einige Nanosekunden und fällt wieder auf ein energieärmeres Niveau zurück. Dabei wird ein Photon emittiert. Aufgrund intramolekularer Relaxationen teilt sich die abgegebene Energie in Wärme und Licht auf, sodass das abgestrahlte Fluoreszenzlicht immer langwelliger und somit energieärmer als das Anregungslicht ist. Dieser Unterschied wird nach seinem Entdecker Stokes-Verschiebung genannt^[125].

Das Anregungsphoton kann durch zwei oder mehrere Photonen ersetzt werden, wenn sie in der Summe die gleiche Energie wie ein einzelnes Anregungsphoton liefern. Bei der Multi-Photonen-Anregung müssen die Photonen innerhalb einer Attosekunde eintreffen, um das Elektron auf das nächste stabile Energieniveau anzuheben. Für das quasi gleichzeitige Eintreffen zweier Photonen im Fokuspunkt sind sehr hohe Photonendichten notwendig. Diese können von besonders gepulsten Lasern erzeugt werden, die intensive und sehr kurze Laserpulse mit hoher Rate generieren. Durch die Pause zwischen den einzelnen Pulsen kann die gesamte

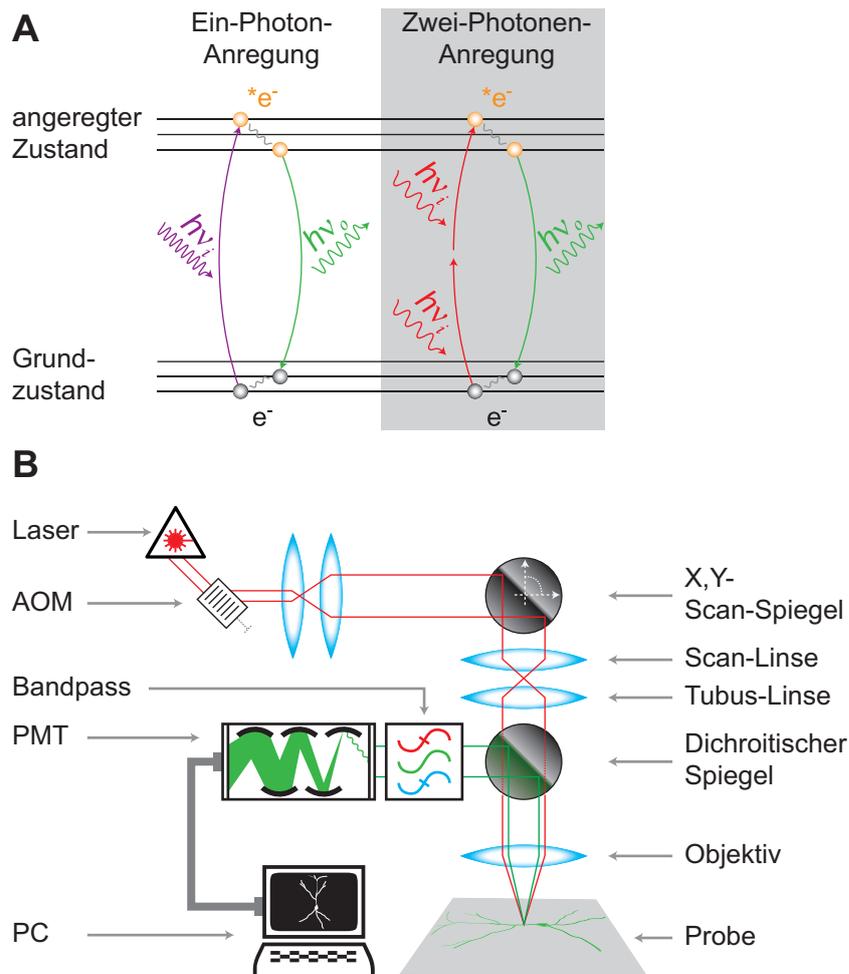


Abbildung 2.3: Prinzipien der Zweiphotonenmikroskopie. (A) Jablonski Diagramm der linearen Ein-Photonen- und der nicht-linearen Zwei-Photonen-Anregung eines Fluorophors. **(B)** Aufbau eines Zweiphotonenmikroskops. e^- : Elektron, $h\nu_i$: absorbiertes Photon, $h\nu_o$: emittiertes Photon, AOM: akustooptischer Modulator, PMT: Detektor, PC: Computer.

durch den Laser erzeugte Energie in einem Bruchteil der Zeit abgegeben werden. Als Anregungsquelle eignen sich z.B. Titan-Saphir-Laser, an denen sich Wellenlängen zwischen 700nm und ca. 1050nm einstellen lassen. Da die Zwei-Photonen-Anregung des Fluorophors nicht linear erfolgt, ist das Anregungsspektrum nicht aus der linearen Anregung vorhersehbar. In der Praxis hat sich gezeigt, dass das Zwei-Photonen-Anregungsspektrum sehr breit ist und die experimentellen Bedingungen jedes Mal erneut angepasst werden müssen.

Bei der Zweiphotonenmikroskopie wird zur Erzeugung eines zweidimensionalen Bildes das Objektiv zunächst in die Probe fokussiert und dann der Anregungsstrahl mittels eines im Strahlengang beweglichen Scan-Spiegels rasterförmig durch die Probe bewegt. Die Intensität der Anregungsstrahlung wird durch einen akustooptischen Modulator (AOM) gesteuert. Das Emissionslicht aus der fluoreszierenden Probe wird vom Objektiv auf dichroitische Strahlteiler geleitet. Sie reflektieren

einen Teil des Lichtspektrums während der restliche Anteil transmittiert. Das spektral gefilterte Licht erreicht nun den Detektor (PMT), der jeden Bildpunkt nacheinander detektiert. Am Steuerungscomputer (PC) werden die gemessenen Bildpunkte zu einem Bild zusammengesetzt (siehe Abbildung 2.3B)^[45,46,48,177].

Gegenüber der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie bietet die Zweiphotonenmikroskopie erhebliche Vorteile, die sich aus der physikalischen Natur der Methode herleiten lassen^[46,177,200]:

- Das langwellige Anregungslicht dringt durch reduzierte Absorptions- und Streueffekte tiefer in lebendes Gewebe ein. Mit einer Eindringtiefe von ca. einem Millimeter im lebenden Mausgehirn lassen sich damit nahezu komplette Dendritenbäume und einzelne Spines von Schicht 5 Neuronen erfassen.
- Die Phototoxizität, also die Zerstörung biologischen Gewebes durch Licht, sowie das Ausbleichen von Fluorophoren reduziert sich bei der Zweiphotonenmikroskopie erheblich, da sich die Anregung nur auf eine sehr kleine Umgebung des Fokuspunkts konzentriert. Die Bereiche darüber und darunter werden nicht angeregt.
- Aus dem letzten Punkt ergibt sich auch, dass sämtliches Emissionslicht aufgefangen werden kann. Damit kann auf eine Lochblende verzichtet werden. Reduzierte Energie und Zeitdauer für die Bildgebung schonen die biologische Probe.

Um mit der Zweiphotonenmikroskopie biologische Strukturen im Submikrometerbereich auflösen zu können, müssen diese entsprechend mit einem Fluorophor markiert sein. Inzwischen wurden viele effiziente synthetische Fluorophore entwickelt, die in Zellen eindringen können oder injiziert werden^[69,157,199]. Die Fluorophore können dabei auch selektiv Zelltypen, Proteinstrukturen oder Blutgefäße im lebenden Tier markieren^[21,119,177]. Für Langzeitexperimente haben sich Fluorophore bewährt, die direkt von den Zellen gebildet werden. Als Beispiel sei das grün fluoreszierende Protein (GFP) genannt, das von dem Nobelpreisträger Osamu Shimomura in der Quallenart *Aequorea victoria* beschrieben wurde^[193]. Inzwischen gibt es eine Vielzahl gentechnisch modifizierter GFP-Spektral-Varianten.

Die genetische Expressionskontrolle des Fluorophors unter dem neuronspezifischen Thy-1 Promotor ermöglicht die selektive Markierung von Nervenzellen. Dies kann z.B. durch die Anwendung viraler Systeme ermöglicht werden, die ein entsprechendes genetisches Konstrukt in Nervenzellen einschleusen^[50,196]. Alternativ

dazu gibt es transgene Mauslinien, bei denen die genetischen Konstrukte zur Fluorophorbildung fest im Genom verankert sind. Der Umgang mit transgenen Mausmodellen ist mit weniger Invasivität verbunden, weswegen sie die viralen Systeme für den Zweck der Neuronen-Markierung praktisch abgelöst haben. Je nach Insertionsort des Transgens auf den Chromosomen, kann eine Vielzahl oder eine kleine Population von Neuronen gefärbt sein^[60]. Die in dieser Arbeit verwendete SlickV-Mauslinie exprimiert das gelb fluoreszierende Protein (YFP) in vereinzelt Neuronen der kortikalen Schicht 2/3, Schicht 5 und des Hippocampus (siehe Abbildung 3.1 auf Seite 22)^[60,230]. Dieses Mausmodell ist durch die intensive Einzelzell-Markierung von Neuronen sehr gut für die intravitale Zweiphotonenmikroskopie kortikaler Neurone geeignet.

Da das Gehirn der Maus von undurchsichtigem Schädelknochen umgeben ist, muss zur intravitalem Zweiphotonenmikroskopie ein optischer Zugang angelegt werden. Dabei gibt es im Wesentlichen zwei verschiedene Herangehensweisen:

Die thinned-skull Methode: Thinned-skull steht für ausgedünnter Schädelknochen. Der Schädel wird hierbei lokal zu einer ca. 20µm dünnen, durchsichtigen Knochenschicht abgetragen. Die mikroskopierbare Fläche beträgt typischerweise 0,1-0,3mm² und erlaubt für 24 Stunden die Erfassung sehr oberflächlicher Strukturen. Sollen wiederholte Aufnahmen durchgeführt werden, muss man die Schädeldecke erneut ausdünnen. Die Vorteile dieser Methode sind, dass der Mikroskopierzeitraum zwischen Monaten bis Jahren frei gewählt werden kann. Außerdem bleibt das Gehirn in seinem physiologischen Zustand relativ unbeeinträchtigt^[80,94,229].

Die open-skull Methode: Open-skull steht für offener Schädelknochen. Je nach gewünschter kortikalen Region wird hierbei der Schädelknochen entfernt - meistens im Durchmesser von drei bis acht Millimetern. An dieser Stelle wird anschließend ein dünnes Glasdeckgläschen implantiert, der Knochen sozusagen durch Glas ersetzt (kraniales Fenster). Diese Methode ermöglicht einen wesentlich besseren und größeren optischen Zugang zum Gehirn als die thinned-skull Methode. Abhängig von der Qualität der Operation bleiben kraniale Fenster für repetitives Mikroskopieren über Wochen bis Monate klar und ermöglichen optische Eindringtiefen bis zu 800µm. Im Kontrast zur thinned-skull Methode ist diese Herangehensweise wesentlich invasiver. Dies zeigt sich besonders durch das Auftreten einer lokalen inflammatorischen Glia-Reaktion, die in der Regel nach drei Wochen abklingt^[94,177,229].

Ein ausgedünnter und durch ein Deckgläschen stabilisierter Schädelknochen ermöglicht ebenfalls wiederholte Aufnahmen über mehrere Wochen. Allerdings sind hier hochauflösende Aufnahmen aus dem Cortex nur bis zu einer Eindringtiefe von 100µm möglich^[54].

2.4 Dendritische Spine-Stabilität

Entlang ausgereifter Dendriten haben ca. 95% der dendritischen Spines eine entsprechende Präsynapse^[7,83]. Langzeitmikroskopische Untersuchungen an Nagetieren weisen darauf hin, dass die meisten dendritischen Bäume und deren Spines über Monate bis möglicherweise Jahre stabil bleiben. Beim Menschen wäre es daher auch denkbar, dass individuelle Synapsen für den Großteil der Lebenszeit vorhanden sind^[96,137,210,239]. Synapsen- und Spineuntergang wird im normal alternen Gehirn beobachtet. Allerdings geschieht dies bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen in verstärkter Form. Diese Beeinträchtigung gilt als Hauptursache für Stimmungsschwankungen, gestörte Wahrnehmung und eingeschränkte kognitive Leistung^[5,64,67,72,73,129,219]. Die Stabilität von Synapsen und Spines ist daher für die funktionale Integrität des Gehirns und für die Aufrechterhaltung kognitiver Leistungen von herausragender Bedeutung. Aus diesem Grund ist das Wissen über die Ausbildung und Stabilisierung von Spines von grundlegender Wichtigkeit für die Neurowissenschaften. Doch die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Spine-Stabilität sind nach wie vor schwer fassbar.

Wie bereits angesprochen ist bekannt, dass die Aufrechterhaltung und Formgebung von Spines letztendlich auch von Strukturproteinen und deren Effektoren abhängt (siehe auch Erörterungen auf Seite 6). Die strukturelle Langzeit-Unterstützung am Spine wird essenziell durch das F-Aktin-Zytoskelett ermöglicht. Neben der Morphologie determinierenden Funktion organisiert F-Aktin auch die Integrität dendritischer Spines und die Signalmaschinerie entlang der PSD^[49]. Alle F-Aktin-medierten Vorgänge unterliegen einer perfekten Balance zwischen Polymerisation und Depolymerisation. Jeder pharmakogenetische Eingriff in dieses empfindliche Gleichgewicht wirkt sich unmittelbar auf die Größe, Form und Beweglichkeit der Spines aus^[63,97,161]. Es ist jedoch nicht nur die Aktin-Zytoskelettdynamik für die Spine-Plastizität verantwortlich. Auch die Mikrotubuli-Dynamik gewinnt zunehmend als formgebendes Element an Bedeutung^[104,112]. Strukturstützende Proteine wie z.B. PSD-95^[55,59], Shank^[180] oder Homer^[180,225]

leisten ebenfalls ihren Beitrag zur Spine-Stabilität. Die Reduktion synaptischer Aktivität führt zum Abbau dendritischer Spines. Dies weist darauf hin, dass synaptische Impulse am Spine kritisch für deren Aufrechterhaltung sind^[32,35,66,106,145,188]. Ist eine Synapse erst einmal ausgebildet, tragen Zell-Adhäsionssysteme (Catenin/Cadherin-Komplexe^[8,208], Neurexin/Neuregolin-Komplexe^[37], Ephrin/Ephrin-Rezeptoren^[113,118], Integrine^[18,192]) und neurotrophische Faktoren (BDNF^[25], Neuregulin^[11]) ebenfalls zur Spine-Stabilität bei.

2.5 Signalkaskaden und Plastizität

Signalkaskaden dienen in der Regel der Weiterleitung (Transduktion) eines äußeren oder inneren Stimulus zu Effektorproteinen, um eine Reaktion in der Zelle hervorzurufen. Der Mechanismus wird meistens durch Protein-Protein-Interaktionen und einer Aktivierung dazwischen geschalteter Mediatoren erfüllt. Sie können wiederum andere Signalproteine aktivieren, sodass ein komplexes Signalnetzwerk entsteht. Dabei wird oft eine Amplifikation des Ursprungssignals erzielt. Eine Variante der (In-)Aktivierung von Signalproteinen geschieht über ihre Phosphorylierung durch Kinasen, oder die Dephosphorylierung durch Phosphatasen^[3]. Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, benötigen dendritische Spines Stabilität, um synaptische Verbindungen über lange Zeit hinweg aufrecht zu erhalten. Aber auf der anderen Seite sind sie hochflexible, plastische Gebilde, die sich jederzeit ändern können. Man glaubt, viele dieser plastischen und hochdynamischen Vorgänge werden von Kinasen und deren Signalkaskaden kontrolliert^[126,191]. Beispielshalber sollen hier sehr kurz einige prominente Signalwege erläutert werden, die mit der Modulation der strukturellen Plastizität am Spine assoziiert wurden:

Rho/Rac: Der Rho/Rac-Signalweg beeinflusst direkt den Ausbau und auch den Rückzug von Spines unter Anteilnahme des Aktin-Zytoskeletts^[59,132].

CaMKII: Eine der vielen Funktionen der CaMKII Isozyme ist die aktivitätsinduzierte Spine-Stabilisierung. Charakteristisch für die CaMKII ist die Mannigfaltigkeit an Protein-Protein-Interaktionsmöglichkeiten. Die β -Isoform verfügt darüber hinaus über eine Bindestelle für F-Aktin, um dessen Stabilisierung zu unterstützen^[132,217].

PKA: Postsynaptisch erhöht der Protein-Kinase A Signalweg die Wahrscheinlichkeit, dass sich AMPA-Rezeptoren durch einen Glutamat-Stimulus öffnen und

sich effizienter entlang der Postsynapse verankern^[1].

MAPK: Die Mitogen aktivierte Protein-Kinasen Signalisierung umfasst eine Gruppe verwandter Kinasen, die allesamt eine Rolle in der synaptischen Langzeit-Plastizität ausüben. Im Beispiel der ERK-Aktivierung kommt es zusammen mit einer Spine-Vergrößerung zur Insertion von AMPA-Rezeptoren und zur Stärkung der synaptischen Übertragung^[16].

Wnt: Wnt-Signalwege leisten einen besonderen Beitrag unter anderem bei der Festlegung der Zellpolarität, dem axonalen Wachstum und dem Ausreifen von Dendriten. Es gibt aber vermehrt Hinweise darauf, dass Wnt-Signalwege an der Synapse und ihrer Plastizität eine Rolle spielen. Dies kann über den Zellkern via der β -Catenin regulierten Genexpression, oder zytosolisch unter Einbezug von Protein-Kinase C, CaMKII oder der Variation der lokalen Ca^{2+} -Konzentration geschehen^[8,214].

Die Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) moduliert ein weiteres komplexes Netzwerk, welches erst kürzlich mit synaptischer Plastizität in Verbindung gebracht wurde^[20,166]. Für GSK-3 wurde darüber hinaus eine Funktion bei der Vesikelfreisetzung und Wiedergewinnung an der Präsynapse während der synaptischen Aktivität beschrieben^[33,236]. Einige der oben genannten Kandidaten haben GSK-3 als Effektor^[164]. Die meisten Untersuchungen konzentrierten sich jedoch auf die präsynaptische Seite und wurden in artifiziellen Zellkultur-Systemen durchgeführt. Andere Studien beschäftigten sich dagegen an organotypischen Hirnschnitten mit der Elektrophysiologie. Die *in vivo* Rolle von GSK-3 in der strukturellen Spine-Plastizität bleibt jedoch unaufgeklärt. Dieser Fragestellung widmet sich diese Arbeit.

2.6 GSK-3 β und synaptische Plastizität

GSK-3 ist eine Serin/Threonin Protein-Kinase. Sie katalysiert bei Proteinen das Anhängen von Phosphatgruppen an Serin- oder Threonin-Aminosäure-Reste unter Spaltung von Adenosintriphosphat (ATP). Wie sich bereits am Namen erkennen lässt, wurde dieses Enzym zum ersten mal 1980 im Zusammenhang mit dem Zuckermetabolismus entdeckt^[57]. Seither hat sich GSK-3 als eine nahezu universelle Kinase für über 40 verschiedene Proteine in unterschiedlichen Signalwegen herausgestellt^[107]. Eine GSK-3 vermittelte Phosphorylierung inhibiert in der Regel die Aktivität des Zielproteins. GSK-3 existiert in zwei Isoformen, der α - und β -Isoform.

Die Aktivität der α -Isoform wird durch die Phosphorylierung der Aminosäure Serin 21 reguliert. Bei der β -Isoform geschieht dies durch Phosphorylierung von Serin 9^[38]. Besonders der β -Isoform werden diverse Funktionen zugesprochen, z.B. die Glukoseregulation, Zellproliferation, Zellmigration, Inflammation, Immunantwort, Apoptose und Festlegung der neuronalen Polarität^[4,105,220,221]. GSK-3 β wird im sich entwickelnden, aber auch im adulten Gehirn in großen Mengen gebildet. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigen darüber hinaus die Anwesenheit von GSK-3 β in ausdifferenzierten Dendriten und Synapsen^[169]. Die Indizien für eine Beteiligung von GSK-3 β in der synaptischen Plastizität stützen sich hauptsächlich auf Befunde, die durch elektrophysiologische Studien an organotypischen Hirnschnitten erhoben wurden^[20,166].

Der NMDA-Rezeptor-medierte LTP-Stimulus bewirkt, dass sich vermehrt NMDA- und AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran verankern und Synapsen vergrößern (siehe auch Abschnitt 2.1 „Synaptische Plastizität“ auf Seite 3)^[127,139,144]^[36]. Der LTD-Stimulus dagegen repräsentiert das Gegenteil zur LTP-Stimulation. Sie bewirkt unter anderem die Loslösung von AMPA-Rezeptoren aus der Membran - es kommt somit zur Schwächung der synaptischen Stärke^[12,36]. Es stellte sich heraus, dass es durch GSK-3-Inhibition nicht mehr zur Endozytose postsynaptischer AMPA-Rezeptoren kommt und die LTD-Induktion somit blockiert wird^[166]. Dieser Effekt scheint spezifisch von GSK-3 und keiner anderen verwandten Kinase abhängig zu sein^[165]. Dies betrifft nur die LTD-Induktion, nicht aber die LTP oder andere Formen der Plastizität^[166]. Unter Normalbedingungen kommt es bei der LTP-Stimulation durch Serin-9-Phosphorylierung zur intrinsischen Inhibition von GSK-3^[99]. Darüber hinaus blockiert eine GSK-3 Überexpression die Induktion einer LTP-Antwort^[166]. Zusammengefasst führen diese Befunde zur Hypothese, dass LTP und LTD über einen molekularen Pfad interagieren, der GSK-3 als „molekularen Schalter“ involviert.

Es hat sich herausgestellt, dass GSK-3 β von vielen Signalwegen inhibiert wird, die mit der synaptischen Plastizität in Verbindung stehen. So können z.B. CaMKII, p38-MAPK oder PKA GSK-3 β direkt durch S9-Phosphorylierung inaktivieren^[160,195,206]. Dagegen bewirkt der Einstrom von Ca²⁺ in die Synapse die Aktivierung von Protein-Phosphatase-1. Sie aktiviert GSK-3 β durch S9-Dephosphorylierung. Dieser Signalweg ist wichtig zur Induktion der LTD^[151]. Über die bekannten Zielproteine von GSK-3 β lässt sich ebenfalls eine Beteiligung des Enzyms bei der neuronalen Plastizität herleiten. Erstens kann GSK-3 direkt mit einer ganzen Reihe von Proteinen in

Verbindung treten, die eng mit der Dynamik des Zytoskeletts verknüpft sind. Beispielshalber kann GSK-3 Mikrotubuli-assoziierte Proteine wie Tau, MAP1b oder MAP2c phosphorylieren und somit deren Fähigkeit Mikrotubuli zu stabilisieren verändern^[77,181,197]. Zweitens verfügt das Protein CREB über eine Phosphorylierungsstelle für GSK-3. CREB ist ein Transkriptionsregulator von Genen, die unter anderem mit Langzeit-Lernvorgängen in Zusammenhang gebracht werden. CREB aktiviert die Transkription unmittelbar früher Gene, die innerhalb von Minuten nach der neuronalen Stimulation aktiv werden. Sie codieren Wachstumsfaktoren, Stoffwechsellenzyme, Zellmembranproteine und Signaltransduktionsproteine^[44,189]. Drittens bewirkt GSK-3 β durch β -Catenin-Phosphorylierung im Wnt-Signalweg dessen Stilllegung. Die Funktion von β -Catenin in adulten Nervenzellen ist noch relativ unverstanden. Neben seiner Aktivität als Transkriptionsfaktor weiß man aber, dass es bei der Ausbildung von Zelladhäsionskontakten an der Synapse beteiligt ist^[152]. Funktional betrachtet beeinflusst β -Catenin die Spontanaktivität von Neuronen. Hinsichtlich der Spine-Morphologie hat β -Catenin einen Effekt auf die Spine-Morphogenese^[8,152,162].

Obwohl sich die β -Isoform von GSK-3 als Hauptspieler in der synaptischen Plastizität herauskristallisierte, kann man eine Beteiligung der α -Isoform nicht ausschließen. Es sind jedoch kaum Informationen über eine Beteiligung von GSK-3 α am Spine vorhanden. Die physiologische Charakterisierung von GSK-3 β in der neuronalen Plastizität ist auch aus medizinischer Sicht von Bedeutung. Abnormale GSK-3 β -Aktivität wurde mit vielen psychiatrischen Erkrankungen assoziiert, die mit eingeschränkten kognitiven Leistungen und Synapsenuntergang einhergehen. Darunter fällt die Alzheimer-Erkrankung, Schizophrenie, Fragiles-X-Syndrom oder Fronto-Temporale-Demenz, um nur einige zu nennen^[31,148,171,204]. Deshalb bleibt GSK-3 β nach wie vor ein interessantes Ziel der Pharma-Industrie zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien^[34,56,221].

2.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die obigen Erörterungen führen zur Hypothese, dass GSK-3 β auch in der strukturellen Spine-Plastizität eine Funktion übernimmt. Obwohl die Hinweise relativ eindeutig sind, wurde eine Rolle von GSK-3 β in der strukturellen Spine-Plastizität noch nicht untersucht.

Diese Arbeit soll deshalb den Einfluss von GSK-3 β auf Spine-Dichten, Spine-Dynamiken, funktionelle Relevanz und eventuelle zugrunde liegende molekulare Mechanismen beleuchten. Insbesondere steht hier die postsynaptische *in vivo* Charakterisierung des Enzyms im adulten Maus-Neuron im Fokus. Da eine genomische Deletion von GSK-3 β zur Letalität des Mausembryos führt^[92], sollen neue pharmakologische und genetische Manipulationsansätze zur zeitlich und örtlich kontrollierten Manipulation der GSK-3 β -Aktivität etabliert und angewendet werden. Unter Einbezug hochauflösender Bildgebungsverfahren wie Konfokal- und intravitale Zweiphotonenmikroskopie sollen die erbrachten Ergebnisse zum Verständnis über die Mechanismen des Lernens und Erinnerns beitragen.

Die physiologische Charakterisierung von GSK-3 β in der strukturellen Spine-Plastizität ist nicht nur für die Grundlagenforschung von Interesse, sondern hat darüber hinaus auch Bedeutung für die Entwicklung therapeutischer Strategien zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen.

3 Ergebnisse

3.1 Die GSK-3 β ^{LoxP(EX2)} \times SlickV-Mauslinie

Die genomische GSK-3 β -Defizienz ist für den Mausembryo aufgrund einer gravierenden Leberdegeneration tödlich^[92]. Für die Analyse der GSK-3 β -Funktion in adulten Nervenzellen müssen daher andere Knockout-Strategien herangezogen werden, die eine zeitliche und örtliche Kontrolle der Expression erlauben. Das Cre/LoxP-Rekombinationssystem eignet sich dazu besonders gut. Cre-Rekombinasen katalysieren die Spaltung von DNA zwischen spezifischen DNA-Erkennungssequenzen. Diese werden als „LoxP“-Stellen bezeichnet und flankieren das auszuscheidende Gen^[207]. Die in dieser Arbeit verwendete SlickV-Linie ist eine transgene Mauslinie, die speziell für die Cre/Lox-Rekombination im Gehirn generiert wurde^[230]. Sie bildet in Neuronen unter der Kontrolle des Thy-1 Promotors die Cre-ER^{T2}-Rekombinase zusammen mit YFP. Thy-1 ist ein Zelloberflächen-Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie, das unter anderem im Thymus und im Nervensystem gebildet wird^[24]. Wegen der Lokalisation des SlickV-Transgens im Mausgenom ist das Konstrukt vereinzelt in Neuronen der kortikalen Schicht 2/3, Schicht 5 oder des Hippocampus aktiv^[230]. Wie auch in Abbildung 3.1A zu sehen ist, eignet sich dadurch diese Mauslinie besonders gut für konfokale und intravital-mikroskopische Untersuchungen, weil relativ wenig Hintergrundfluoreszenz zu erwarten ist^[17,230].

Alle YFP-positiven Zellen verfügen über die Cre-ER^{T2}-Rekombinase. Sie ist ursprünglich an ein weiteres Protein, das HSP90 (Hitze-Schock-Protein 90), gebunden. Aufgrund der Größe dieses Komplexes kann die Cre-ER^{T2}-Rekombinase nicht in den Zellkern eindringen. Tamoxifen, ein Östrogenanalogon, bewirkt jedoch die Dissoziation von HSP90, wodurch Cre-ER^{T2} in den Zellkern diffundieren und dort genomisch aktiv werden kann.

Die Effizienz des Knockouts hängt im Wesentlichen von drei Faktoren ab^[207]:

1. Die Konzentration, mit der Tamoxifen verabreicht wird. Je höher die Konzentration, umso wahrscheinlicher erreicht eine ausreichende Menge die Neurone. Zu hohe Dosen sind allerdings toxisch.
2. Der Verabreichungsweg: Tamoxifen kann intraperitoneal (i.p.) und oral verabreicht werden. Da die orale Verabreichung über eine Magensonde weiter verbreitet und für die Maus schonender ist, wurde dieser Verabreichungsweg ausgewählt.
3. Die Exposition der LoxP-Stellen: Je nachdem, wie gut die LoxP-Stellen für die Cre-ER^{T2}-Rekombinase zugänglich sind, desto effizienter erfolgt der Knockout.

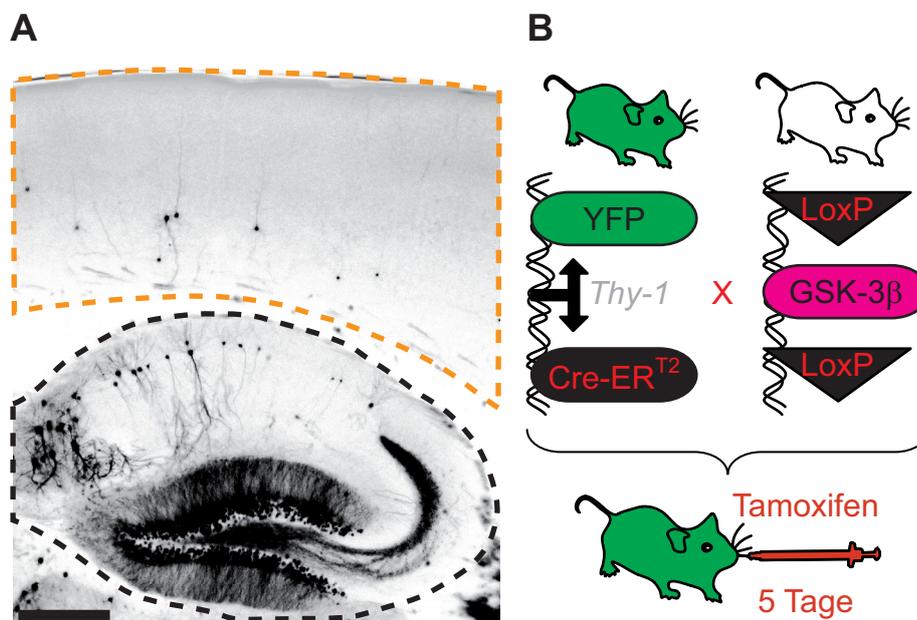


Abbildung 3.1: Die GSK-3 β ^{LoxP(EX2)}×SlickV-Mauslinie. (A) Ausschnittsvergrößerung aus einem SlickV-Sagittalschnitt. In orange ist der somatosensorische Cortex hervorgehoben, in schwarz der Hippocampus. (B) Kreuzungsschema zur Erzeugung der GSK-3 β ^{LoxP(EX2)}×SlickV-Mauslinie. SlickV-Mäuse bilden in YFP fluoreszierenden Neuronen Cre-ER^{T2}. Maßstabsbalken: 400 μ m.

Die SlickV- wurde mit der GSK-3 β ^{LoxP(EX2)}-Mauslinie verkreuzt. In ihr flankieren die LoxP-Stellen das Exon 2 von GSK-3 β , was dessen Knockout durch Tamoxifen-Induktion ermöglicht. Das Kreuzungsschema in Abbildung 3.1B verdeutlicht die Erzeugung der GSK-3 β ^{LoxP(EX2)}×SlickV-Linie. Die markierten Bereiche in Abbildung 3.1A sind die Hirnregionen, die für die folgenden Analysen in Betracht gezogen wurden: der somatosensorische Cortex (orange) und der Hippocampus (schwarz). Alle in dieser Arbeit analysierten Tiere befanden sich zu Beginn der Experimente

im Alter von zwei Monaten und waren unterschiedlichen Geschlechts.

3.2 Validierung des GSK-3 β -Einzelzell Knockouts

GSK-3 β ist mit einer Halbwertszeit von 48 Stunden ein relativ stabiles Protein^[52]. Deshalb wurde vor der eigentlichen Analyse immer noch eine zusätzliche Woche nach der letzten Tamoxifen-Verabreichung gewartet. In dieser Zeit sollten sich mögliche Effekte etablieren. In den folgenden Versuchen wurde zur Induktion des GSK-3 β -Knockouts Tamoxifen wie beschrieben^[230] oral in einer täglichen Dosis von 0,25mg/g 5 Tage lang verabreicht. Abbildung 3.2A zeigt exemplarisch die Immunhistochemie für GSK-3 β eine Woche nach dem Knockout. Während die meisten Zellen GSK-3 β gefärbt sind und somit das Enzym enthalten, fällt die Färbung in den YFP-positiven Zellen unter die Detektionsgrenze. Durch Auszählung in der hippocampalen Region CA1 (Abbildung 3.2B) wurde die Effektivität des Knockouts mit ca. 62% bestimmt.

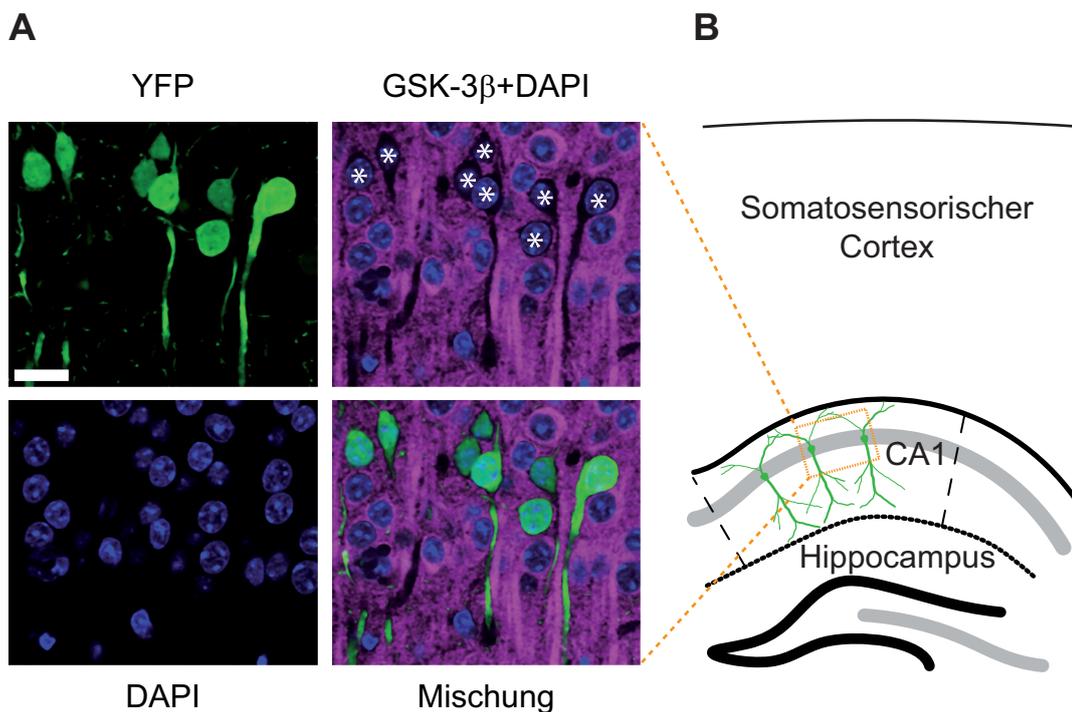


Abbildung 3.2: GSK-3 β -Einzelzell-Knockout. (A) Konfokales Bild aus der CA1-Region, eine Woche nach der letzten Tamoxifen-Administration. YFP und Sternchen identifizieren GSK-3 β -Knockout-Neurone. DAPI markiert die Zellkerne (Maßstabsleiste: 20 μ m). (B) Skizze zur Veranschaulichung der analysierten hippocampalen Region CA1.

3.3 GSK-3 β -Knockout reduziert dendritische Spine-Dichten

Um zu beurteilen, inwieweit GSK-3 β dendritische Spines beeinflusst, wurde ein Knockout in zwei Monate alten Tieren induziert. Eine Woche nach der letzten Tamoxifen-Administration wurden fixierte Gehirnschnitte hergestellt und das schwache intrinsische YFP-Signal immunhistochemisch verstärkt. Abbildung 3.3A zeigt, welche Dendriten für die Spine-Dichte-Bestimmung untersucht wurden. Dabei handelte es sich um apikale (blau eingerahmt) und basale (magenta eingerahmt) Dendriten zweiten Grades. Sie stammten von Neuronen aus dem Hippocampus CA1, und den kortikalen Schichten 2/3 und 5. In Abbildung 3.3B und Tabelle 3.1 ist zu erkennen, dass in allen untersuchten Regionen ein GSK-3 β -Knockout die Spine-Dichte signifikant um $29 \pm 6\%$ reduzierte.

Spine-Dichten nach GSK-3 β -Knockout			
Region	GSK-3 $\beta^{+/+}$	GSK-3 $\beta^{-/-}$	% Reduktion
CA1 apikal ^{t0} :	$1,92 \pm 0,04 \mu\text{m}^{-1}$	$1,93 \pm 0,07 \mu\text{m}^{-1}$	$\approx 0\%$
CA1 apikal:	$2,04 \pm 0,04 \mu\text{m}^{-1}$	$1,56 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$	$\approx 23\%$
CA1 basal:	$1,88 \pm 0,07 \mu\text{m}^{-1}$	$1,50 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$	$\approx 21\%$
Schicht 3 apikal:	$1,00 \pm 0,06 \mu\text{m}^{-1}$	$0,75 \pm 0,29 \mu\text{m}^{-1}$	$\approx 26\%$
Schicht 3 basal:	$0,95 \pm 0,06 \mu\text{m}^{-1}$	$0,64 \pm 0,04 \mu\text{m}^{-1}$	$\approx 33\%$
Schicht 5 apikal:	$1,10 \pm 0,04 \mu\text{m}^{-1}$	$0,73 \pm 0,07 \mu\text{m}^{-1}$	$\approx 34\%$
Schicht 5 basal:	$0,96 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$	$0,61 \pm 0,07 \mu\text{m}^{-1}$	$\approx 37\%$

Tabelle 3.1: Dendritische Spine-Dichten vor („t0“) und nach dem GSK-3 β -Knockout. Fehlte GSK-3 β in den Neuronen, reduzierte sich nach einer Woche die Spine-Dichte zwischen 21-37%.

Repräsentativ für diesen Effekt sind in Abbildung 3.3C einige Dendriten dargestellt. Um als Ursache mögliche Differenzen im genetischen Hintergrund der Mauslinie auszuschließen, wurde die Spine-Dichte apikaler CA1-Dendriten auch vor der Induktion des Knockouts quantifiziert („t0“). Die Spine-Dichte unterschied sich nicht signifikant von Wildtyp-Tieren (Abbildung 3.3D). Dies erhärtete den Befund der Spezifität des Knockouts.

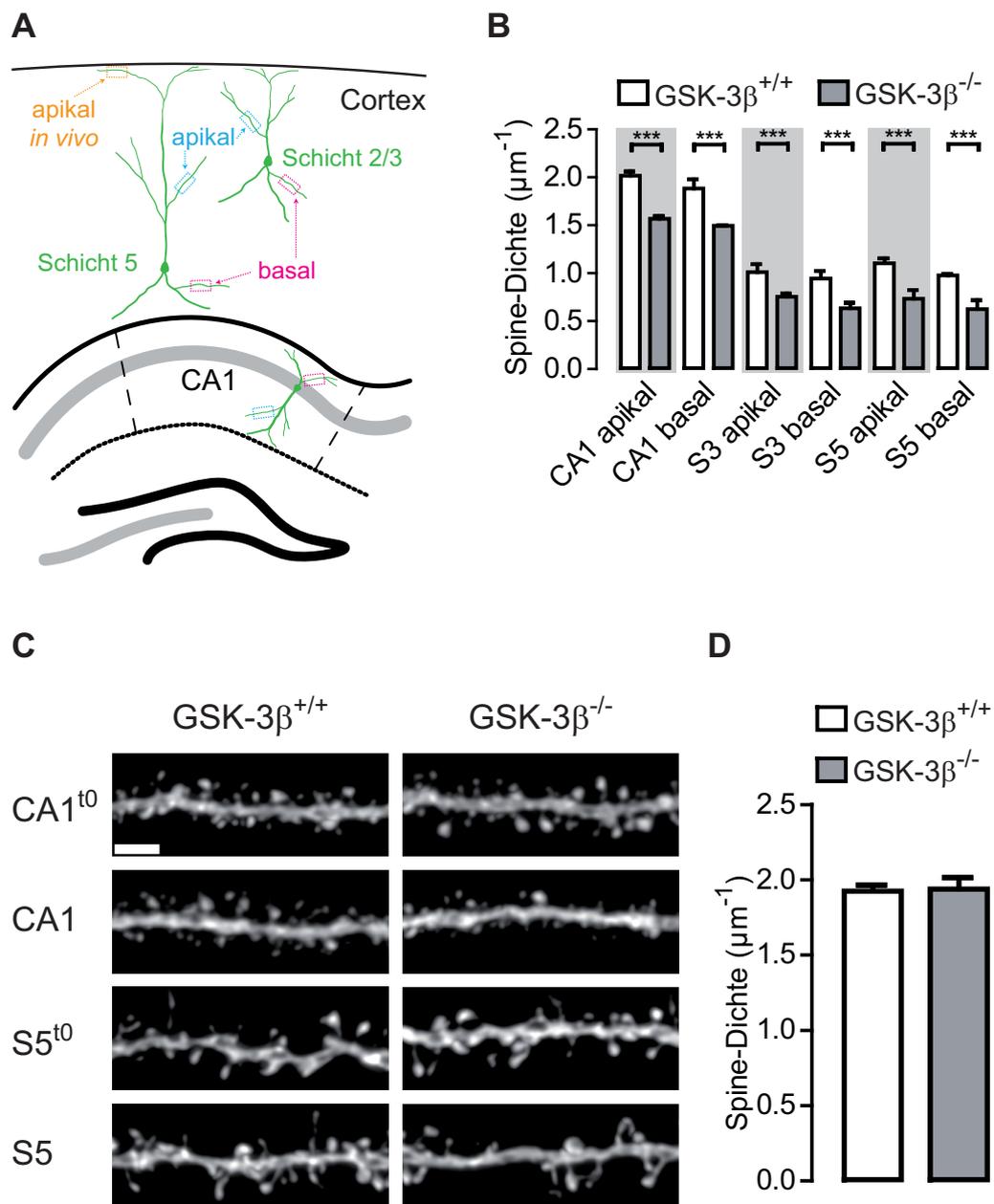


Abbildung 3.3: GSK-3 β -Knockout Effekt auf die Spine-Dichten. (A) Zeichnung zur Lage der Neurone, an denen die Spine-Dichte gemessen wurde. Blau: apikale Dendriten, magenta: basale Dendriten, gelb: apikale Dendriten für die intravitale Mikroskopie (siehe Abschnitt 3.12 auf Seite 36). (B) Dendritische Spine-Dichten aus verschiedenen Hirnregionen, eine Woche nach der letzten Tamoxifen-Administration ($p < 0,001$; t-Test; $n = 25$ Dendriten pro Tier; $N = 4-8$ Tiere). (C) Konfokale Aufnahmen exemplarischer apikaler Dendriten (Maßstabsleiste: $2\mu\text{m}$). (D) Spine-Dichte vor der Induktion des Knockouts („t0“; $p > 0,05$; t-Test; $n = 10$ Dendriten pro Tier; $N = 3$ Tiere). Fehlerbalken zeigen Standardabweichung. „t0“: Zeitpunkt vor Knockout, S3/5: Cortikale Schicht 3/5.

3.4 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Da die GSK-3 β vermittelte Spine-Dichte-Reduktion unabhängig von den untersuchten Hirn-Regionen beobachtet wurde, wurden für alle weiteren *Ex-vivo*-Analysen apikale CA1-Dendriten herangezogen. Die Frage, ob eine Gendosis-Abhängigkeit zwischen der Spine-Dichte-Reduktion und der GSK-3 β -Expression besteht, wurde mit der Durchführung eines heterozygoten Knockouts geklärt. In Abbildung 3.4 und Tabelle 3.2 ist erkennbar, dass der heterozygote GSK-3 β -Knockout ebenfalls eine Spine-Dichte-Reduktion verursachte.

CA1-Spine-Dichten im GSK-3 $\beta^{+/-}$ -Genotyp			
	GSK-3 $\beta^{+/+}$	GSK-3 $\beta^{+/-}$	GSK-3 $\beta^{-/-}$
Spine-Dichte:	*2,04 \pm 0,04 μm^{-1}	1,82 \pm 0,01 μm^{-1}	*1,56 \pm 0,02 μm^{-1}
% Reduktion:		\approx 10%	\approx 23%

Tabelle 3.2: Dendritische Spine-Dichten bei einem heterozygoten GSK-3 β -Knockout. Im Hippocampus CA1 bewirkte die halbe Gendosis nunmehr eine Spine-Dichte-Reduktion um ca. 10%, was knapp der Hälfte eines homozygoten GSK-3 β -Knockouts entsprach. * Wildtyp-Werte entstammen aus dem Experiment in Abschnitt 3.3 auf Seite 24.

Da sich die Spine-Dichte-Reduktion bei heterozygoter GSK-3 β -Deletion um ca. die Hälfte des homozygoten Knockouts belief, ist es wahrscheinlich, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der GSK-3 β -Gendosis und dem beobachteten Effekt existiert.

3.5 Pharmakologische GSK-3-Inhibition reduziert die Spine-Dichte

Da GSK-3 ein interessantes therapeutisches Ziel bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen ist (siehe Abschnitt 2.6 auf Seite 19 und Abschnitt 4.5 auf Seite 61), wurde das Sortiment verfügbarer GSK-3-Inhibitoren stetig erweitert^[56]. Der GSK-3 spezifische Inhibitor AR-A014418 wurde von Gould et al. 2004^[78] charakterisiert und fand in vielen präklinischen Studien Anwendung. Er blockiert die ATP-Bindestelle, wodurch beide Isoformen des Enzyms gehemmt werden^[56,78]. Es stellte sich die Frage, ob sich der genetische Knockout-Effekt durch die Verabreichung eines GSK-3-Inhibitors reproduzieren lässt. Dazu wurde der Inhibitor nach

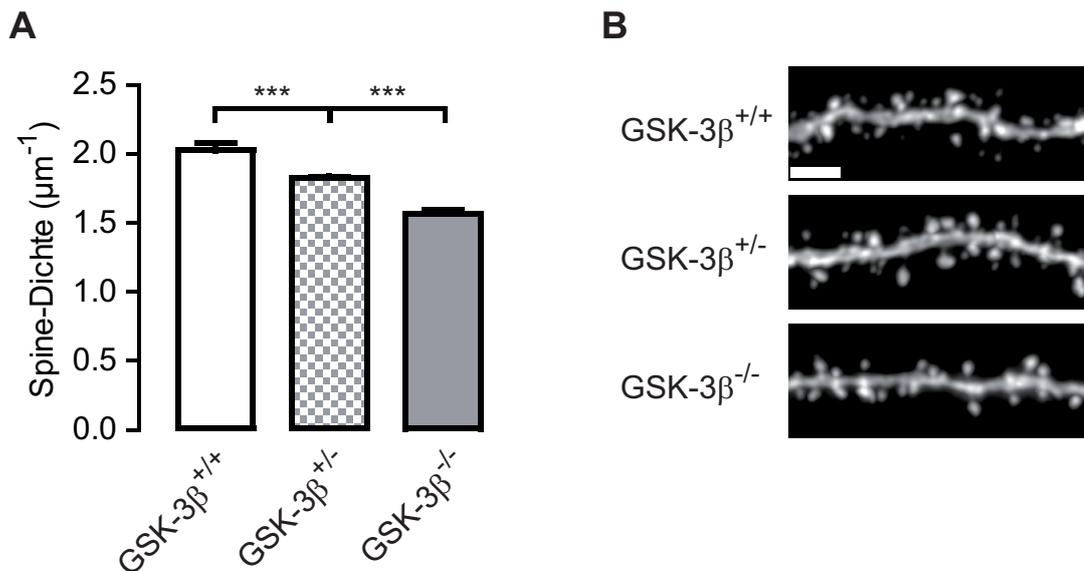


Abbildung 3.4: Heterozygoter GSK-3 β -Einzelzell-Knockout. (A) Spine-Dichten aus dem Hippocampus CA1, eine Woche nach der letzten Tamoxifen-Administration ($p < 0,001$; ANOVA; $n = 10$ Dendriten pro Tier; $N = 4-8$ Tiere). (B) Konfokale Aufnahmen exemplarischer Dendriten (Maßstabseile: $2\mu\text{m}$). Fehlerbalken zeigen Standardabweichung.

Gould et al. 2004 zwei Monate alten GSK-3 β ^{+/+}-Mäusen drei Wochen lang mit einer Dosis von $30\mu\text{M}$ i.p. verabreicht^[78]. Anschließend wurden die SlickV-Neurone gegen YFP nachgefärbt und die CA1-Region des Hippocampus der Spine-Dichte-Analyse unterzogen. Wie aus Abbildung 3.5 zu entnehmen ist, bewirkte die Administration des Inhibitors ebenfalls eine signifikante Spine-Dichte-Reduktion von $1,93 \pm 0,05\mu\text{m}^{-1}$ auf $1,62 \pm 0,11\mu\text{m}^{-1}$. Diese Reduktion belief sich bei diesem Versuch auf ca. 18% und fällt damit geringer aus als in dem vorher beschriebenen Knockout-Versuch (siehe Abschnitt 3.3 auf Seite 24).

3.6 Die Spine-Dichte-Reduktion ist β -Isoform spezifisch

GSK-3 α und GSK-3 β sind zwei eng verwandte Isozyme. Die α -Isoform unterscheidet sich dabei im Wesentlichen nur durch eine Glycin-reiche Region am N-terminus der Kinase^[4]. Obwohl der zuvor beschriebene Knockout-Effekt durch die Deletion des GSK-3 β -Gens verursacht wurde, war eine mögliche Beteiligung von GSK-3 α nicht gänzlich auszuschließen. Es wäre beispielsweise denkbar, dass der GSK-3 β -spezifische Effekt von GSK-3 α abgeschwächt wird und dadurch milder ausfällt. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde ein GSK-3 β -Knockout induziert

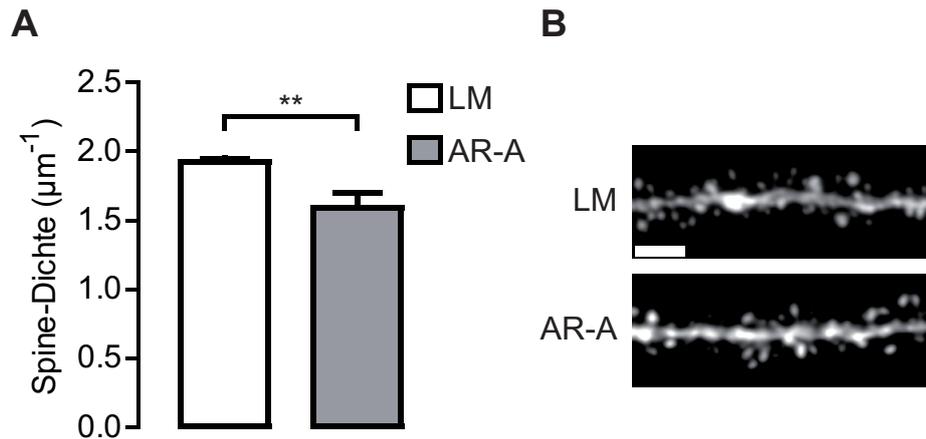


Abbildung 3.5: Pharmakologische GSK-3-Inhibition. (A) Spine-Dichten aus dem Hippocampus CA1 nach drei Wochen pharmakologischer GSK-3-Inhibition ($p < 0,01$; t-Test; $n = 10$ Dendriten pro Tier; $N = 4$ Tiere). **(B)** Konfokale Aufnahmen exemplarischer Dendriten (Maßstabsleiste: $2\mu\text{m}$). Fehlerbalken zeigen Standardabweichung. LM: Lösungsmittel, AR-A: AR-A014418.

und anschließend zusätzlich für drei Wochen der GSK-3-Inhibitor AR-A014418 verabreicht, der zusätzlich die α -Isoform inhibiert. Der GSK-3 β -Knockout bewirkte wie erwartet eine signifikante Spine-Dichte-Reduktion von $1,94 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$ auf $1,53 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ (siehe Abbildung 3.6). Die darauffolgende Inhibition von GSK-3 α beeinflusste die CA1-Spine-Dichte nicht zusätzlich signifikant (von $1,53 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ zu $1,52 \pm 0,04 \mu\text{m}^{-1}$).

Die Kombination aus GSK-3 β -Knockout und GSK-3-Inhibition bewirkte also keine weitere Spine-Dichte-Änderung im Hippocampus CA1. Dies führt zur Hypothese, dass eine Modulation der Spine-Dichte nicht durch GSK-3 α , sondern ausschließlich durch die β -Isoform bedingt ist.

3.7 Die Spine-Dichte-Reduktion hat keine präsynaptische Ursache

In dem hier verwendeten Mausmodell enthielten lediglich 5% aller Neurone das SlickV-Konstrukt^[17,230] und die Effektivität des Knockouts lag bei ca. 62%. Daraus ergibt sich, dass nach Induktion ca. 3,1% der Neurone in den untersuchten Hirnregionen GSK-3 β verloren haben. Es ist also sehr unwahrscheinlich, dass die hier beobachteten Effekte eine präsynaptische Ursache haben. Um dies mit Gewissheit ausschließen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt.

* Wildtyp-Wert stammt aus Experiment in Abschnitt 3.10 auf Seite 33

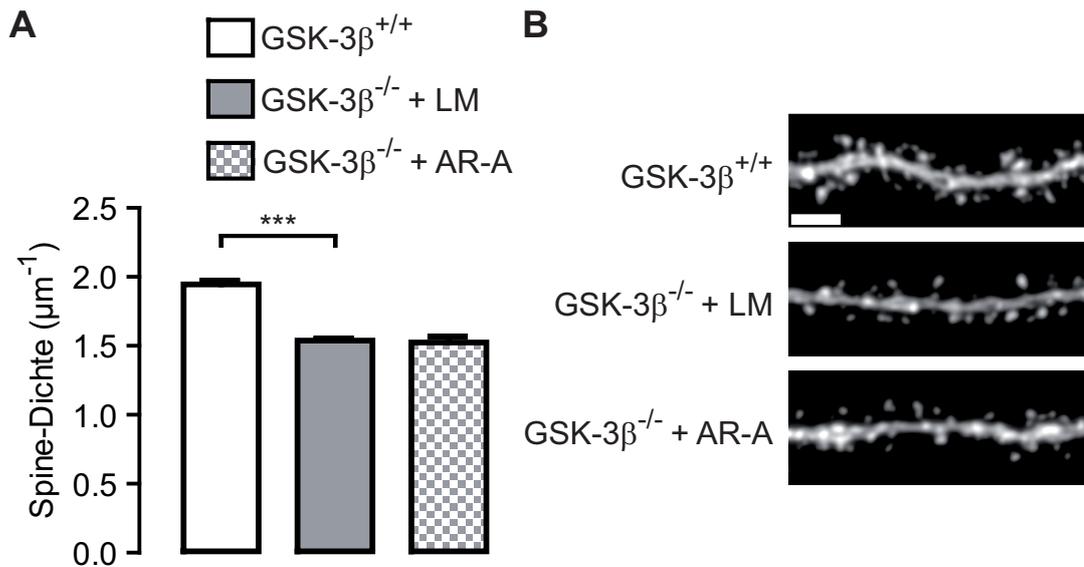


Abbildung 3.6: GSK-3β-Deletion und pharmakologische GSK-3-Inhibition. (A) Spine-Dichten aus dem Hippocampus CA1 nach GSK-3β-Knockout und pharmakologischer GSK-3-Inhibition ($p < 0,001$; ANOVA; $n = 10$ Dendriten pro Tier; $N = 4$ Tiere). (B) Konfokale Aufnahmen exemplarischer Dendriten (Maßstabsleiste: $2\mu\text{m}$). Fehlerbalken zeigen Standardabweichung. LM: Lösungsmittel, AR-A: AR-A014418.

Mit einem Antikörper gegen Synapsin und im roten Spektralbereich detektierbaren Farbstoff wurden alle Präsynapsen markiert. Parallel dazu wurden Dendriten und Spines im grünen Spektralbereich mikroskopiert (Abbildung 3.7A). Über eine automatische Auswerterroutine von Dr. Mario Dorostkar wurde die Präsynapsen-Dichte in Abhängigkeit zur Distanz zum Knockout-Dendriten quantifiziert. Die Präsynapsen-Dichte unterschied sich innerhalb des Radius von $1\mu\text{m}$ oder $5\mu\text{m}$ um YFP-positive Dendriten herum nicht signifikant zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren (Abbildung 3.7B; $1\mu\text{m}$: $0,51 \pm 0,03\mu\text{m}^{-2}$ in Kontrollen vs. $0,55 \pm 0,03\mu\text{m}^{-2}$ in Knockouts; $5\mu\text{m}$: $0,47 \pm 0,02\mu\text{m}^{-2}$ in Kontrollen vs. $0,50 \pm 0,03\mu\text{m}^{-2}$ in Knockouts). Auf ähnliche Weise wurde auch die Wirkung des GSK-3-Inhibitors AR-A014418 im Cortex analysiert. Durch die Verwendung gegen PSD-95 (roter Spektralbereich) und gegen Synapsin (grüner Spektralbereich) gerichteter Antikörper konnten Post- bzw. Präsynapsen parallel detektiert werden. Während nach GSK-3-Inhibition die Postsynapsen-Dichte von $0,24 \pm 0,02\mu\text{m}^{-2}$ auf $0,16 \pm 0,01\mu\text{m}^{-2}$ fiel, galt dies nicht für die Präsynapsen-Dichte ($0,43 \pm 0,02\mu\text{m}^{-2}$ in Kontrollen vs. $0,44 \pm 0,06\mu\text{m}^{-2}$ in Knockouts, Abbildung 3.7C). Somit scheinen die hier beobachteten Effekte durch GSK-3β-Knockout oder GSK-3-Inhibition keine präsynaptische Ursache zu haben.

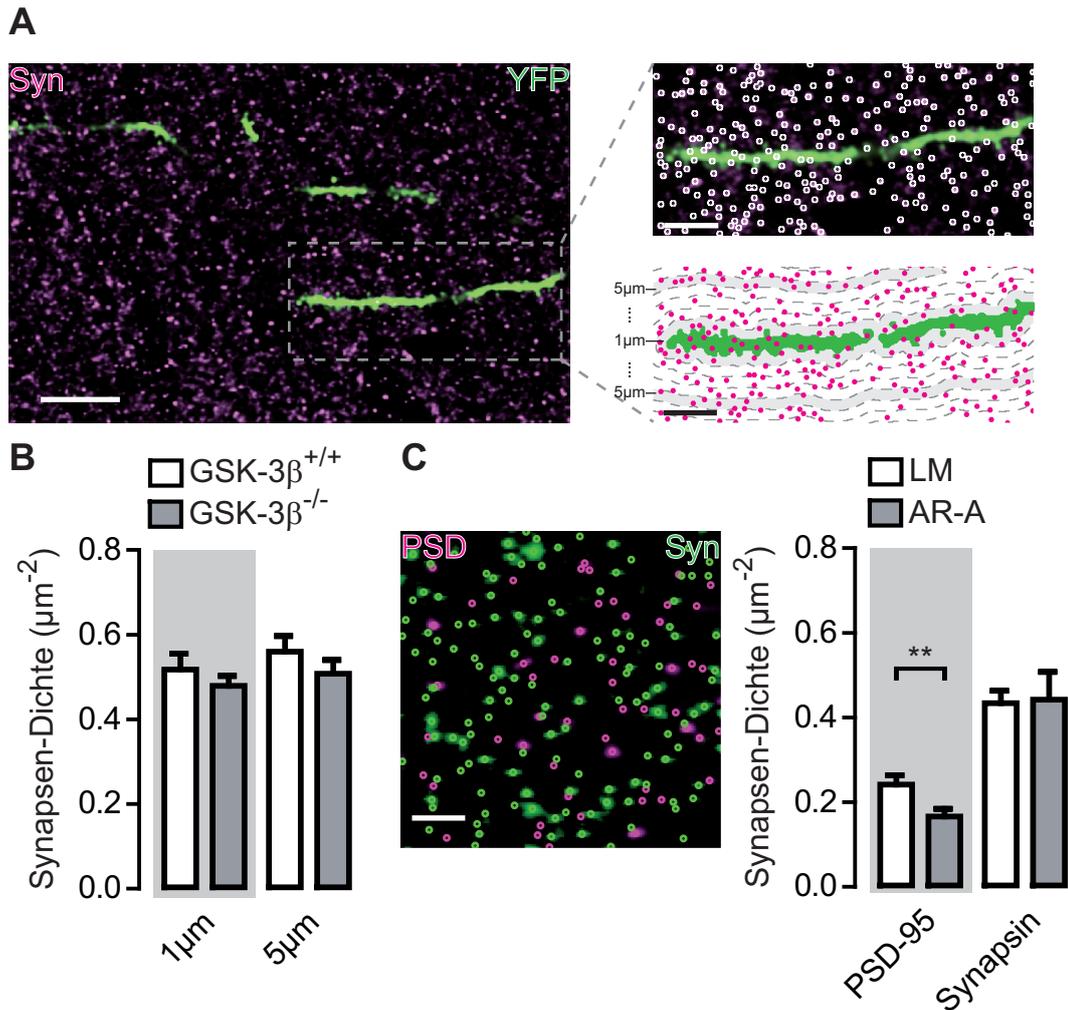


Abbildung 3.7: Postsynaptische Lokalisation des GSK-3 β -Knockout Effekts. (A) Hippocampaler Dendrit im grünen Kanal, Synapsin-Detektion im roten Kanal, Distanzsegmentierung mit Punktdetektion. Maßstabsleiste: 10 μ m und 5 μ m in der Vergrößerung. **(B)** Keine signifikante Veränderung der Präsynapsen-Dichte durch GSK-3 β -Knockout ($p > 0,05$; t-Test; N=5-6 Tiere). **(C)** Darstellung der automatischen PSD-95/Synapsin Punktdetektion und Effekt des GSK-3-Inhibitors auf die PSD-95-Dichte ($p < 0,01$; t-Test; N=4 Tiere). Maßstabsleiste: 5 μ m. Fehlerbalken zeigen Standardabweichung. Syn: Synapsin, PSD: PSD-95.

3.8 GSK-3 β -Knockout verändert Spine-Morphologien

Dass ein GSK-3 β -Knockout Spine-Dichten beeinflusst, wurde in den vorigen Abschnitten mehrfach gezeigt. Es blieb jedoch unklar, ob hierbei tatsächlich nur die Anzahl dendritischer Spines betroffen war, oder ob GSK-3 β auch Veränderungen in der Morphologie-Population mit sich zog. Deswegen wurden unter Zuhilfenahme der Bildanalyse-Software Imaris dendritische Spines semi-automatisch anhand ihrer dreidimensionalen Ausmaße als mushroom, stubby oder thin klassifiziert (sie-

he Abschnitt 2.2.1 auf Seite 7). Die Einstufung erfolgte dabei nach folgendem Muster, welches aus der Literatur abgeleitet wurde^[84,170,231]:

$$Spine := \begin{cases} M, & \text{falls } \frac{\max(W_K)}{\min(W_H)} > 1,4 \wedge \max(W_K) > 0,5 \wedge \min(W_H) > 0 \\ S, & \text{falls } \frac{L}{\overline{W_H}} \leq 3 \vee \min(W_H) = 0 \vee \min(W_H) > 0,5 \\ T, & \text{falls } \frac{L}{\overline{W_H}} > 3 \end{cases}$$

M: Mushroom

S: Stubby

T: Thin

W_K : Kopf-Weite

W_H : Hals-Weite

L : Länge

$\overline{W_H}$: mittlere Hals-Weite

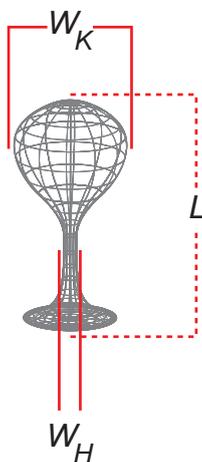


Abbildung 3.8:
Spine-Drahtmodell

Dendriten und Spines wurden manuell nachgezeichnet und über ein angepasstes MatLab-Skript quantifiziert. Abbildung 3.9A zeigt exemplarisch zwei modellierte Dendriten nach dem Rendering. Die Kontingenzanalyse ergab, dass sich das Muster der Spine-Klassen-Zusammensetzung signifikant mit dem GSK-3 β -Knockout veränderte (siehe Tabelle 3.3, Abbildung 3.9B). Es reduzierte sich die Zusammensetzung von thin Spines um 8% und von mushroom Spines um 6%. Dagegen nahm der Anteil von stubby Spines um 14% zu. Die Analyse der Spine-Kopf-Volumina zeigt, dass der Verlust von GSK-3 β eine Verkleinerung der Spine-Köpfe bewirkte (Abbildung 3.9C).

Spine-Morphologie-Kontingenz nach GSK-3 β -Knockout			
Klasse	GSK-3 $\beta^{+/+}$	GSK-3 $\beta^{-/-}$	Differenz
Thin	59%	51%	-8%
Stubby	28%	42%	+14%
Mushroom	13%	7%	-6%

Tabelle 3.3: Spine-Morphologie eine Woche nach GSK-3 β -Knockout. Die Morphologie-Kontingenz verschiebt sich auf Kosten der thin und mushroom Spines in Richtung stubby Spines.

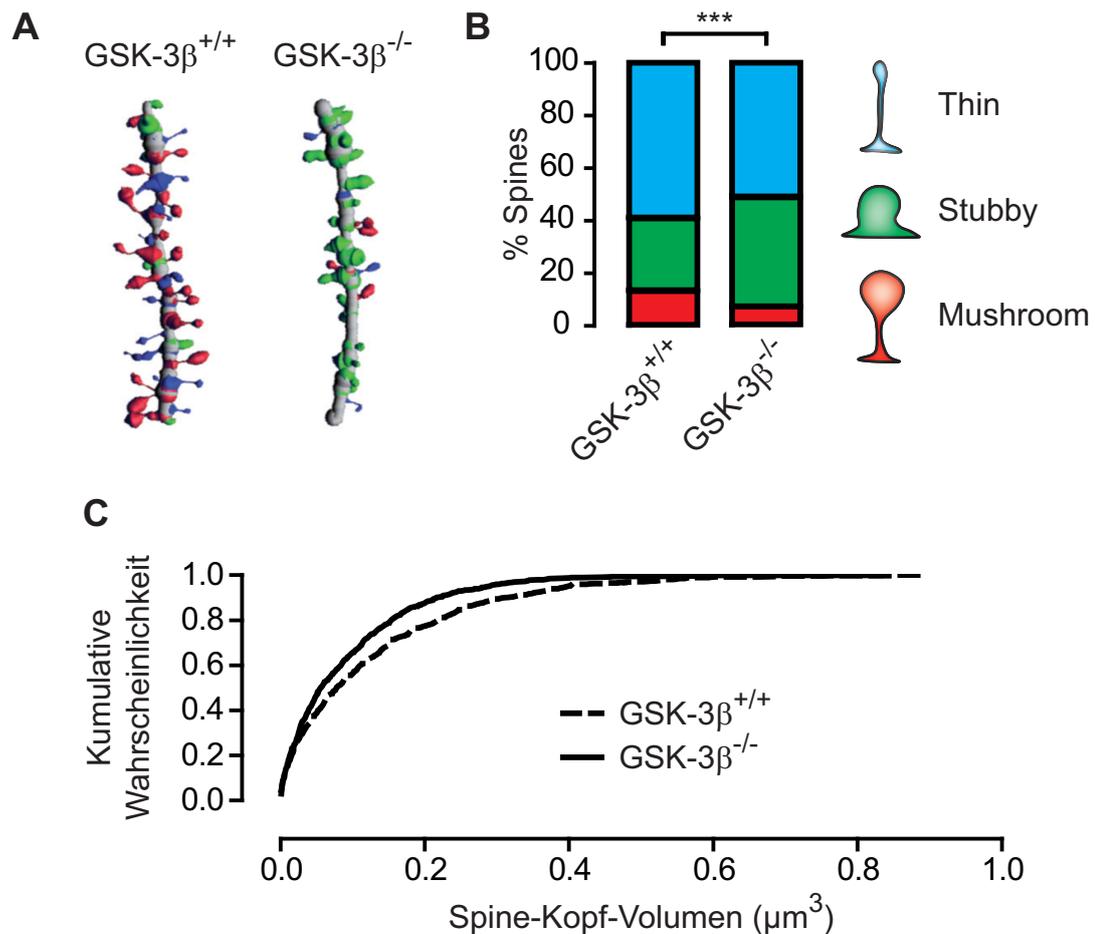


Abbildung 3.9: GSK-3 β -Knockout beeinträchtigt die Spine-Morphologien. (A) Zwei mittels Imaris gerenderte Dendriten (blau: thin Spines; grün: stubby Spines; rot: mushroom Spines). (B) Das Kontingenzmuster der Spine-Morphologien von Dendriten mit und ohne GSK-3 β ($p < 0,001$; χ^2 -Test; $n = 5$ Dendriten pro Tier; $N = 4$ Tiere). (C) Kumulatives Histogramm der Gesamt-Spine-Kopf-Volumina ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test; $n = 5$ Dendriten pro Tier; $N = 4$ Tiere).

3.9 GSK-3 β -Knockout beeinträchtigt die dendritische Spontanaktivität

Eine Modulation der Spine-Gestalt durch GSK-3 β (siehe Abschnitt 3.8 auf Seite 30) ist deshalb von Interesse, weil die Morphologie und besonders das Kopf-Volumen eng mit den elektrophysiologischen Parametern der Dendriten verknüpft sind^[6,234]. Es liegt also die Vermutung nahe, dass sich als funktionelle Konsequenz des GSK-3 β -Knockouts auch die Spontanaktivität synaptischer Ströme verändert. Diese Überlegung sollte mit dem hier beschriebenen Experiment geprüft werden. Dazu wurden eine Woche nach der letzten Tamoxifen-Verabreichung akute, lebende Hirnschnitte angefertigt und die darin liegenden, intakten GSK-3 β -Knockout-Neurone über ihre YFP-Fluoreszenz lokalisiert. Von CA1-Pyramidenzellen wur-

den anschließend Gesamtzellen Patch-Clamp-Messungen spontaner glutamaterger postsynaptischer Miniaturströme (mEPSC) aufgenommen (Abbildung 3.10A). Die Schnitte wurden Bicucullin, Strichnin und Tetrodotoxin ausgesetzt, um inhibitorische Neurotransmitter-Rezeptoren und Aktionspotenziale zu eliminieren. Als Kontrolle dienten benachbarte, nicht-fluoreszierende GSK-3 β ^{+/+}-Neurone (Abbildung 3.10A). Dieses Experiment wurde von meiner Kollegin Dr. Gayane Aramuni durchgeführt und mit ihrer freundlichen Genehmigung in diese Arbeit aufgenommen.

Wie in Abbildung 3.10 zu sehen ist, beeinträchtigte der GSK-3 β -Knockout die glutamaterge Neurotransmission. Dabei reduzierte sich die mittlere mEPSC-Amplitude von $23,29 \pm 7,96$ pA auf $10,96 \pm 2,29$ pA (Abbildung 3.10C), also um ca. 53%. Das entsprechende kumulative Histogramm in Abbildung 3.10D verdeutlicht eine klare Zunahme von Ereignissen mit geringerer mEPSC-Amplitude in GSK-3 β -Knockout-Neuronen. Darüber hinaus war eine Tendenz der mEPSC-Frequenz-Reduktion erkennbar, diese war jedoch nicht signifikant (Abbildung 3.10E,F). Zusammengenommen legen diese Daten nahe, dass ein GSK-3 β -Knockout die glutamaterge Neurotransmission beeinträchtigt.

3.10 Die GSK-3 β -medierte Spine-Dichte-Reduktion ist persistent

Weil sich Neurone hochdynamisch und plastisch verhalten, stellte sich die Frage, ob sie sich von der Spine-Dichte-Reduktion erholen können. Deshalb wurde ein GSK-3 β -Knockout induziert und eine, 4 und 12 weitere Wochen bis zur Gehirnentnahme abgewartet. Die folgende Tabelle 3.4 zeigt die Werte aus der darauffolgenden Spine-Dichte-Analyse. Wie aus Tabelle 3.4 und Abbildung 3.11 erkennbar ist, fiel die Spine-Dichte nach GSK-3 β -Knockout um ca. 23% und blieb auch nach längeren Zeiträumen auf diesem Niveau bestehen. Da sich die Dendriten somit nicht von der Spine-Dichte-Reduktion erholten, ist der Effekt innerhalb der gemessenen Periode von 12 Wochen persistent.

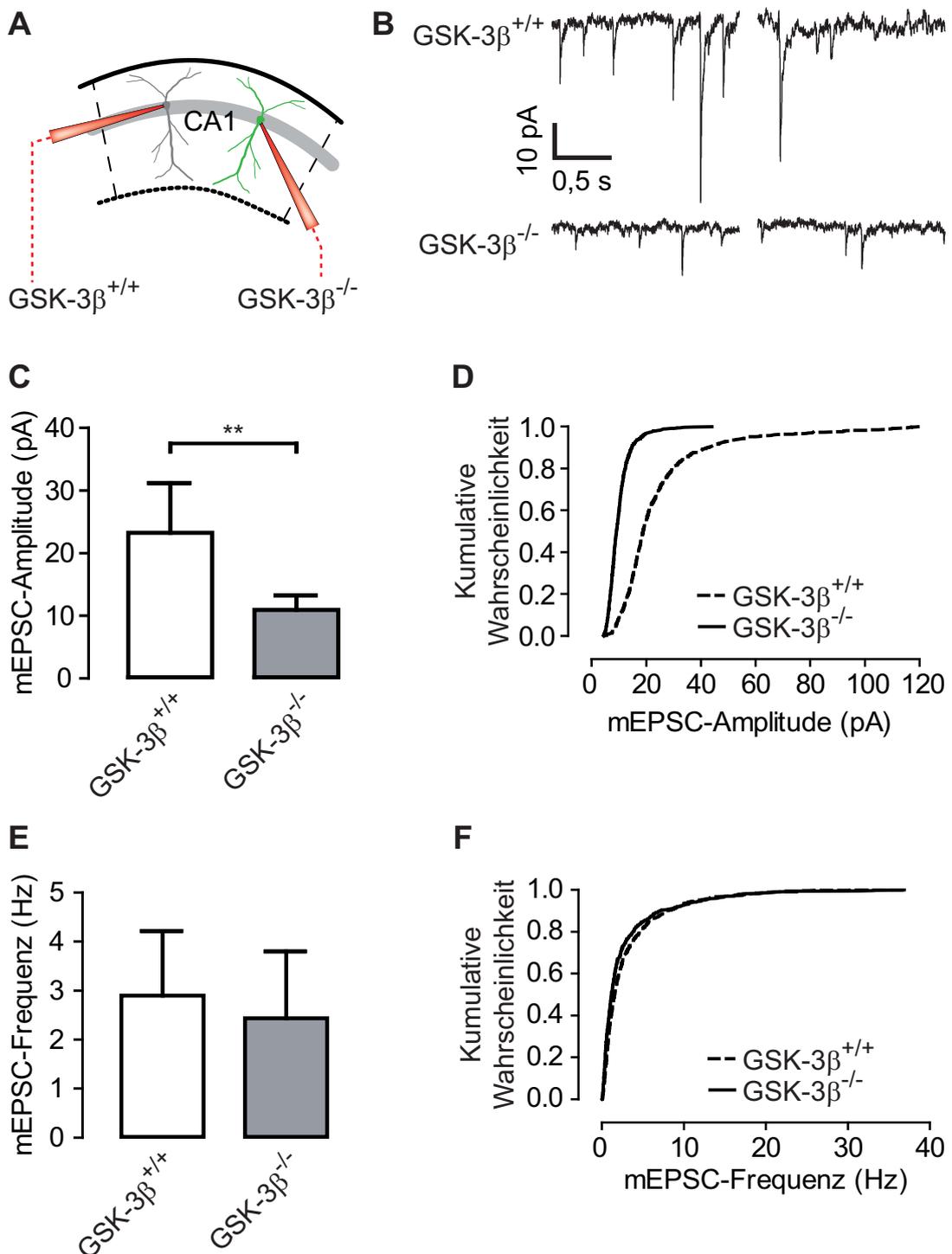


Abbildung 3.10: Die exzitatorische Neurotransmission wird durch GSK-3 β -Deletion beeinträchtigt. GSK-3 β -Knockout-Neurone wurden durch ihre YFP-Fluoreszenz identifiziert, während benachbarte, nicht-fluoreszierende Neurone als Kontrolle dienten. **(A)** Illustration zur Darstellung der Datenakquise. **(B)** Elektrophysiologische Aufnahmen von exzitatorischen postsynaptischen Miniaturströmen (mEPSC). **(C)** Gemittelte mEPSC-Amplituden. **(D)** Kumulatives Histogramm der Daten aus **(C)**. **(E)** Gemittelte mEPSC-Frequenzen. **(F)** Kumulatives Histogramm der Daten aus **(E)**. ($p < 0,01$; t-Test; $n = 7-9$ Neurone; $N = 5$ Tiere; Fehlerbalken zeigen Standardabweichung). Vielen Dank an Dr. Gayane Aramuni.

Zeitreihe Hippocampaler Spine-Dichten			
Zeit	GSK-3 $\beta^{+/+}$	GSK-3 $\beta^{-/-}$	Reduktion
0 Wochen:	*1,92 \pm 0,04 μm^{-1}	*1,93 \pm 0,07 μm^{-1}	
1 Wochen:	*1,97 \pm 0,04 μm^{-1}	*1,56 \pm 0,02 μm^{-1}	\approx 23%
4 Wochen:	1,96 \pm 0,02 μm^{-1}	1,45 \pm 0,08 μm^{-1}	\approx 25%
12 Wochen:	2,01 \pm 0,04 μm^{-1}	1,54 \pm 0,12 μm^{-1}	\approx 21%

Tabelle 3.4: Zeitserie eines GSK-3 β -Knockouts. Die nach einer Woche erreichte Reduktion von \approx 23% blieb auch über längere Zeiträume hinweg erhalten. Die Werte sind in Abbildung 3.11 dargestellt. * Wildtyp-Werte entstammen aus Experiment in Abschnitt 3.3 auf Seite 24.

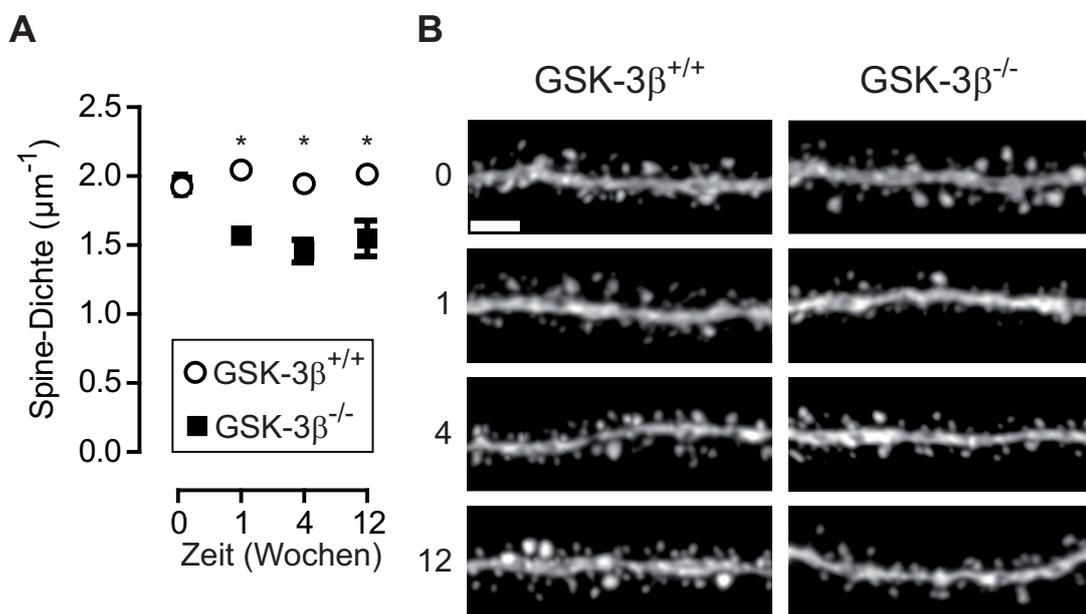


Abbildung 3.11: Zeitserie des GSK-3 β -Knockouts. (A) CA1-Spine-Dichten vor sowie nach einer, 4 und 12 Wochen nach GSK-3 β -Knockout. Die Spine-Dichte reduzierte sich nach dem Knockout persistent ($p < 0,001$ oder weniger; t-Test; $n = 10$ Dendriten pro Tier; $N = 4-8$ Tiere). (B) Konfokale Aufnahmen exemplarischer Dendriten (Maßstabsleiste: $2\mu\text{m}$). Fehlerbalken zeigen Standardabweichung.

3.11 Der Einfluss eines Enriched Environments auf GSK-3 β -Knockout-Neurone

Wenn sich, wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, die Spine-Zahl nicht von selbst erholen kann, ist dann die GSK-3 β -medierte Spine-Dichte-Reduktion durch andere äußere Einflüsse umkehrbar? Die Frage, ob GSK-3 β -Knockout-Neurone z.B. durch externe Stimulation überhaupt noch zur Neubildung von Spines fähig sind, sollte durch das Platzieren der Versuchstiere in einem Enriched Environment (EE) (siehe

Abschnitt 2.2.2 auf Seite 8) geklärt werden. Zu diesem Zweck wurde der Knockout induziert und die Tiere anschließend weitere 10 Wochen einem EE ausgesetzt. Um die Anzahl zu opfernder Mäuse zu minimieren, wurden die Spine-Dichten mit den bereits vorhandenen Einzel-Käfig (EK) Wildtyp-Daten des „12-Wochen-Knockouts“ (siehe Abschnitt 3.10 auf Seite 33) verglichen. Zur Verdeutlichung ist die Zeitlinie des Experiments in Abbildung 3.12A dargestellt. Die folgende Tabelle 3.5 fasst die gemessenen Spine-Dichten, wie sie in Abbildung 3.12B,C zu sehen sind, zusammen.

Spine-Dichten nach Enriched Environment			
	GSK-3 β ^{+/+}	GSK-3 β ^{-/-}	Reduktion
EE:	2,37 \pm 0,08 μm^{-1}	2,00 \pm 0,01 μm^{-1}	\approx 15%
EK:	*2,01 \pm 0,04 μm^{-1}	*1,54 \pm 0,12 μm^{-1}	\approx 21%
Erhöhung:	\approx 15%	\approx 21%	

Tabelle 3.5: Der Einfluss eines Enriched Environments auf hippocampale GSK-3 β -Knockout-Neurone. Das EE erhöhte die Spine-Dichte in Knockout- und in Wildtyp-Neuronen gegenüber der EK-Haltung. Dennoch blieb ein signifikanter Unterschied zwischen beiden EE-Kohorten vorhanden. Die Werte sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Fehlerbalken zeigen Standardabweichung. * Werte entstammen aus Experiment in Abschnitt 3.10 auf Seite 33. EE: Enriched Environment, EK: Einzel-Käfig.

Wie aus den Daten erkennbar ist, bewirkte das Enriched Environment in Wildtyp-Neuronen gegenüber Einzel-Käfig Bedingungen eine Erhöhung der hippocampalen Spine-Dichte um ca. 15%. Im GSK-3 β -Knockout reduzierte sich die Spine-Dichte um denselben Wert. Dennoch war die Spine-Dichte in Knockout-Neuronen aus dem EE gegenüber jenen aus der EK-Haltung um ca. 21% erhöht. Dies verdeutlicht, dass Dendriten auch ohne GSK-3 β in der Lage waren, neue Spines auszubilden. Es wurde allerdings nicht das gleiche Spine-Dichte-Niveau eines unmanipulierten Neurons erreicht.

3.12 GSK-3 β beeinflusst die Spine-Kinetik

Dendritische Spines entstehen und verschwinden. Veränderungen in diesen dynamischen Spine-Umsätzen gehören zur Basis physiologischen Lernens und Erinnerns^[66]. Um zu verstehen, wie genau GSK-3 β die *ex vivo* gemessene Spine-Dichte-Reduktion veranlasste, wurde das hier vorgestellte Experiment durchgeführt. Die intravitale Zweiphotonenmikroskopie ermöglicht es, dynamische Vor-

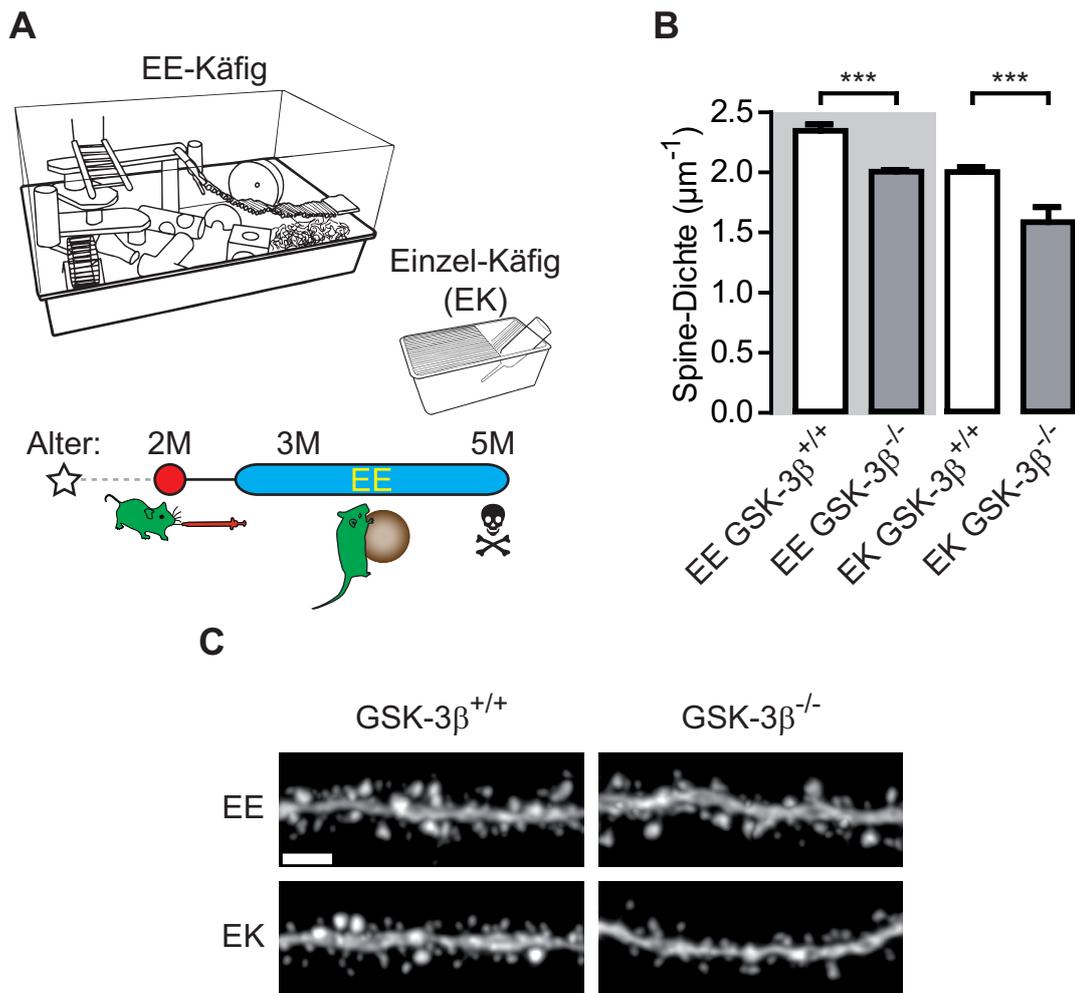


Abbildung 3.12: EE verändert dendritische Spine-Dichten in Neuronen mit und ohne GSK-3 β . (A) Illustration der EE- und EK-Haltung sowie die zeitliche Aufteilung des Experiments (abgeleitet von Jung 2012^[108]). (B) Dendritische Spine-Dichten, die durch das EE beeinflusst wurden. Der initiale Spine-Dichte-Verlust nach GSK-3 β -Knockout konnte nicht kompensiert werden ($p < 0,001$ oder weniger; t-Test; $n = 10$ Dendriten pro Tier; $N = 4$ Tiere). (C) Konfokale Aufnahmen exemplarischer Dendriten (Maßstabsleiste: $2\mu\text{m}$). Fehlerbalken zeigen Standardabweichung. EE: Enriched Environment, EK: Einzel-Käfig.

gänge an ausgesuchten Dendriten in regelmäßigen Abständen über lange Zeiträume hinweg am lebenden Gehirn zu untersuchen. Durch das im Rahmen dieser Arbeit entstandene Software-Paket *SpineMiner* (im Prinzip ein numerisches benutzerfreundliches Spine-Zählwerk) wurde eine Vielzahl an Ausleseautomatiken entwickelt (siehe auch Abschnitt 5.4.2 „Softwareapplikation *SpineMiner(XT)*“ auf Seite 75). Die für dieses Experiment relevanten Analysen sind folgend in Tabelle 3.6 erklärt.

Erklärung der <i>in vivo</i> Datensätze	
Datensatz	Bedeutung
Spine-Dichte	Anzahl Spines pro Mikrometer <i>in vivo</i> .
Überlebensfraktion	Wie lange Spines überlebten, die zu einem bestimmten Mikroskopie-Zeitpunkt t vorhanden waren.
Überlebensfraktion neuer Spines	Wie lange Spines überlebten, die zu einem bestimmten Mikroskopie-Zeitpunkt t entstanden sind.
dTOR	Die Spine-Umsatzrate wird folgendermaßen berechnet ^[96] : $dTOR = \frac{S_n + S_v}{2 \cdot S_g} \cdot \Delta t^{-1}$ mit S_n : Neu entstandene Spines. S_v : Verlorengegangene Spines. S_g : Gesamtzahl Spines. Δt : Tagesabstand zwischen den Mikroskopiezeitpunkten.
Fraktion transienter Spines	Als transient wurden jene Spines definiert, deren Lebenszeit $\tau \leq 4$ Tage betrug. Der Wert wurde aus einer Publikation entlehnt, nach der neue Spines ab Tag 4 eine funktionelle Synapse ausbilden können ^[120] .
Fraktion persistenter Spines	Als persistent wurden jene Spines definiert, deren Lebenszeit $\tau > 4$ Tage betrug. Der Wert ergibt sich aus $1 - (\text{Fraktion transienter Spines})$.

Tabelle 3.6: Relevante Datensätze für das GSK-3 β -*in vivo* Knockout-Experiment.

Wie in Abbildung 3.13A zu sehen ist, wurde zeitgleich mit der Mikroskopie apikaler Dendriten kortikaler Schicht 5 Neurone der GSK-3 β -Knockout induziert. Bereits drei Tage nach der Induktion war eine Spine-Dichte-Reduktion von ca. 20% sichtbar. Nach diesem initialen Abfall blieb die Spine-Dichte während der gesamten verbleibenden Mikroskopie-Periode konstant auf diesem Niveau (Abbildung 3.13B). Die Reduktion wurde durch eine Eliminierung persistenter Spines um ca. -20% veranlasst (Abbildung 3.13C). Dem stand ein Anstieg transienter Spines von ca. $0,004\mu\text{m}^{-1}$ auf $0,02\mu\text{m}^{-1}$ entgegen (Abbildung 3.13D). Dies spiegelte sich auch in einer erhöhten Spine-Umsatzrate von 1,73% auf 3,87% wider (Abbildung

3.13E). Der Spine-Verlust konnte einer verkürzten Lebensdauer aller Spines zugeschrieben werden, was sich in Zeitkonstante τ der monophasischen exponentiellen Abfall-Funktion ausdrückte. Die Spine-Lebensdauer τ wurde durch den GSK-3 β -Knockout von 36,8 Tage auf 13,8 Tage reduziert ($\Delta\tau \approx -23$ Tage, Abbildung 3.13F). Die Lebensdauer der Spines, die am Tag 10 entstanden waren, reduzierte sich ebenfalls von 17,0 Tage in Kontrollen auf 4,16 Tage im Knockout ($\Delta\tau \approx -13$ Tage, Abbildung 3.13G). Zusammengefasst sprechen diese Daten dafür, dass eine postsynaptische GSK-3 β -Defizienz primär in einer Eliminierung persistenter Spines resultiert. Dies versucht das Neuron zu kompensieren, indem neue Spines gebildet werden. Jedoch geht mit dem Knockout die Fähigkeit verloren, neu gebildete Spines zu stabilisieren, was sich im Anstieg der Transienten-Fraktion widerspiegelt. Die Spine-Dichte-Reduktion blieb vor allem deswegen erhalten, weil die Transienten-Fraktion ca. $1/10$ der Gesamt-Spines ausmachte und somit kaum einen Einfluss auf die Spine-Dichte hatte (siehe Abbildung 3.13C,D).

3.13 Zugrunde liegende molekulare Mechanismen

Zusammenfassend zeigen die Daten in den vorangegangenen Abschnitten, dass GSK-3 β eine fundamentale Rolle in der strukturellen Spine-Plastizität übernimmt. Als funktionelle Konsequenz des GSK-3 β -Knockouts werden stabile Spines eliminiert, gleichzeitig können neu gebildete Spines nicht stabilisiert werden. Das Muster der Spine-Typen mushroom, stubby und thin veränderte sich und die glutamaterge Neurotransmission wurde gestört. Es blieb allerdings zu klären, über welche molekularen Mechanismen diese Veränderungen eingeleitet werden. Inzwischen sind nahezu 100 Proteine als Substrate von GSK-3 bekannt^[198], was die Suche nach dem finalen Mediatorprotein wie die sprichwörtliche Suche nach der Nadel im Heuhaufen erscheinen lässt. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass durch das Ausschalten eines kompletten Signalnetzes gleich mehrere Effektoren zusammenwirken und das hier beobachtete Resultat produzierten. Dennoch kann man die Suche nach den möglichen Zielproteinen anhand des derzeitigen Stands der Literatur folgendermaßen einschränken:

- Es sollten Substrate in Frage kommen, die in der Neurobiologie eine Rolle spielen.
- Die Substrate sollten bereits für eine Funktion in der neuronalen Plastizität vorgeschlagen worden sein.

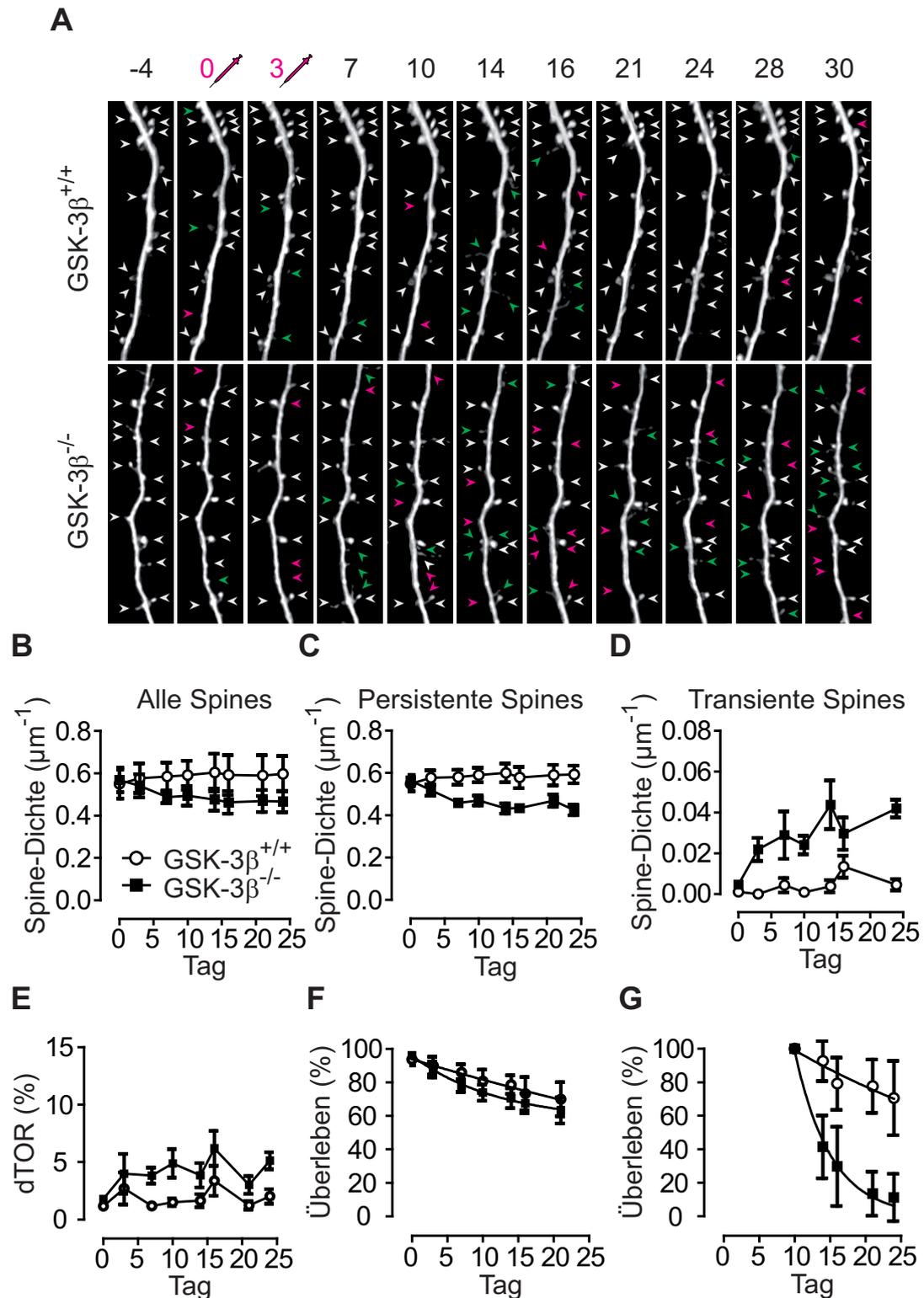


Abbildung 3.13: *in vivo* Spine-Dynamiken. Der Knockout wurde am Tag 0 nach der letzten Aufnahme induziert. **(A)** Schicht 5 Neurone des somatosensorischen Cortex. Die Pfeile kennzeichnen stabile Spines (weiß), verlorene oder entstandene Spines (grün bzw. magenta). **(B)** Spine-Dichte aller Spines, **(C)** persistenter Spines (Lebenszeit > 4 Tage) und **(D)** transients Spines (Lebenszeit ≤ 4 Tage). **(E)** Tägliche Spine-Umsatzrate. **A-E:** $p < 0,0001$; Zwei-Weg ANOVA; $N = 4$ Tiere. **(F)** Überlebenskurve der Spines, welche am Tag 0 vorhanden waren mit Fit ($p < 0,01$; F-Test). **(G)** Überlebenskurve der Spines, die am Tag 10 entstanden sind mit Fit ($p < 0,05$; F-Test). **(F-G)** Die Kurven entsprechen monophasischen exponentiellen Abfall-Funktionen ($n = 3-18$ Dendriten pro Tier; $N = 4$ Tiere pro Kohorte; Maßstabsleiste: $5\mu\text{m}$). Fehlerbalken zeigen Standardabweichung.

- Die Substrate dürfen eine Funktion in der zytoskelettären Dynamik übernehmen.

Unter Zuhilfenahme dieser Suchkriterien wurden folgende putative GSK-3 β -Mediatoren für die weitere Überprüfung ausgewählt:

Interessante GSK-3 β -Mediatorproteine	
Kandidat	Funktionen
β -Catenin ^[8,152,167]	Spine-Stabilisierung; Spine-Plastizität
BACE1 ^[135,182]	Reguliert hippocampale CA1-Spine-Dichten
CREB ^[40,44,189]	Aktivierung unmittelbar früher Gene; Spine-Plastizität
MAPs ^[77,181,209]	Mikrotubuli/Aktin-Zytoskelett-Stabilität und Crosstalk; Spine-Plastizität
NF κ B ^[17,135]	Spine-Plastizität; Bindeglied zwischen GSK-3 β und BACE1
Tau ^[103,197]	Mikrotubuli-Stabilität; Vermutung einer synaptotoxischen Funktion am Spine bei neurodegenerativen Erkrankungen.

Tabelle 3.7: Kandidaten-Liste eventueller GSK-3 β -Mediatoren für die Rolle von GSK-3 β in der strukturellen Spine-Plastizität.

3.13.1 Sondierung putativer GSK-3 β -Mediatoren

Zunächst sollte immunhistochemisch an fixierten Gehirnschnitten sondiert werden, welche der in Tabelle 3.7 genannten Substrate überhaupt durch den GSK-3 β -Knockout affektiert werden. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen gegen die Substrate etabliert und konfokal mikroskopiert. Wie in Abbildung 3.14 und 3.15 zu sehen ist, waren im Hippocampus CA1 die Immunreaktivitäten für β -Catenin, MAP1b und Tau im Vergleich zu benachbarten Wildtyp-Neuronen verändert. Ein verändertes Muster konnte dagegen für die Substrate BACE1, CREB, und NF κ B nicht beschrieben werden (nicht gezeigt). Die intensive Färbung für β -Catenin in Abbildung 3.14 war zu erwarten, da GSK-3 β die Degradation β -Catenins initiiert^[198,223]. Fehlt GSK-3 β , so akkumuliert β -Catenin entsprechend - auch im Zellkern (siehe auch Illustration 3.17A und Abbildung 3.14). Ungewöhnlich war jedoch die relativ starke β -Catenin-Immunreaktivität in Dendriten und vereinzelt Spines. Die Auflösung eines Proteins in einzelnen Spines in Knockout-Neuronen konnte für kein anderes Substrat erreicht werden (Abbildung 3.15A,C).

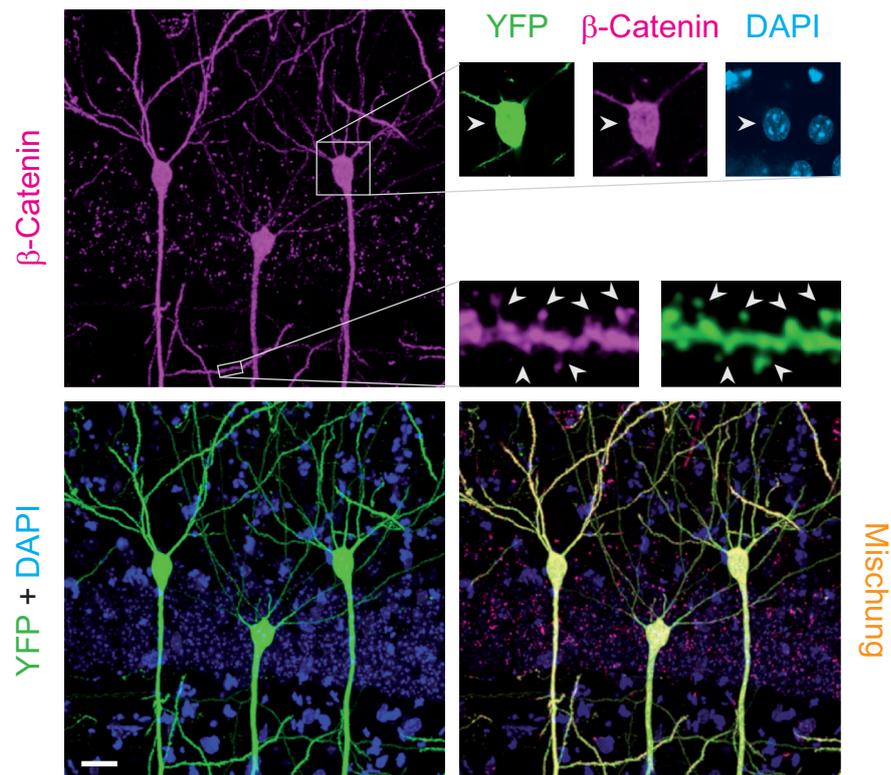


Abbildung 3.14: Immunreaktivität für β -Catenin, eine Woche nach GSK-3 β -Knockout. Konfokale Aufnahmen von Knockout-Neuronen im Hippocampus. Die Immunfärbung kolokalisiert mit DAPI (DNA bindender Farbstoff) in Zellkernen und ist in einzelnen Spines detektierbar. Maßstabsleiste: 20 μ m

Rein qualitativ erweckte die MAP1b-Färbung den Eindruck, dass sich das Protein nach GSK-3 β -Knockout im Zellsoma anreichte. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden die Flächenwerte des Somas („S“ in Abbildung 3.15A) und des proximalen Dendriten („D“ in Abbildung 3.15A) ermittelt. Als Kontrolle dienten benachbarte, nicht YFP-positive Wildtyp-Neurone. Aus den „S“- und „D“-Werten wurden anschließend Verhältnisse gebildet. Sie waren bei Knockout-Neuronen signifikant herabgesetzt (siehe Abbildung 3.15B). Zusammen mit der qualitativen Betrachtung der Immunreaktivität bedeutet dies, dass der GSK-3 β -Knockout wahrscheinlich eine Anreicherung oder Umverteilung des MAP1b vom Dendriten zum Soma bewirkte.

Anders als für MAP1b wurde für Tau das Gesamt-Fluoreszenz-Signal für die Quantifizierung herangezogen (Abbildung 3.15C,D). Das YFP-Signal diente zunächst als Vorlage zur Erstellung einer Maske. Anschließend wurde die Tau-Immunreaktivität innerhalb und außerhalb der Maske integriert und das Verhältnis gebildet. Dieser Analyseweg wurde deshalb ausgewählt, da sich offenbar das Tau-Niveau im gesamten Knockout-Neuron erhöhte. Wie Abbildung 3.15E bestätigt, war dies beim

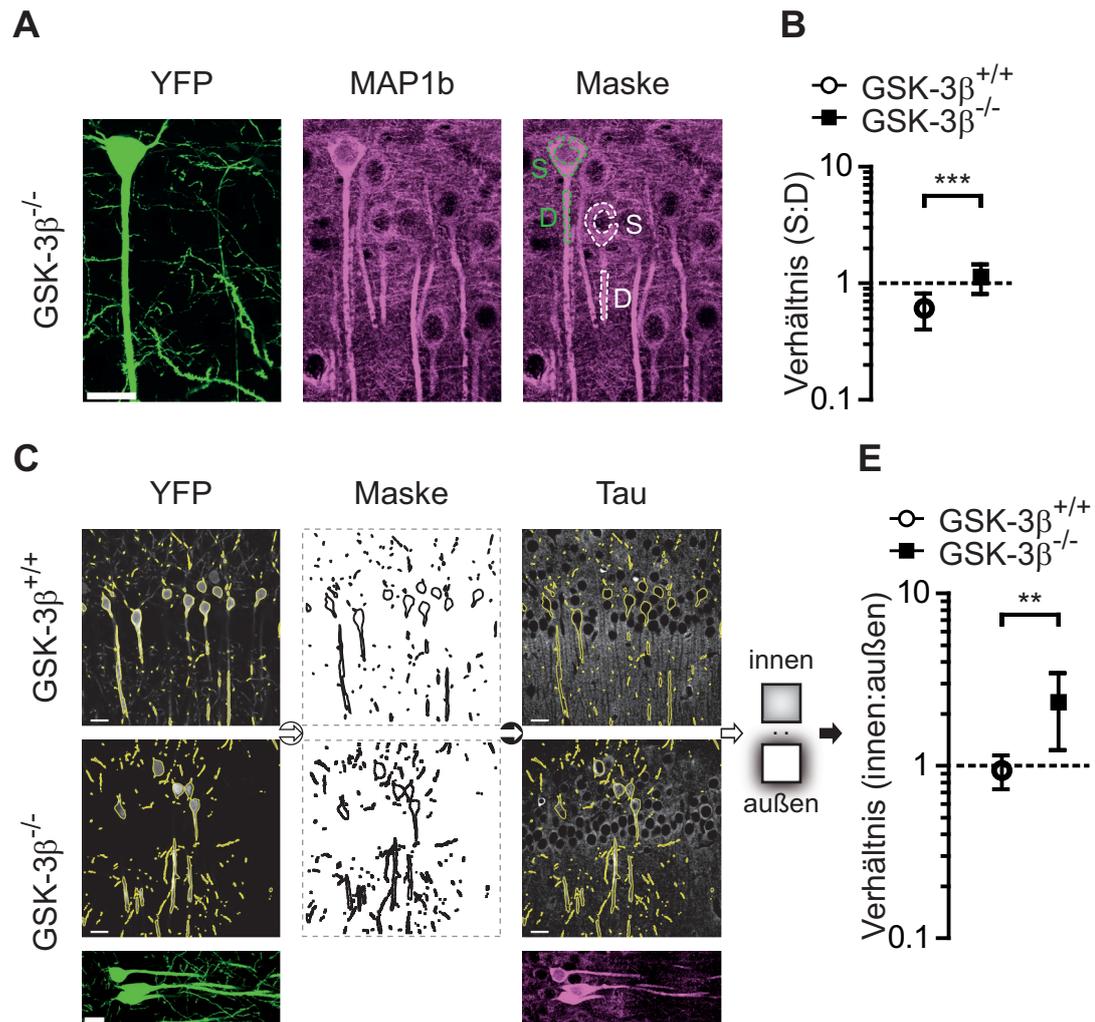


Abbildung 3.15: Immunhistochemie der GSK-3 β -Substrate MAP1b und Tau-1 eine Woche nach GSK-3 β -Knockout. Konfokale Aufnahmen von CA1-Neuronen. **(A)** Färbung gegen MAP1b und zugehörige Quantifizierung **(B)**; $p < 0,001$; t-Test; $n = 4-6$ Zellen pro Tier; $N = 3$ Tiere; Maßstabsleiste: $20\mu\text{m}$). **(C)** Färbung gegen Maus-Tau und zugehörige Quantifizierung **(D)**; $p < 0,01$; t-Test; $n = 2$ Bildstapel pro Tier; $N = 3$ Tiere; Maßstabsleiste: $20\mu\text{m}$). Fehlerbalken zeigen Standardabweichung.

GSK-3 β -Knockout tatsächlich der Fall. Die Quantifizierung basierte in diesem Fall auf einem automatisierten IgorPro-Skriptsatz, der von meinem Kollegen Dr. Mario Dorostkar entwickelt wurde.

3.13.2 β -Catenin-Stabilisierung mediert den Effekt des GSK-3 β -Knockouts

Immunhistochemisch war β -Catenin in GSK-3 β -Knockout-Neuronen in großen Mengen nachweisbar. Wie bereits erwähnt, phosphoryliert im adulten Neuron GSK-3 β β -Catenin, was zu dessen Degradation führt^[223] (Abbildung 3.17A). Wür-

de nun eine Deletion dieser Phosphorylierungs-Stelle im β -Catenin den GSK-3 β -Knockout-Effekt auf die Spines phänokopieren? Zu diesem Zweck wurde die Mauslinie $\text{catnb}^{\text{LoxP(EX3)}} \times \text{SlickV}$ gezüchtet. Durch die Verabreichung von Tamoxifen wird das Exon 3 des β -Catenins durch Cre-ER^{T2}-Rekombination in vereinzelt Neuronen ausgeschnitten. Die Funktionalität des β -Catenins bleibt aber erhalten^[82]. Durch die Exon-3-Ausschneidung kann β -Catenin nun nicht mehr von GSK-3 β phosphoryliert werden, akkumuliert und nimmt seine Rolle z.B. als Transkriptionsfaktor im Zellkern auf^[82] (siehe Abbildung 3.17B).

Die β -Catenin-Stabilisierung wurde eine Woche nach der letzten Tamoxifen-Administration immunhistochemisch überprüft. Die Färbung entsprach dem Muster, wie es bereits in Abbildung 3.15A zu sehen ist (nicht gezeigt). Dendritische CA1-Spine-Dichten wurden vor und nach der β -Catenin-Stabilisierung untersucht. Während vor der Tamoxifen-Verabreichung („t0“) keine signifikante Differenz im Spine-Dichte-Niveau bestand (Tabelle 3.8, Abbildung 3.16A,B), kam es durch die β -Catenin-Stabilisierung dagegen zu einer deutlichen Spine-Dichte-Reduktion. Sie betrug ca. 21%, was in etwa der Reduktion nach GSK-3 β -Knockout entsprach (siehe Tabelle 3.8 und Abbildung 3.16A,B).

Dieses Resultat zeigt, dass durch eine β -Catenin-Stabilisierung der GSK-3 β -Knockout-Effekt auf die Spine-Dichte phänokopierbar ist. Damit ist der Zusammenhang zwischen GSK-3 β -Knockout und β -Catenin-Mediation aber nicht vollständig erbracht. Eine Woche nach der β -Catenin-Stabilisierung wurde für drei weitere Wochen der GSK-3-Inhibitor AR-A014418 appliziert (siehe Abschnitt 3.5 auf Seite 26). An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass aufgrund des zuvor beschriebenen Gendosis-Zusammenhangs (siehe Abschnitt 3.4 auf Seite 26) homozygote $\text{catnb}^{\text{LoxP(EX3)}} \times \text{SlickV}$ -Mäuse für dieses Experiment herangezogen wurden. Denn bei einer heterozygoten β -Catenin-Stabilisierung gäbe es noch ein wildtypisches Allel, das durch GSK-3 β -Inhibition beeinflusst werden könnte. Die Analyse hippocampaler CA1-Spine-Dichten ergab, dass nach β -Catenin-Stabilisierung die Werte von mit Lösungsmittel behandelten Tieren nicht mehr signifikant von jenen mit AR-A014418 behandelten Tieren unterscheidbar waren (Tabelle 3.8, Abbildung 3.16C,D). Somit wurde der Zusammenhang zwischen GSK-3 β -Aktivität und β -Catenin als möglicher Mediator weiter abgesichert. Zum Vergleich sind auf Seite 46 nochmals alle Spine-Dichte-Werte in Tabelle 3.8 und in Abbildung 3.17 zusammengefasst.

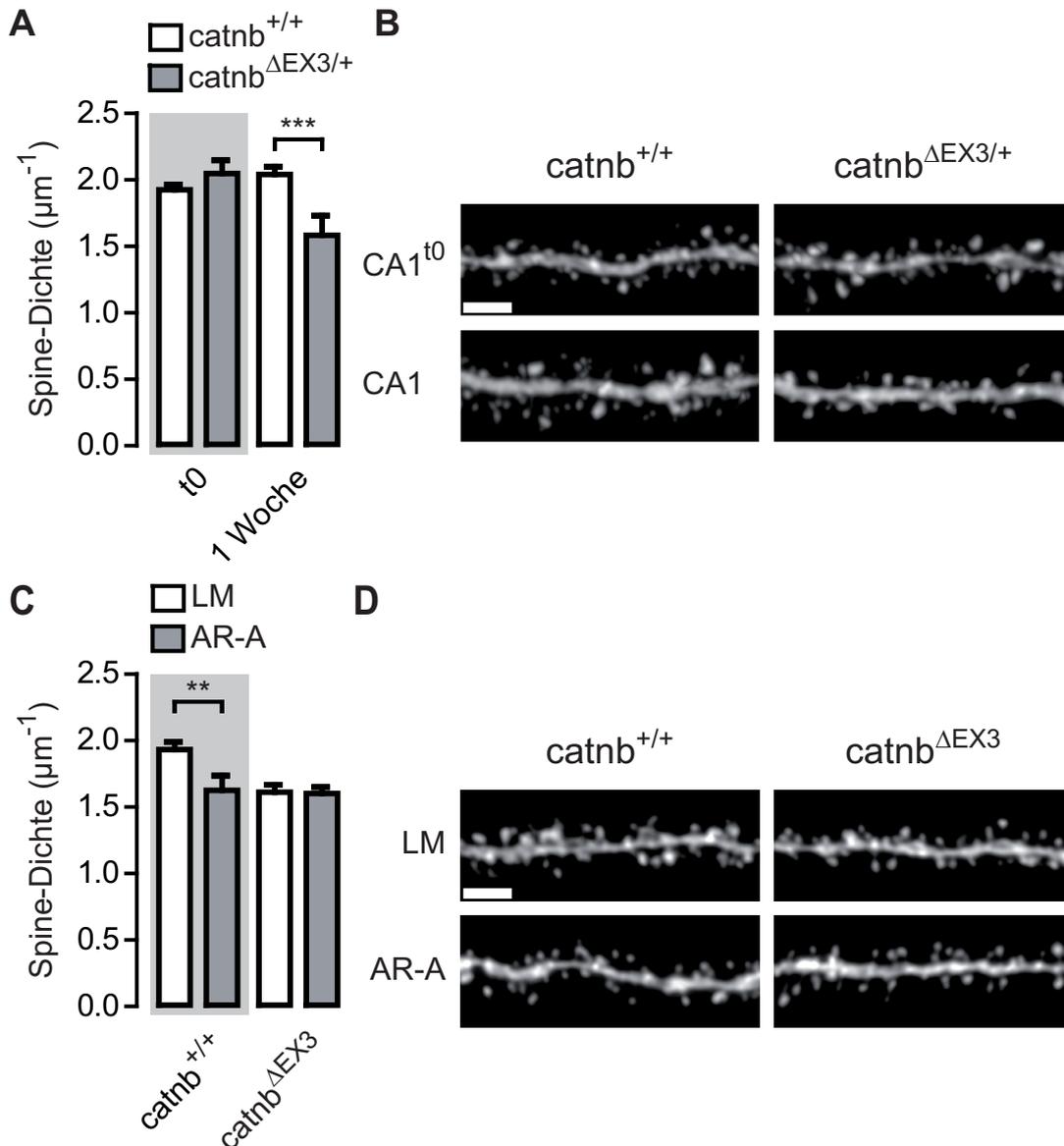


Abbildung 3.16: Stabilisierung von β -Catenin phänokopiert den GSK-3 β -Knockout. (A) Spine-Dichten eine Woche nach β -Catenin-Stabilisierung durch die heterozygote Exon-3-Deletion (catnb^{ΔEX3/+}) ($p < 0,001$; t-Test; $n = 10$ Dendriten pro Tier; $N = 4-8$ Tiere). (B) Konfokale Aufnahmen apikaler CA1-Dendriten (Maßstabsleiste: 2 μ m). (C) Spine-Dichten nach β -Catenin-Stabilisierung und GSK-3-Inhibition ($p < 0,01$; t-Test; $n = 10$ Dendriten pro Tier; $N = 4$ Tiere). (D) Konfokale Aufnahmen apikaler CA1-Dendriten (Maßstabsleiste: 2 μ m). Fehlerbalken zeigen Standardabweichung. LM: Lösungsmittel, AR-A: AR-A014418.

3.13.3 BACE1 mediert nicht die GSK-3 β -Effekte

BACE1 (β -Stelle Spaltenzym 1) ist ein transmembranöses Protein, welches neben anderen Enzymen bei der Spaltung des amyloiden Vorläuferproteins (APP) zur Generation von A β beiträgt. Dies ist die Hauptkomponente der amyloiden Plaques, die bei der Alzheimer-Erkrankung im Gehirn auftreten^[5,135,204]. Es wurde in einer

Spine-Dichten bei β -Catenin-Stabilisierung und GSK-3-Inhibition				
	Vorher	Nachher	LM	AR-A
catnb ^{+/+}	*1,92±0,04 μm^{-1}	*2,04±0,04 μm^{-1}	[‡] 1,93±0,05 μm^{-1}	[‡] 1,62±0,11 μm^{-1}
catnb ^{ΔEX3}	2,04±0,09 μm^{-1}	1,58±0,14 μm^{-1}	1,61±0,05 μm^{-1}	1,60±0,04 μm^{-1}
Differenz	n.s.	≈-21%	≈-18%	n.s.

Tabelle 3.8: Spine-Dichten in Abhängigkeit von der β -Catenin-Stabilisierung und GSK-3-Inhibition. **Vorher:** Zeitpunkt vor β -Catenin-Stabilisierung („t0“), **Nachher:** Zeitpunkt nach β -Catenin-Stabilisierung, **LM:** mit Lösungsmittel behandelte Kohorte, **AR-A:** mit GSK-3-Inhibitor behandelte Kohorte. * Wildtyp-Werte aus Experiment in Abschnitt 3.3 auf Seite 24, [‡]: Wildtyp-Werte aus Experiment in Abschnitt 3.5 auf Seite 26.

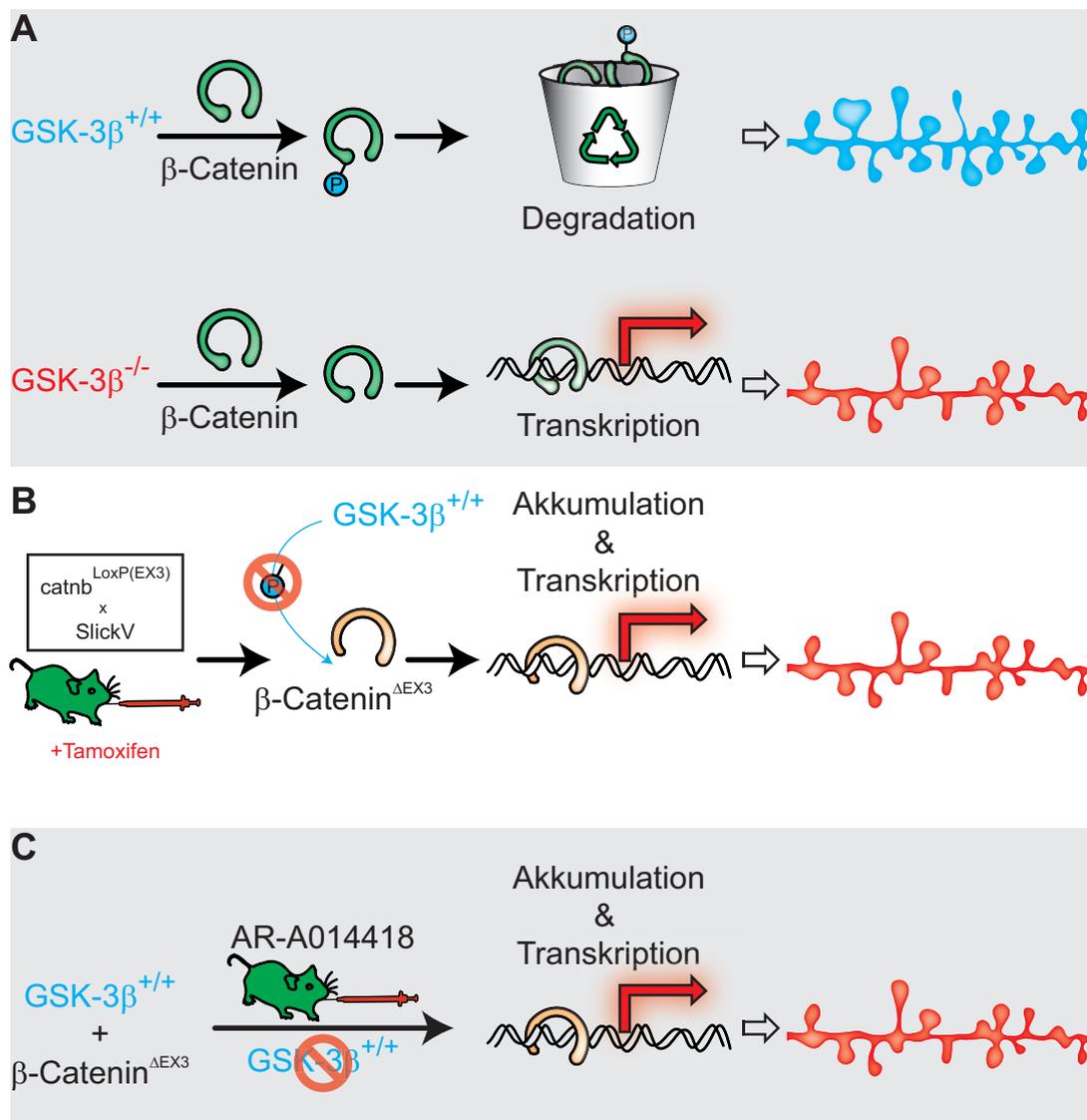


Abbildung 3.17: Schematische Illustration zur Darstellung β -Catenins als Mediatorprotein von GSK-3 β . (A) Das Verhältnis zwischen GSK-3 $\beta^{+/+}$ und GSK-3 $\beta^{-/-}$ zu β -Catenin und die Wirkung auf die dendritische Spine-Dichte. (B) Wirkungsweise der catnb ^{Δ EX3}-Mutation auf die Spine-Dichte. (C) GSK-3-Inhibition kann nach β -Catenin-Stabilisierung die Spine-Dichte nicht weiter beeinflussen.

im Jahr 2008 veröffentlichten Studie gezeigt, dass ein BACE1-Knockout in ca. 4 Monate alten Mäusen signifikant hippocampale CA1-Spine-Dichten reduziert. Dies ging ebenfalls mit einer Veränderung der Spine-Morphologien, nämlich auf Kosten der mushroom Spines einher^[182]. Die Bildung von BACE1 in Neuronen wird direkt über den Transkriptionsfaktor-Komplex NFκB kontrolliert. Ob dieser Komplex aktiv ist, bestimmt wiederum GSK-3β über Phosphorylierung. Ein direkter Zusammenhang zwischen BACE1-Menge und GSK-3β-Aktivität wurde bereits hergestellt^[135], nicht aber hinsichtlich dendritischer Spine-Dichten (Abbildung 3.18A).

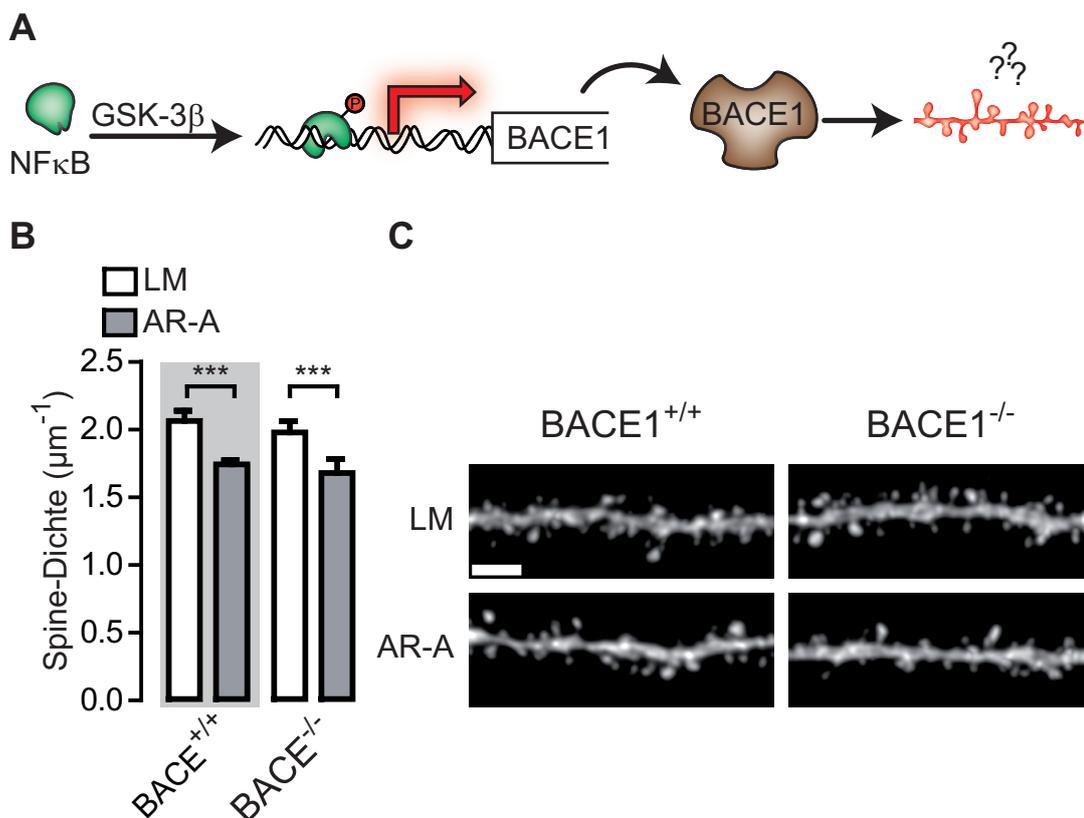


Abbildung 3.18: BACE1 ist nicht relevant für die GSK-3β-medierte Spine-Dichte-Reduktion. (A) Illustration über den Zusammenhang zwischen BACE1 und GSK-3β. (B) Spine-Dichte vor und nach BACE1-Knockout und GSK-3-Inhibition ($p < 0,001$; ANOVA; $n = 10$ Dendriten pro Tier; $N = 4$ Tiere). (C) Konfokale Aufnahmen apikaler CA1-Dendriten (Maßstabsleiste: $2\mu\text{m}$). Fehlerbalken zeigen Standardabweichung. LM: Lösungsmittel, AR-A: AR-A014418.

Das hier vorgestellte Experiment wurde an BACE1-Knockout-Mäusen mit GFP-M-Hintergrund durchgeführt. Es ist aus Abbildung 3.18B,C zu erkennen, dass wie auch in den Experimenten zuvor, eine pharmakologische GSK-3-Inhibition mit AR-A014418 hippocampale CA1-Spine-Dichten um $\approx 17\%$ reduzierte (von $2,06 \pm 0,07 \mu\text{m}^{-1}$ auf $1,74 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$). Die gleiche Reduktion wurde allerdings auch bei BACE1-defizienten Mäusen beobachtet (von $1,97 \pm 0,08 \mu\text{m}^{-1}$ auf $1,67 \pm 0,10 \mu\text{m}^{-1}$). Da der Spine-Verlust bei GSK-3-Inhibition offensichtlich nicht von BACE1

abhängig war, konnte dieses Enzym als Mediator des GSK-3 β -Knockout-Effekts ausgeschlossen werden.

4 Diskussion

4.1 GSK-3 β und Spine-Dichte

Licht- und elektronenmikroskopische Studien an adulten Mausgehirnen haben gezeigt, dass GSK-3 β in großen Mengen in Neuronen gebildet wird und besonders in Prä- und Postsynapsen vorzufinden ist^[169]. In Zellkultursystemen konnte GSK-3 β hinsichtlich neuronaler Plastizität mit dem Wachstum und der Größe der Wachstumsspitzen von Axonen assoziiert werden^[76,134]. Eine Beeinflussung dendritischer Spine-Dichten durch GSK-3 β -Defizienz konnte in Zellkultur nicht beobachtet werden (Jacek Jaworski, persönliche Mitteilung). Über eine Funktion auf postsynaptischer Seite im intakten, adulten Gehirn konnte bisher also nur spekuliert werden. Dies lag vor allem daran, dass bisher die Erzeugung eines lebensfähigen GSK-3 β -Knockout-Mausmodells fehlschlug^[92]. Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit ein neues Mausmodell etabliert, welches die GSK-3 β -Deletion in vereinzelt adulten Neuronen im intakten Gehirn ermöglicht (siehe Abschnitt 3.1 auf Seite 21 und folgende). Durch die geringe Anzahl von Knockout-Neuronen (ca. 3,1% aller Neurone) kann man davon ausgehen, dass die Zahl der Präsynapsen ohne GSK-3 β vernachlässigbar klein war. Es ist also unwahrscheinlich, dass die beobachteten postsynaptischen Knockout-Effekte eine präsynaptische Ursache haben. Dies wurde durch die im Abschnitt 3.7 auf Seite 28 gezeigten Daten nochmals bestätigt. Somit sind die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte rein postsynaptischer Natur.

Die vorliegenden Daten haben gezeigt, dass GSK-3 β -Verlust die Spine-Dichte signifikant reduziert. Dies erschien zumindest im Hippocampus und somatosensorischen Cortex unabhängig von den untersuchten Sub-Regionen zu sein (siehe Abschnitt 3.3 auf Seite 24). Darüber hinaus konnte hier ein direkter Zusammenhang zwischen Zygote des Knockouts und dem Effekt hergestellt werden, welcher offenbar nicht durch kompensatorische Mechanismen aufgehoben wurde (siehe Abschnitt 3.4 auf Seite 26 und Abschnitt 3.10 auf Seite 33). Ergänzend

dazu wurde von Anneke Kremer aus der Arbeitsgruppe von Fred van Leuven KU Leuven beobachtet, dass in einer S9A-Mutante die GSK-3 β -Überaktivierung Spine-Dichten erhöhte (persönliche Mitteilung, ^[47,123]). Diese Resultate erschienen zunächst unerwartet, da GSK3-Überaktivierung auf ultrastruktureller Ebene sowie auf Ebene der synaptischen Plastizität als synapsenschädigend beschrieben wurde ^[237]. Ebenso beeinträchtigte konditionale Überaktivierung von GSK-3 β in Mäusen Lern- und Erinnerungsfähigkeiten ^[89,133]. Die GSK-3 β -Überexpression wurde außerdem als Modell für Manie und Hyperaktivität vorgeschlagen ^[172]. Weil beeinträchtigte Lern- und Erinnerungsfähigkeiten mit einer reduzierten Synapsenzahl assoziiert wurden ^[9,10], stünden diese Befunde im Widerspruch zu den hier gezeigten Daten. In der Vergangenheit wurden allerdings auch Anstrengungen unternommen, die GSK-3-Aktivität nicht-letal zu inhibieren. Die artifizielle Expression einer funktionsunfähigen GSK-3 β -Variante bewirkte neuronale Apoptose und Motilitätsstörungen ^[75]. Heterozygot GSK-3 β -defiziente Mäuse unterschieden sich bezüglich der Erinnerungsmanifestation kaum von Wildtyp-Tieren. Interessanterweise galt das nicht für Langzeit-Erinnerungsvorgänge. Ihr Aufbau war gestört und Amnesie-ähnliche Symptome traten zum Vorschein ^[117]. Die Auswirkungen durch pharmakologische GSK3-Inhibition in Wildtyp-Tieren verbleiben ambivalent. Zum einen bewirkte die Inhibition Störungen beim räumlichen Lernen ^[101]. Zum anderen wurde nach der Administration von 0,5 μ M TDZD-8 (ein GSK-3-Inhibitor) eine Spine-Dichte-Erhöhung festgestellt, bei höheren Dosen hingegen wieder eine drastische Reduktion ^[40]. Diese Effekte wurden einer putativ neurotoxischen Wirkung der jeweils verwendeten Inhibitoren zugeschrieben. Die durch pharmakologische GSK-3-Inhibition gewonnenen Erkenntnisse stehen also nur teilweise im Einklang mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten der AR-A014418-Applikation (siehe Abschnitt 3.5 auf Seite 26).

Inwieweit ist GSK-3 β in dieser physiologischen Funktion einzigartig? Inzwischen wurde eine ganze Reihe von molekularen Vermittlern beschrieben, die direkt oder indirekt das Auswachsen oder die Eliminierung von Spines vermitteln. Als klassisches Beispiel soll hier das Rho/Rac-GTPase-System genannt werden. Es beeinflusst in Abhängigkeit von der Synapsen-Aktivität direkt die (De-)Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts, welches dem Spine Form und Stabilität verleiht ^[188,191]. Ein aktuelleres Beispiel zeigte ganz ähnlich zu den in dieser Arbeit gezeigten Versuchen eine direkte Auswirkung des p140Cap-Proteins auf die dendritische Spine-Dichte. p140Cap lokalisiert in der Postsynapse zusammen mit seinem Interaktionspartner EB3, um dort die Aktivität weiterer Kinasen zu modulieren. In Zellkul-

tur bewirkte der p140Cap-Knockdown den Spineuntergang durch Initiation der Aktin-Depolymerisation^[104].

Das zytoskelettäre Mikrotubuli-Netzwerk wurde lange Zeit als nicht essentiell für die strukturelle Spine-Plastizität wahrgenommen. Neuere Untersuchungen zeigten allerdings, dass auch Mikrotubuli in Spines ausgebildet werden^[112]. PAR-1 phosphoryliert Mikrotubuli-assoziierte Proteine^[224]. Eine Störung der Mikrotubuli-Dynamik, z.B. durch die Überexpression der PAR-1-Kinase (auch MARK genannt), bewirkte eine sofortige Elimination von Spines^[224]. Neben PAR-1 können auch einige andere Mikrotubuli-Effektoren (CLASPs, Spectraplakine) gleichzeitig das Aktin-Zytoskelett modulieren. Deswegen wird häufig über eine Art Netzwerk-Crosstalk diskutiert^[98,104,121,213,224]. Bestätigend zeigte eine Studie zum Mikrotubuli-assoziierten Protein 1B (MAP1b), dass dessen Knockout in Mäusen die hippocampale Spine-Dichte reduzierte. Dies wurde zusammen mit RhoA-Aktivierung und Rac1-Inaktivierung beobachtet, also Modulatoren der Aktin-Dynamik^[209]. Zwischen MAP-1b und GSK-3 β gibt es einen publizierten Zusammenhang (siehe Abschnitt 4.4 auf Seite 57)^[198].

NF κ B und β -Catenin sind andere Beispiele, die zunächst über das Transkriptom die strukturelle Spine-Plastizität beeinflussen können. Ein konditionaler SlickV-mediierter NF κ B-Knockout erzielte ähnlich wie bei den hier gezeigten Daten eine Reduktion hippocampaler Spine-Dichten von fast 32%^[17]. Interessanterweise ist NF κ B ein direktes Ziel von GSK-3 β . Die NF κ B-Aktivität ist direkt mit der GSK-3 β -Aktivität verknüpft^[135]. Ein β -Catenin-Knockout in kultivierten hippocampalen Neuronen rief dagegen eine erhöhte Spine-Dichte hervor^[132]. Weil GSK-3 β direkt die Stabilität von β -Catenin bestimmt, entspräche dieser Phänotyp einer GSK-3 β -Überexpression.

Des Weiteren gibt es noch eine Reihe anderer Gene, die besonders im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen die Spine-Dichte beeinflussen können. Dabei soll kurz das Tau-Protein genannt werden. Tau wird bei der Alzheimer-Erkrankung durch GSK-3 β hyperphosphoryliert und aggregiert^[51]. Die physiologische Tau-Phosphorylierung bestimmt dagegen seine Lokalisation in der Zelle und seine Affinität für Mikrotubuli. Dadurch ist Tau ebenfalls ein Modulator der Mikrotubuli-Stabilität^[105,216]. Die physiologische Funktion von Tau im Spine ist jedoch größtenteils unklar. Es ist allerdings bekannt, dass Tau eine exzitotoxische Wirkung am Spine vermitteln kann^[103].

Auf die möglichen molekularen Mechanismen des GSK-3 β -Knockouts wird aber im Abschnitt 4.4 auf Seite 57 nochmals eingegangen.

Eine kurze Anmerkung zur Rolle des Tamoxifens

In der vorgelegten Arbeit wurde zur Induktion des GSK-3 β -Knockouts regelmäßig Tamoxifen appliziert. Dies ist deshalb erwähnenswert, weil Tamoxifen ein Östrogenanalog ist. Steroidhormone des Östrogen-Zyklus oder Estradiol selbst können bei Ratten starke Schwankungen in der hippocampalen dendritischen Spine-Dichte hervorrufen^[222]. Tamoxifen-Verabreichung blockiert diesen Effekt. Tamoxifen alleine bewirkt aber keine Reduktion der Spine-Dichte^[153]. Da in der vorgelegten Arbeit immer beide Versuchsgruppen Tamoxifen erhielten, kann man jedoch einen möglichen Effekt durch Tamoxifen in den Untersuchungsreihen vernachlässigen.

4.2 GSK-3 β und die Spine-Funktion

Die Spine-Morphologie wurde schon oft mit der elektrischen Spine-Funktion in Verbindung gebracht. Dies ist insofern plausibel, da beispielsweise mit einem größeren Spine-Kopf-Volumen die Membranoberfläche der Postsynapse vergrößert ist und mehr Neurotransmitter-Rezeptoren aufnehmen kann. Dementsprechend hängt die Integration eines Signals von der Morphologie des Spines ab^[85,232,233]. Man unterscheidet im Wesentlichen drei verschiedene Morphologie-Subtypen: mushroom, stubby und thin. Filopodien werden, da sie in der Regel keine postsynaptische Dichte aufweisen, häufig nicht als Spine *per se* betrachtet^[85,120,170]. Die Morphologie-Analyse in Abschnitt 3.8 auf Seite 30 ergab einen Anstieg in der Fraktion der stubby Spines, während sich der Anteil von mushroom und thin Spines reduzierte. Es ist nicht ungewöhnlich, dass die Manipulation von Proteinen, denen eine Funktion am Spine zugeschrieben wurde, die Spine-Morphologie beeinflusst. Der Knockdown des p140Cap-Proteins sowie seines Interaktionspartners EB3 veränderten die Spine-Morphologie auf Kosten der mushroom Spines, wobei gleichzeitig die Bildung filopodialer Strukturen gefördert wurde^[104]. Ein ganz ähnlicher Effekt wurde durch den MAP1b-Knockout in Mäusen beobachtet. Auch hier bewirkte die MAP1b-Defizienz das Hervortreten filopodialer und thin-ähnlicher Strukturen auf Kosten der mushroom und stubby Spines^[209]. Bei der Inaktivierung der NF κ B-Signalisierung wurde eine Zunahme der stubby Spines

beobachtet^[29]. Eine konditionale, postsynaptische Deletion von β -Catenin in Zellkultur bewirkte, dass Spines verlängert wurden, wobei die Spine-Dichte in diesem Fall unverändert blieb^[162]. Obwohl also hinsichtlich der Spine-Dichte oftmals ähnliche Resultate wie bei der GSK-3 β -Deletion/Überaktivierung beobachtet wurden, galt dies nicht auch unbedingt für die Spine-Morphologien. Das liegt möglicherweise daran, dass beim GSK-3 β -Knockout andere molekulare Mechanismen in die zytoskelettäre Dynamik eingreifen.

Zur Überprüfung der Spine-Funktionalität wurden in der vorgelegten Arbeit auch elektrophysiologische Messungen an GSK-3 β -Knockout-Neuronen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.9 auf Seite 32). Anstoß für dieses Experiment bildete die Tatsache, dass die Spine-Morphologien jeweils unterschiedliche elektrophysiologische Zustände reflektieren^[85,170]. Darüber hinaus wurde durch GSK-3 β -Verlust auch eine generelle Reduktion der Spine-Kopf-Volumina beobachtet. Die elektrophysiologischen Messungen an GSK-3 β -Knockout-Neuronen ergaben, dass sich die Frequenz der spontanen Ereignisse (mEPSC) gegenüber wildtypischen, benachbarten Neuronen nicht signifikant veränderte. Die mEPSC-Frequenz hängt mit der Ca^{2+} -Konzentration in der Präsynapse zusammen. Mit ihr korreliert die Wahrscheinlichkeit der Vesikel-Fusion an der präsynaptischen Membran und damit die Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt^[91,184,231,236]. Somit scheint eine Wirkung eines GSK-3 β -Knockouts auf die präsynaptische Vesikelfreisetzung ausgeschlossen. Anders verhielt es sich mit der mEPSC-Amplitude. Hier wurde eine signifikante Reduktion beobachtet. Die mEPSC-Amplitude hängt unmittelbar mit der Anzahl von Neurotransmitter-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran zusammen. Je kleiner ein Spine ist, umso geringer ist seine Sensitivität für Neurotransmitter, was eine niedrige Amplitude des integrierten Signals zur Folge hat^[184,231]. Dies passt besonders mit den hier erhobenen Morphologie-Daten zusammen, die eine Verkleinerung des Spine-Kopf-Volumens zeigen. Ein analoger Effekt wurde in MAP1b- und NF κ B-defizienten Mäusen gefunden^[17,209]. Auch für β -Catenin erscheinen die Befunde ähnlich. Der konditionale β -Catenin-Knockdown in Kultur bewirkte bei Gesamtzellen Patch-Clamp-Messungen eine Reduktion der mEPSC-Amplitude. Obwohl anders diskutiert, ist in den Abbildungen von Okuda et al. 2007^[162] aber auch eine klare Reduktion in der mEPSC-Frequenz zu erkennen. Dagegen zeigte eine andere Studie von Peng et al. 2009^[167] den gegenteiligen Effekt. Die Überexpression von β -Catenin im Mausmodell führte bei gepatchten Neuronen in organotypischen Hirnschnitten ebenfalls zu einer reduzierten mEPSC-Amplitude. An den beiden Beispielen wird deutlich, wie sehr sich die Ergebnisse

aus Zellkultur-Studien von jenen aus *in vivo* Mausmodellen unterscheiden können.

Wie sieht es an der Postsynapse mit Lern- und Erinnerungsvorgängen aus? Durch pharmakologische Manipulation der GSK-3-Aktivität wurde GSK-3 inzwischen als ein Bindeglied zwischen der Vermittlung von LTP und LTD identifiziert. Denn die durch GSK3-Aktivität induzierte LTD kann durch GSK-3-Inhibition blockiert werden^[166]. Dieser Effekt gilt nicht für andere Formen der synaptischen Plastizität und betrifft auch keine anderen, verwandten Kinasen^[165,166]. Wird ein LTP-Stimulus angelegt, kommt es durch Phosphorylierung der Aminosäure Serin 9 zur physiologischen GSK-3-Inhibition^[99]. Verhindert man nun diese physiologische Inhibition durch die Verwendung einer S9A-Mutante, so kann keine LTP-Antwort mehr induziert werden^[47,166]. GSK-3-Inhibition ist somit also zwingend zur Induktion der LTP, also quasi der Erinnerungsmanifestation, erforderlich. Dabei dient GSK-3 offenbar als eine Art „molekularer Schalter“^[20].

4.3 GSK-3 β und die Spine-Stabilität

Die in Abschnitt 3.3 auf Seite 24 beschriebenen Experimente haben gezeigt, dass ein genetischer Verlust von GSK-3 β die dendritische Spine-Dichte reduziert. Diese Befunde stammen jedoch aus Hirnschnitt-Präparaten und geben daher keine Auskunft über die Natur der Spine-Dichte-Senkung. Prinzipiell sind zunächst nur zwei Mechanismen denkbar. Zum einen könnte der GSK-3 β -Verlust zur aktiven Eliminierung von bestehenden Spines führen. Zum anderem wäre es auch möglich, dass die Nervenzelle ohne GSK-3 β nicht fähig ist, neue Spines auszubilden und sozusagen in der Entwicklung stagniert. Um diese Fragen zu klären, wurden Enriched Environment-Experimente (siehe Abschnitt 3.11 auf Seite 35) und intravital-mikroskopische Untersuchungen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.12 auf Seite 36).

Das Platzieren der Versuchstiere in einem Enriched Environment erhöhte in Wildtyp-Tieren gegenüber Einzelkäfig-Tieren die hippocampale CA1 Spine-Dichte. Der Wert von 15% liegt relativ nahe an den von Jung et al. 2012 publizierten 20%^[110]. Das Enriched Environment Protokoll ist als zuverlässige Methode zur neuronalen Stimulation anzusehen. Während die meisten Studien mit dem Entzug von Sinnesreizen arbeiteten, um die neuronale Plastizität zu untersuchen^[93,95,114], setzt

das Enriched Environment vollkommen auf physiologische Parameter und zielt direkt auf Erfahrung basiertes Lernen ab^[66,179,215]. Das Enriched Environment bewirkt in verschiedenen Bereichen des Gehirns bei Mäusen, Ratten und Affen eine Spine-Dichte-Erhöhung. Dazu gehört neben dem somatosensorischen Cortex^[71] auch der Hippocampus^[122,175]. Auch auf elektrophysiologischer Ebene lassen sich die Effekte des Enriched Environments abbilden. So bewirkte bereits ein 15-24-stündiges Verweilen von Ratten im Enriched Environment eine Verstärkung der synaptischen Übertragung zwischen hippocampalen Neuronen^[176]. Hinsichtlich der Wildtyp-Befunde bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die publizierten Informationen. In einigen Studien mit transgenen Mäusen wurde das Enriched Environment als Werkzeug zur *in vivo* Stimulation hippocampaler und kortikaler Neurone benutzt. In der Regel wurde das Enriched Environment dazu angewendet, um einen Phänotyp eines Protein-Knockouts wieder aufzuheben^[147,175]. In dieser Arbeit konnte dies dagegen nicht gezeigt werden. Das Enriched Environment bewirkte im GSK-3 β -Knockout zwar eine Erhöhung der Spine-Dichte, dennoch blieb der Unterschied zwischen den Wildtyp- und Knockout-Tieren bestehen. Dies ist ein deutliches Indiz dafür, dass ein GSK-3 β -defizientes Neuron zwar Spines ausbilden kann, diese dann aber offensichtlich nicht behält, also die Stabilisierung der Spines beeinträchtigt ist.

Um diese Möglichkeit detaillierter zu charakterisieren, wurden auch intravital-mikroskopische Untersuchungen unternommen (siehe Abschnitt 3.12 auf Seite 36). Wie bereits *ex vivo* gezeigt, fiel auch *in vivo* die Spine-Dichte bei GSK-3 β -Defizienz um ca. 20%. Der Effekt machte sich nach ca. drei Tagen bemerkbar, und stabilisierte sich dann ab Tag 7. Um eine detaillierte Auskunft über die Natur der Reduktion zu erfahren, wurden die Spines anhand ihrer Lebensdauer charakterisiert. Ähnlich wie von Holtmaat et al. 2005 beschrieben, wurden Spines die länger als 4 Tage am Dendriten vorhanden waren als persistent eingestuft, alle anderen als transient^[96]. Die transienten Spines sind also instabiler Natur und bilden nach Knott et al. 2006 vor 4 Tagen Existenzdauer noch keine stabilen Synapsen aus^[120]. Durch die Klassifizierung in transiente und persistente Spines zeigte sich, dass eine Woche nach GSK-3 β -Knockout hauptsächlich persistente Spines untergingen. Demgegenüber stand ein starker Anstieg in der Fraktion transienter Spines. Die Netto-Spine-Dichte-Reduktion blieb jedoch erhalten, weil die Transienten-Fraktion ca. $\frac{1}{10}$ der Gesamt-Spines ausmachte und somit kaum einen Einfluss auf die Gesamt-Spine-Dichte hat. Bestätigend dazu stieg auch nach drei Tagen die Spine-Umsatzrate stark an. Die gemessene Spine-Dichte-Reduktion konnte somit

einer verkürzten Lebenszeit stabiler Spines zugeschrieben werden. Dies spiegelte sich in einer Reduktion der Zeitkonstante τ von 36,8 Tagen zu 13,8 Tagen wider. Die Lebensdauer der Spines, die am Tag 10 an Dendriten ohne GSK-3 β entstanden sind, reduzierte sich ebenfalls von 17,0 Tage auf 4,16 Tage. Im Vergleich zu publizierten Daten lagen die wildtypisch gemessenen Spine-Dichten um ca. $0,2\mu\text{m}^{-1}$ höher und verblieben auf dem gleichen Niveau bei ca. $0,6\mu\text{m}^{-1}$. Die Werte zur Überlebensfraktion und Spine-Umsatzrate bestätigen in etwa die von Holtmaat et al. 2005 erhobenen Daten^[96]. Dass die Kinetiken vergleichbar sind, die absoluten Spine-Dichte-Werte aber versetzt waren, spricht für eine unterschiedliche Spine-Ausbeute durch das kraniale Fenster. Dies ist möglicherweise darin begründet, dass durch die niedrige Hintergrund-Fluoreszenz und die Empfindlichkeit der verwendeten GaAsP-Detektoren mehr und kontrastreicheres YFP-Signal erfasst wurde.

Die Interpretation der Kinetiken ergibt folgendes Bild: Durch den Verlust von GSK-3 β wird zunächst ein Anteil von ca. 20% der persistenten Spines eliminiert und die tägliche Spine-Umsatzrate angehoben. Dieses Bild passt gut zur derzeitigen Vorstellung von Lern- und Erinnerungsvorgängen. Beim erfahrungsbedingten Lernen im Enriched Environment wurde nämlich erstens beobachtet, dass sich existierende Spines destabilisieren. Zweitens bewirkte anschließend eine hohe Spine-Umsatzrate das vermehrte Auftreten neuer Spines. Drittens wurden diese im Anschluss stabilisiert, was zu einer netto Spine-Dichte-Erhöhung führte^[66]. In der vorliegenden Studie waren jedoch GSK-3 β -defiziente Neurone nicht in der Lage, den dritten Schritt einzuleiten. Im Kontext von Lern- und Erinnerungsvorgängen würde man damit die Inhibition von GSK-3 β als Initiator von Lern- und Erinnerungsvorgängen einordnen. Dabei bestünde die Hauptfunktion darin, bereits bestehende (aber ggf. weniger aktivierte) Spines zu eliminieren und neue Spines, die eine synaptische Verbindung aufgebaut haben, zu stabilisieren. Diese Hypothese passt zu den elektrophysiologischen LTP/LTD-Befunden von Hooper et al. 2007, bei denen nach LTP-Stimulation die Verstärkung der synaptischen Transmission eine GSK-3-Inhibition voraussetzt^[20,99,166].

Neu an den hier gezeigten *in vivo* mikroskopischen Daten ist, dass sie auf Einzelzell-Niveau und an adulten Mäusen erhoben wurden. Eine ähnliche Strategie wurde beim derzeitigen Stand der Literatur nur für ein weiteres transgenes Mausmodell gezeigt. Das NgR1-Gen leitet am Ende des adoleszenten Stadiums kortikaler Neurone den Übergang von hohem zu niedrigem Spine-Durchsatz ein^[2].

Ein konditionaler Knockout von NgR1 in adulten Neuronen konnte eine Umkehrung zurück zum adoleszenten Spine-Durchsatz erzwingen. Umgekehrt bewirkte ein Enriched Environment die Stabilisierung neuer Spines auf das gleiche Niveau des NgR1-Knockouts. Anders als in dieser Arbeit handelte es sich bei den NgR1-Experimenten aber um entwicklungsbiologische Fragestellungen. Dass bei dieser Studie mit einem adulten SlickV-Mausmodell gearbeitet wurde, war allerdings interessant. Auch für Präsenilin 1 (PS1) wurde ein Versuch unternommen, einen physiologischen Gen-Knockout auf Basis adulter SlickV-Neurone zu charakterisieren^[109]. PS1 ist ein mit der Alzheimer-Erkrankung assoziiertes und transmembranöses Protein, dessen Funktion bei der strukturellen Spine-Plastizität noch ungenügend verstanden ist^[203]. Die *in vivo* mikroskopische Studie von Jung et al. 2011 zeigte jedoch keinerlei Einfluss des PS1-Knockouts auf die dendritischen Spine-Dichten oder Spine-Morphologien^[109].

4.4 Zugrunde liegende molekulare Mechanismen

Für GSK-3 β sind fast einhundert mutmaßliche Substrate bekannt. Diese Tatsache legt nahe, dass GSK-3 β nahezu jeden denkbaren zellulären Prozess in jedem erdenklichen Gewebe reguliert. Jedoch sind viele dieser Ziele nur *in vitro* nachgewiesen und nur einige davon für Funktionen im Gehirn von Relevanz^[198]. Hier wird in Kürze auf GSK-3 β -regulierte Mechanismen eingegangen, die eine Funktion bei der Spine-Plastizität ausüben können.

Das CREB-Protein entfaltet durch seine Phosphorylierung an Serin 129 Gen-regulatorische Aktivität. CREB ist als Aktivator der unmittelbar frühen Gene beschrieben worden, wobei die Langzeit-Plastizität von Synapsen durch die Bildung von Wachstumsfaktoren und Signalmolekülen moduliert wird^[44,189]. Durch pharmakologische GSK3-Inhibition hat sich CREB auch *ex vivo* als aktivierter Mediator von GSK-3-Signalisierung herausgestellt^[40]. Allerdings stehen diese über Western-Blot-Analyse erhobenen Befunde im Kontrast zu den hier gezeigten Daten. Eine immunhistochemische Sondierung zeigte außerdem keine veränderte CREB-Translokation in adulten GSK-3 β -Knockout-Neuronen.

Wie im vorherigen Abschnitt angesprochen, kontrolliert GSK-3 die Aktivität der zellulären NF κ B-Signalisierung. Konkret bewirkt die Phosphorylierung der inhi-

bitorischen Komponente des NF κ B-Signalwegs dessen Abschaltung. Die genetische Inhibition der NF κ B-Signalisierung wurde bereits mit reduzierter Spine-Dichte und eingeschränkter synaptischer Transmission in Verbindung gebracht^[17]. Eine neue Studie hat darüber hinaus gezeigt, dass die Menge des transmembranösen Proteins BACE1 direkt von GSK-3 β gesteuert wird. Dies geschieht über die NF κ B-medierte Transkriptionsmaschinerie^[135]. Ein BACE1-Knockout in 4 Monate alten Mäusen bewirkte eine signifikante Reduktion der hippocampalen CA1-Spine-Dichte, besonders auf Kosten der mushroom Spines^[182]. Eine über BACE1 vermittelte Modulierung der strukturellen Spine-Plastizität wäre damit ein möglicher Mechanismus für die in dieser Arbeit beobachteten Effekte. In GSK-3 β -Knockout-Neuronen war jedoch keine veränderte NF κ B-Immunreaktivität zu beobachten. Die pharmakologische GSK-3-Inhibition in BACE-Knockout-Mäusen zeigte außerdem keine Wirkung auf die dendritische CA1-Spine-Dichte (siehe Abschnitt 3.13.3 auf Seite 45). Dies könnte daran liegen, dass der Mechanismus der NF κ B-Signalisierung entweder anders verläuft als erwartet, kompensiert werden kann, oder im adulten Gehirn keine Rolle mehr spielt.

Wie bereits erläutert, wird die Formgebung und Stabilität dendritischer Spines wesentlich durch dynamische Vorgänge im Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett bestimmt^[100,112]. Die Regulation der zytoskelettären Dynamik erfolgt unter anderem über assoziierte Proteine. Beispielsweise erhöht die Phosphorylierung von MAP1b die Affinität für Mikrotubuli und damit deren Stabilisierung^[112,198]. Durch GSK-3 β phosphoryliertes MAP1b hält sich vorwiegend im Axon auf, während es unphosphoryliert in Richtung Zellsoma abwandert^[183,198,211]. Dagegen spricht allerdings der Befund, dass MAP1b *in vivo* offensichtlich eine Funktion in der dendritischen Spine-Plastizität ausübt^[209]. Auch die hier gezeigten immunhistochemischen Daten auf Seite 41 im Abschnitt 3.13.1 zeigen, dass MAP1b in unmanipulierten Neuronen auch in Dendritschäften anzutreffen ist und erst durch den GSK-3 β -Knockout in Richtung Zellsoma abwandert. Dieser Widerspruch kann jedoch darin begründet sein, dass die bereits publizierten Distributionsdaten im Axon aus Zellkultursystemen erhoben wurden. Dennoch sind die Daten konsistent, da phosphoryliertes MAP1b zur Mikrotubuli- und somit zur Spine-Stabilisierung beiträgt^[183,198]. Dies geschieht über die RhoA-Aktivierung und Rac1-Inaktivierung, also Modulatoren der Aktin-Dynamik^[209]. Fehlt GSK-3 β , werden Mikrotubuli nicht länger stabilisiert und somit auch nicht die Spines. Dies wäre somit ein möglicher Mechanismus. Durch GSK-3 β phosphoryliertes MAP2c findet man dagegen hauptsächlich an destabilisierten Mikrotubuli^[181]. Dies steht eventuell im direkten

Widerspruch zu den hier gezeigten Daten, da ein GSK-3 β -Knockout demzufolge Mikrotubuli und damit gegebenenfalls Spines stabilisieren würde. Anders als bei MAP1b ist bisher kein solcher Mechanismus beschrieben worden und es wurde immunhistochemisch auch keine Veränderung in der MAP2c-Distribution gefunden. Schwieriger ist die Situation für das murine Tau-Protein einzuschätzen, da über die physiologische Funktion von Tau in Spines kaum Informationen vorhanden sind. Es ist jedoch bekannt, dass im Falle der Alzheimer-Erkrankung Tau hyperphosphoryliert wird und sich in Dendriten anreichert, um dort synaptotoxische Wirkung zu vermitteln^[103]. Durch GSK-3 β -medierte Tau-Phosphorylierung reduziert die Affinität für Mikrotubuli und destabilisiert sie^[198,216]. Unphosphoryliertes Tau müsste demzufolge Mikrotubuli stabilisieren, was ebenfalls nicht im Einklang mit den hier gezeigten Daten steht. Außerdem dirigiert konstitutiv aktiviertes GSK-3 β Tau aus den Axonen in das somato-dendritische Kompartiment^[105]. Möglicherweise ist auch diese Diskrepanz auf den Vergleich zwischen *In-vivo*- und Zellkultur-systemen zurückzuführen oder es handelt sich bei der in dieser Arbeit gemessenen Tau-Umverteilung um einen Epi-Effekt.

Zuletzt soll β -Catenin als möglicher Mediator angesprochen werden. Wie im Abschnitt 3.13.1 auf Seite 41 gezeigt, reichert sich nach GSK-3 β -Verlust β -Catenin immunhistochemisch nachweisbar in der Zelle und im Zellkern an. Im Wnt-Signalweg bildet GSK-3 β zusammen mit β -Catenin, APC und Axin einen Komplex aus, dessen Stabilität durch GSK-3 β -Phosphorylierung reguliert wird. Die Phosphorylierung von β -Catenin an Serin 33, 37 und Threonin 41 bewirkt die proteasomale Degradation^[223]. Insofern war es nicht überraschend, dass sich β -Catenin in GSK-3 β -defizienten Zellen anreicherte. Die Anreicherung in einzelnen Dendriten und Spines war dagegen unerwartet. Um β -Catenin als putativen Mediator der GSK-3 β -Effekte zu testen, wurde die *catnb*^{LoxP(EX3)} \times SlickV-Mauslinie erzeugt. Bei ihr ist das Exon 3 des β -Catenins gefloxt und kann durch Cre-ER^{T2} vermittelte Rekombination ausgeschnitten werden. Das Exon 3 enthält genau die oben genannten GSK-3 β -Phosphorylierungsstellen. Das nach Cre-ER^{T2}-Rekombination stabilisierte β -Catenin bleibt funktional im Zellkern aktiv^[82]. Unter dieser Stabilisierungsreaktion konnte ebenfalls eine reduzierte Spine-Dichte nachgewiesen werden. Darüber hinaus erzielte die parallele Stabilisierung von β -Catenin und pharmakologische GSK-3-Inhibition keine weiteren Veränderungen (siehe Abschnitt 3.13.2 auf Seite 43). Somit hatte GSK-3 nach der β -Catenin-Stabilisierung also keinen Einfluss mehr auf die dendritischen Spines. Demzufolge kann man β -Catenin als Mediator der beobachteten Effekte postulieren. Doch in welcher Weise wirkt β -Catenin

auf dendritische Spines? Diese Frage ist schwer zu beantworten, da die Funktion von β -Catenin im Spine grostenteils unverstanden ist. Erschwerend kommt hinzu, dass β -Catenin im Rahmen der Wnt-Signalsierung offensichtlich über zwei Wege aktiv sein kann: kanonisch über den Zellkern und nicht-kanonisch direkt in der Prä- und Postsynapse^[102].

Im kanonischen Fall wandert β -Catenin in den Zellkern und assoziiert mit der TCF/LEF-Bindefaktorfamilie, um Gentranskription zu aktivieren. Die Zahl der durch β -Catenin regulierten Gene ist hoch, so dass sich die in dieser Arbeit betrachtete Kaskade schwer weiterverfolgen lässt. Trotzdem sollen in Tabelle 4.1 kurz einige Kandidaten genannt werden, die in Verbindung mit synaptischer/neuronaler Plastizität diskutiert werden und für zukünftige Untersuchungen in Betracht gezogen werden knnten^[8,152,159].

Mögliche Zielkandidaten für β -Catenin			
Cyclin D	c-jun	fra-1	Fosl1
MMP-7	EphB	Survivin	FGF18
L1	Tiam1	Nitric Oxide Synthase 2	Dickkopf
MMP-9	Wrch-1	cyclooxygenase-2	DFz2

Tabelle 4.1: Eventuell relevante Effektorgene von β -Catenin. Alle Kandidaten wurden nach derzeitigem Stand der Literatur inzwischen mit neuronaler Plastizität in Zusammenhang gebracht.

Im nicht-kanonischen Fall stellte sich durch elektrophysiologische Messungen heraus, dass Wnt-Signalsierung LTP durch die Insertion von NMDA- und AMPA-Rezeptoren vermittelt. Dies ging mit Spine-Wachstum, Verdichtung der PSD95-Cluster und Verstärkung der synaptischen Transmission über den Ca^{2+} /Calmodulin-Signalpfad einher^[30,102]. Diese Veränderungen traten bereits nach wenigen Minuten auf, was nicht im Einklang mit den hier gezeigten kinetischen Veränderungen nach mehreren Tagen steht. Ein direkter, nicht-kanonischer Interaktionspartner von β -Catenin ist N-Cadherin. Die Bindung zwischen N-Cadherin und β -Catenin an der Postsynapse hilft bei der Stabilisierung des lokalen Aktin-Zytoskeletts, der Ausbildung von Zell-Adhäsionskontakten und der Stabilisierung der synaptischen Verbindung^[8]. Auch bei den zuvor beschriebenen Effekten von β -Catenin auf die glutamaterge Spontanaktivität (siehe Seite 53) wird von einer nicht-kanonischen Wirkungsweise ausgegangen^[8,102,162].

Obwohl in dieser Arbeit β -Catenin immunhistochemisch in Dendriten und sogar

in vereinzelt Spines beobachtet wurde, muss das nicht zwangsläufig eine nicht-kanonische Wirkungsweise des β -Catenins bedeuten. Dagegen spricht zunächst der kinetische Zeitverlauf aus der Intravital-Mikroskopie, bei dem sich die Veränderungen erst nach mehreren Tagen einstellen. In weiterführenden immunhistochemischen Untersuchungen konnte dazu keine Veränderung im Cadherin-Muster gefunden werden. Es ist wahrscheinlich, dass die β -Catenin-Färbung in Dendriten und Spines ein Nebeneffekt der kontinuierlichen Anreicherung des Proteins in der Zelle ist. Zuletzt soll noch angemerkt werden, dass für die $catnb^{LoxP(EX3)}$ -Mutante nur die kanonische Funktion, nicht aber die nicht-kanonische Funktion nachgewiesen wurde^[82]. Dies könnte Bestandteil weiterer Untersuchungen sein. Hinsichtlich der Lern- und Erinnerungsvorgänge zeigten Untersuchungen der β -Catenin-mRNA-Menge in der Amygdala, dass β -Catenin offensichtlich für die Konsolidierung von Langzeit-Erinnerungsvorgängen nötig ist, nicht aber für deren Akquise^[136]. Da beobachtet wurde, dass bei der langzeit- und erfahrungsabhängigen Erinnerungskonsolidierung initial Spines destabilisiert werden und GSK-3 β -Inhibition für die Induktion einer LTP-Antwort nötig ist, ist ein β -Catenin-medierter Weg über den Zellkern wahrscheinlicher^[20,66,99,166]. Die Belegung dieses Signalwegs und die Identifizierung der verantwortlichen Zielgene können Ausgangsbasis für zukünftige Untersuchungen sein.

4.5 GSK-3 und neurodegenerative Erkrankungen

Alzheimer-Erkrankung

Das Auftreten des A β -Peptids und seine Aggregation zu amyloiden Plaques ist eines der Haupt-Diagnosemerkmale für Morbus Alzheimer. In Anwesenheit von A β wird GSK-3 überaktiviert. Man glaubt, dass diese Überaktivierung zu Störungen intrazellulärer Signalkaskaden und zum Untergang von Synapsen führt^[5,204]. Außerdem bewirkt überaktiviertes GSK-3 die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins. Es aggregiert darauf hin zu Tangles, dem zweiten Haupt-Diagnosemerkmal^[51]. Deshalb wurde inzwischen GSK-3 als das Bindeglied zwischen A β - und Tau-Pathologie vorgeschlagen^[90]. Dies liegt vor allem darin begründet, dass die pharmakologische Inhibition von GSK-3 durch Lithium oder anderen Substanzen sowohl den Synapsenverlust als auch das Auftreten der Tau-Aggregate abmildert^[40,101,158,187]. Übertragen würde das bedeuten, dass eine pharmakologische Inhibition Spines stabilisiert, was im Widerspruch zu den hier gezeigten Daten stünde. Doch der 1:1-Vergleich der in dieser Arbeit erhobenen physiologischen Befunden mit je-

nen aus Studien zur Alzheimer-Erkrankung ist nicht wirklich sachgemäß. Zum einen sind bei neurodegenerativen Erkrankungen sehr wahrscheinlich mehr als nur ein Signalweg gestört. Zum anderen wurde beobachtet, dass GSK-3 bei der Alzheimer-Erkrankung überaktiviert ist und eine Inhibition zurück auf physiologisches Niveau die Situation verbesserte. Gleichzeitig bewirkte die GSK-3-Inhibition aber auch eine Senkung der Spine-Dichte^[40]. Dies ging häufig mit starken kognitiven Beeinträchtigungen einher, die als Nebenwirkungen betrachtet wurden^[101]. Zuletzt soll angemerkt werden, dass Lithium als Komplexbildner mit ATP kaum als spezifischer GSK-3-Inhibitor betrachtet werden kann. Es ist bekannt, dass Lithium ebenfalls eine Reihe anderer Kinasen inhibiert. Eventuell ist es die Kombination der inhibierten Proteine, die eine Verbesserung der Pathologie hervorruft^[34,56,221]. Lithium ist allerdings als Medikament gegen Morbus Alzheimer in einer klinischen Studie gescheitert. In humanen Fällen konnten durch Lithium weder Verbesserungen der Tau-Pathologie noch der kognitiven Leistungen nachgewiesen werden^[81].

Schizophrenie

Das DISC1-Gen ist in den seltenen Fällen der genetisch vererbaren Schizophrenie korrumpiert. Physiologisch interagiert DISC1 direkt mit GSK-3, bewirkt dessen Inhibition und damit die Stabilisierung von β -Catenin. Diese Inhibition ist bei der DISC1-Korruption gestört, was zu einer veränderten Nervenzell-Ausdifferenzierung und kognitiven Beeinträchtigungen führt^[140]. Auch hier kommt es zu einer Reduktion dendritischer Spine-Dichten pyramidaler Nervenzellen^[70]. GSK-3-Inhibitoren verbesserten das Krankheitsbild. Es ist aber unklar, ob sich dies auf die Wiederherstellung der Nervenzell-Reifung zurückführen lässt oder der Wiederherstellung physiologischer Spine-Dichte-Niveaus. Dies konnte bisher nur durch einen genetischen Knockout von GSK-3 α erreicht werden^[130].

Fragiles-X-Syndrom

Das Interessante bei dieser Krankheit ist, dass die Zahl der dendritischen Spines im Hippocampus extrem erhöht ist, aber die Betroffenen trotzdem unter kognitiven Defiziten leiden. Dazu gehört auch, dass die Spines ungewöhnliche morphologische Strukturen aufweisen und die Spine-Umsatzrate herabgesetzt ist^[86]. Aus diesen Fakten ist also ersichtlich, dass nicht zwangsläufig die Spine-Dichte mit der kognitiven Leistungsfähigkeit korreliert und „mehr“ Spines nicht gleichzeitig „besser“ bedeutet. Gerade in diesem Zusammenhang ist es wichtig herauszustellen, dass sich GSK-3-Inhibition zur Wiederherstellung der physiologischen Spine-Umsatzrate derzeit als vielversprechende Therapie zur Behandlung des Fragilen-X-Syndroms

herauskristallisiert^[149].

Die Anführungen sollen verdeutlichen, dass die Dichte der dendritischen Spines keine gute Messgröße für die Wirksamkeit einer Therapie neurodegenerativer Erkrankungen darstellt. Während die Alzheimer-Erkrankung deutlich mit einer Reduktion dendritischer Spine-Zahlen assoziiert wurde, ist dies bei Schizophrenie und bei Depression ambivalent. Hier wurden gehirnregionabhängig Veränderungen der dendritischen Spine-Dichten in beide Richtungen beobachtet^[61,168]. Vielmehr muss also der physiologische Aspekt eines Proteins betrachtet werden. Dazu gehört dessen Fähigkeit, die Spine-Stabilität und Umsatzrate zu verändern. So ist eine erhöhte Spine-Umsatzrate z.B. mit Lern- und Erinnerungsakquise verbunden^[66], eine verringerte Umsatzrate mit neurodegenerativen Erkrankungen^[61].

4.6 Hypothese

Ausgehend von den in dieser Arbeit erhobenen Daten, zuvor diskutierten Fakten und bereits publizierten Informationen, soll nun folgende Arbeitshypothese aufgestellt werden. Sie ist auch in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.

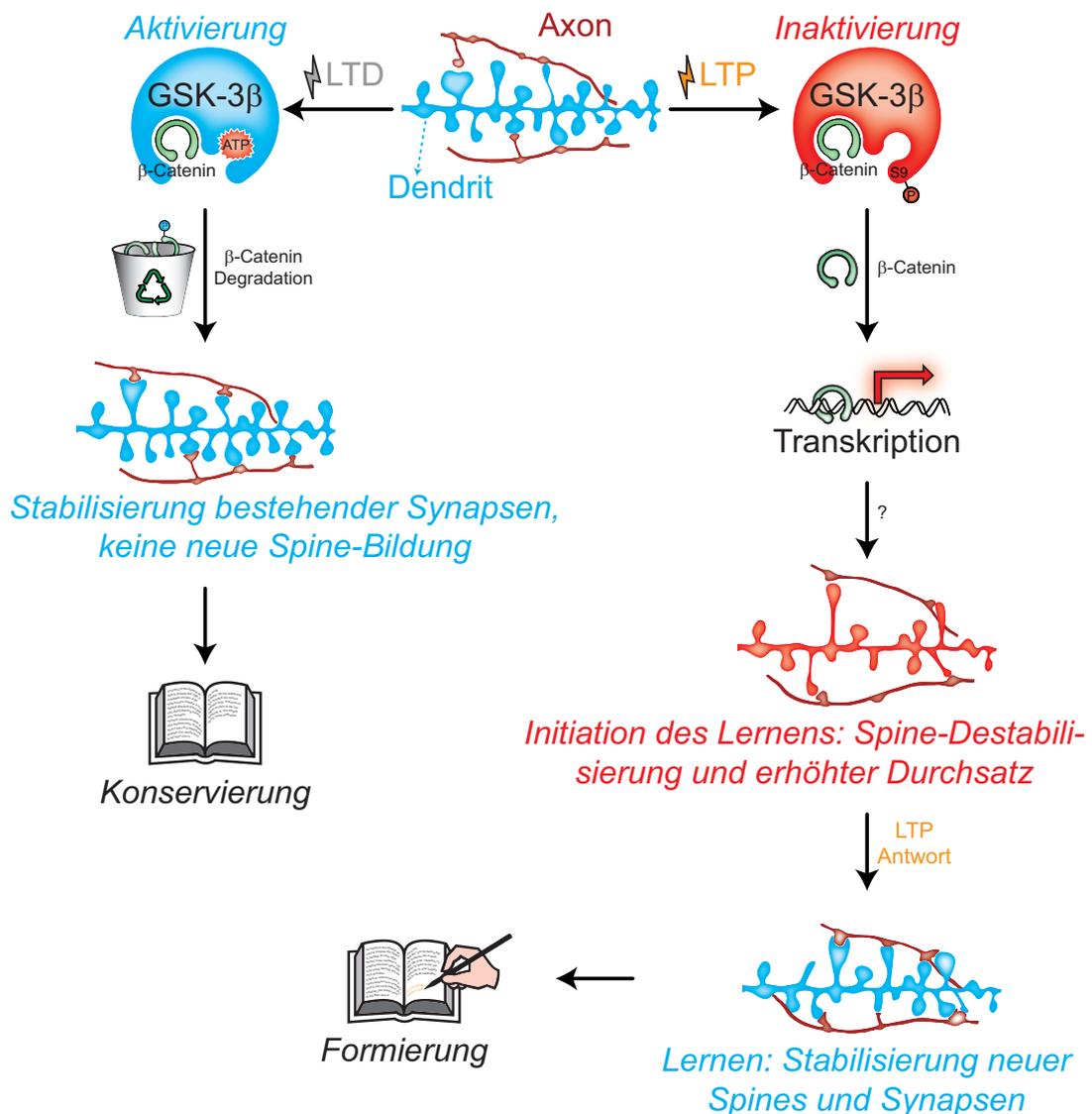


Abbildung 4.1: Hypothetische Rolle von GSK-3β in der strukturellen Spine-Plastizität.

Die verringerte GSK-3β-Aktivität bewirkt in Neuronen möglicherweise einen Zustand erhöhter Plastizität. Dies äußert sich durch erhöhte Spine-Umsatzrate und Spine-Destabilisierung. Diese Hypothese steht mit Befunden in Einklang, bei denen mit der Induktion der LTP GSK-3 inhibiert wird^[47,99,166]. Die physiologische Rolle von GSK-3β in der strukturellen Spine-Plastizität setzt außerdem ein streng

kontrolliertes Äquilibrium zwischen GSK-3 β -Aktivierung und Inaktivierung voraus. Des Weiteren bewirkte GSK-3-Inhibition einer Verbesserung der Symptome in Tiermodellen und Patienten des Fragilen-X-Syndroms, welches durch erhöhte Spine-Dichten und reduzierten Spine-Umsatz charakterisiert ist^[149]. Deshalb stellt GSK-3 nach wie vor ein interessantes therapeutisches Ziel zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen dar.

5 Material und Methoden

5.1 Experimente an Mäusen

5.1.1 Haltung

Beschreibung der Haltungsbedingungen, des Hygienemanagements und der Vorbereitung der Tiere auf den Versuch gemäß der genehmigten Tierversuchsvorhaben Az. 55.2-1-54-2531-188-09 und Az. 55.2-1-54-2531-184-09:

Im Tierhaltungsbereich des ZNP erfolgt die Haltung und Züchtung der Mäuse unter SPF-Bedingungen, mit geschlossenem Barriersystem (Personalschleuse, Materialschleuse, Durchreichautoklav, Überdruckbelüftung). Die Käfige werden einmal wöchentlich autoklaviert, mit 80°C heißem Wasser gewaschen und anschließend mit 121°C erneut autoklaviert. Die Haltung der Mäuse erfolgt in THKB-M2V-M Polysulfonkäfigen (Typ M II, verlängert) mit max. fünf Tieren pro Käfig. Die Fütterung der Tiere erfolgt ad libitum mit Standardfutter für Labornager (Haltungsfutter V 1536), Wasser (autoklaviertes Leitungswasser) steht den Tieren aus Tränkeflaschen unbegrenzt zur Verfügung. Die Raumtemperatur beträgt 21°C und die Luftfeuchtigkeit 55%±10%. Ein 12h-Zeitschalter für die Beleuchtung im Tag-Nacht-Rhythmus ist vorhanden. Der SPF-Status der Tiere wird regelmäßig mit Hilfe von Sentinel-Mäusen überprüft und wird nach den FELASA Empfehlungen durchgeführt. Der Tierstall ist von der Aufsichtsbehörde abgenommen.

Mit dem Beginn eines jeden Experiments wurden die Tiere in Einzelkäfigen (ausgenommen Tiere aus dem Enriched Environment Experiment) gehalten. Es wurde prinzipiell nach den Grundsätzen des Tierschutzes der Regierung von Oberbayern und des Instituts der Neuropathologie gearbeitet, nach denen die Mäuse möglichst schonend und mit möglichst geringer Schmerzbelastung behandelt wurden.

5.1.2 Tamoxifen-Verabreichung

Tamoxifen wurde in einer Konzentration von 20mg/ml in einer 1:10 Ethanol:Erdnuss-Öl Mischung bei 37°C unter Schütteln gelöst. Zur Induktion der Cre-ER^{T2}-Rekombinase-Aktivität wurde einmal pro Tag Tamoxifen mit einer Dosis von 0,25 mg/g vorsichtig über eine Oralsonde intragastral appliziert^[230]. Die Verabreichung dauerte 5 Tage. Vor jeder Verabreichung wurde das Tier kurz mit Isofluran betäubt.

5.1.3 Pharmakologie

Die in dieser Studie durch pharmakologische GSK-3-Inhibition erlangten Daten wurden durch Anwendung bereits publizierter Protokolle erhoben^[56,78]. Der GSK-3 spezifische Inhibitor AR-A014418 wurde in PEG-300 in einer Konzentration von 8mg/ml gelöst und 1 Mal täglich mit einer Dosierung von 30µM/kg (\approx 9mg/kg) intraperitoneal (i.p.) in die Bauchhöhle appliziert. Die Verabreichung dauerte drei Wochen.

5.1.4 Enriched Environment

Für die sensorische Stimulation wurde ein komplexes Enriched Environment aufgebaut, ähnlich wie es von Sztainberg 2010 beschrieben wurde^[201]. Der Käfig umfasste die Maße 80cm × 50cm × 40cm. Kontrolltiere wurden alleine in Standard-THKB-M2V-M-Käfigen gehalten. Das Enriched Environment wurde mit unterschiedlichen Spielzeugen aus Holz, Papier, Plastik, Metall oder Glas mit unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheit ausgestattet. Leitern, Laufräder und Kreisel boten die Möglichkeit zur physischen Aktivität (siehe Abschnitt 3.11 auf Seite 35). Alle drei Tage wurde der Käfiginhalt neu arrangiert und/oder ausgetauscht. Dem Enriched Environment wurden ausschließlich 5-10 Weibchen ausgesetzt. War die Versuchstier-Kohorte zu klein, dienten Black-6-Mäuse, die später nicht untersucht wurden, als Lückenfüller. Während eines laufenden Experiments wurden keine Tiere in das Enriched Environment ein- oder ausgeführt.

5.1.5 Kraniale Fensterimplantation

Die Implantation des kranialen Fensters leitete sich von den publizierten Protokollen von Holtmaat et al. 2009 und Fuhrmann et al. 2007 ab^[67,94]. In Kürze, nach Möglichkeit innerhalb einer Stunde durchzuführen:

1. Sterilisation von Deckgläschen und OP-Besteck durch Ethanol und Hitze (Hot Bead Sterilizer).
2. Anästhesie durch i.p. injizierte Ketamin/Xylazin-Narkose (0,14mg/g Ketamin, 0,01mg/g Xylazin). Überprüfung durch Zwischenzehreflex.
3. Entzündungshemmung und Beruhigung durch i.p. Injektion von Dexamethason (6µg/g) zusammen mit dem Analgetikum Carprophen (7,5µg/g).
4. Zusatzanästhesie durch Isofluran bei vorzeitigem Aufwachen.
5. Einstellen der Körpertemperatur über eine OP-Heizapparatur.
6. Schutz der Augen vor Austrocknung durch Bedeckung mit Bepanthen Nasen- und Augensalbe.
7. Einspannen in einen Stereotakten (hauseigene Anfertigung).
8. Kopfwäsche mit 70%v/v Ethanol.
9. Entfernung der Kopfhaut unter einem Binokular.
10. Säuberung und Trockenlegung des Schädelknochens mit Skalpell und Tupfer.
11. Markierung des Fensterbereiches durch einen Biopsie-Punch.
12. Schraffierung des Schädelknochens mit Skalpell und überziehen mit Dentalkleber. Der Bereich für das kraniale Fenster wird ausgelassen.
13. Ausdünnen des Schädelknochens entlang der Markierung mit einem Dentalbohrer. Fräsrückstände absaugen.
14. Wenn die Bruchkante sichtbar ist, die Bohrfurche mit sterilem PBS für 5min einweichen.
15. Vorsichtiges Aufhebeln der Kraniotomie und Abziehen des Schädelknochens mit einer Pinzette.
16. Mit ca. 5ml PBS spülen. Blutungen mit hämostatischen Schwamm stillen (Gelfoam).
17. Das Deckgläschen mittels eines Mikromanipulators knapp über die Kraniotomie positionieren und den Spalt mit ca. 15ml sterilem PBS perfundieren. Überschüssiges PBS mit Watteschwämmchen absaugen.
18. Einlassen des Deckglases und mit Dentalzement kreisrund mit dem Schädelknochen verkleben.

19. Einen „Titan-Z-Stift“ (hauseigene Anfertigung) parallel zur Fensterfläche ausrichten und mit Dentalzement einbetten.
20. Nach der Zementtrocknung Subkutan Cefotaxim (0,25mg/g, Pharmore) zur antibiotischen Behandlung verabreichen.
21. Wärmen der Maus für weitere 2-3 Stunden bis zur Erholung von der Anästhesie.
22. Vor dem ersten Mikroskopiezeitpunkt die Kraniotomie für weitere 3-4 Wochen abheilen lassen.

5.1.6 Intravitale Zweiphotonenmikroskopie

Die intravitale Zweiphotonenmikroskopie orientiert sich im Wesentlichen an bereits publizierten Protokollen^[21,67,94,108,110]. Sie wurde an einem aufrechten Axioskop LSM 7MP durchgeführt, welches mit einem Titan-Saphir-Laser bestückt war. Die Anregung erfolgte bei 900nm (6-18%) und das emittierte Licht wurde über ein 20×/1.0 Objektiv, den Hauptstrahlteiler LP690, einen Sperrfilter SP690 und einen Bandpassfilter BP470-550 mit einem GaAsP-Detektor detektiert.

Die Maus wurde mit Isofluran anästhesiert und über einen bei der Kraniotomie eingesetzten „Titan-Z-Stift“ im „Keppler2000“ (hauseigene Anfertigungen) fixiert (Abbildung 5.1A). Zum Schutz der Augen vor Austrocknung wurden diese mit Bepanthen Nasen- und Augensalbe bedeckt. Mit einem Skalpell wurde das Fenster von störenden Verunreinigungen befreit. Die Maushalterung wurde anschließend auf dem x,y-verstellbaren motorisierten Tisch des LSM 7MP Axioskop eingespannt und positioniert (Abbildung 5.1B). Das Auskühlen der Maus wurde durch den Einsatz eines speziell angefertigten Heizpads (siehe Abschnitt 5.4.1 auf Seite 73) unterbunden. Im Epifluoreszenz-Modus ließen sich durch das Okular SlickV-Nervenzellen abbilden, weswegen sie zur späteren Orientierung mit einer Kamera fotografiert wurden (Abbildung 5.1C). Von ausgewählten Regionen wurden über Zwei-Photonen-Anregung Aufnahmen von Dendriten mit den Ausmaßen 70,71µm × 35,29µm × 20µm mit einer Auflösung von 0,138µm/px und einem Einzelbildabstand von 1µm angefertigt. Es wurden nur Schicht 5 Neurone erfasst, deren Zellkörper typischerweise in einer Tiefe von 400-500µm zu sehen waren (Abbildung 5.1D). Die Tiefe der gemessenen kortikalen SlickV-Dendriten, an denen später auch die Daten zu den dendritischen Spines erhoben wurden, belief sich auf ca. 40-80µm. Da innerhalb eines Fensters zwischen einer und drei Zellen gesichtet werden konnten, wurden pro Maus zwischen 5 bis 15 Dendriten mikroskopiert. Sie waren durch die zerstreute Fluoreszenzmarkierung leicht aufzufinden

und auszurichten, deshalb dauerte eine Mikroskopie-Sitzung nicht länger als eine Stunde. Kurze Mikroskopie-Zeiträume und eine konstant niedrige Anregungsenergie (6-18%) sollten phototoxische Effekte minimieren.

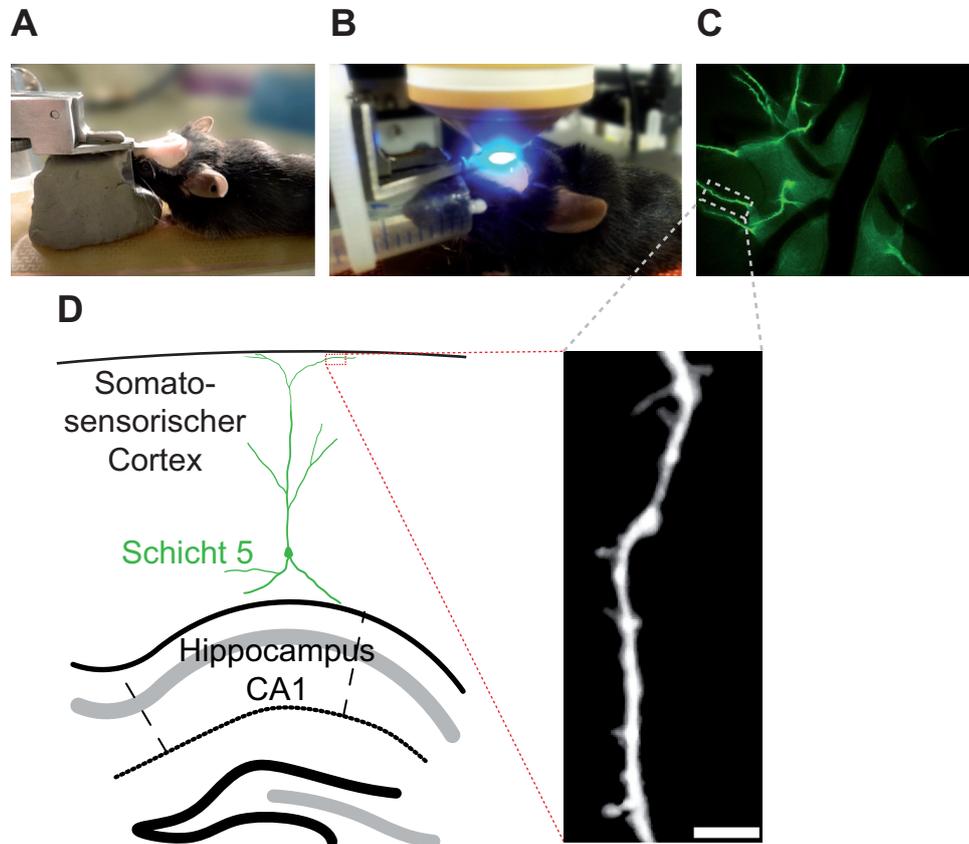


Abbildung 5.1: Intravitale Zweiphotonenmikroskopie von SlickV-Dendriten. (A) Kopf-fixierte Maus im „Keppler2000“ (hauseigene Anfertigung). **(B)** Positionierung des kranialen Fensters am Mikroskop. **(C)** Epifluoreszenzbild eines kranialen Fensters. Grün: YFP-Signal, schwarz: Gefäße. **(D)** Illustration zur Verdeutlichung der aufgenommenen Region und Aufnahme eines apikalen Dendriten eines Schicht 5 SlickV-Neurons.

5.2 Immunhistochemie

5.2.1 Gewinnung fixierter Hirnschnitte

Die Mäuse wurden durch i.p. injizierte Ketamin/Xylazin-Narkose (0,14mg/g Ketamin, 0,01mg/g Xylazin) und Isofluran-Narkose anästhesiert. Nach der Fixierung wurde der Brustkorb geöffnet und das Herz freigelegt. Über eine Flügelkanüle wurde unter dem Druck eines Peristaltikpumpensystems (hauseigene Anfertigung) zunächst für drei Minuten PBS und anschließend für 6 Minuten 4% w/v PFA (4%

w/v Paraformaldehyd in PBS) mit einer Fließgeschwindigkeit von 2ml/min in die linke Herzkammer und damit in den Blutstrom eingeleitet. Die gleichzeitige Öffnung des Herzohrs ermöglichte den Abfluss des Blutes. Nach der Perfusion wurde das Gehirn präpariert und über Nacht bei 4°C nachfixiert und anschließend in PBS bei 4°C gelagert.

Mit einem Vibratom wurden 60µm dicke Koronalschnitte der PFA-fixierten Gehirne angefertigt und bei Raumtemperatur in Multiplatten freischwimmend unter Schütteln gefärbt.

5.2.2 Färbungen

Alle in dieser Studie angewendeten Färbungen basieren auf folgendem Grundprotokoll:

Grundprotokoll	
Permeabilisierung über Nacht	2% v/v Triton-X-100 in PBS
Blockierung über Tag	Blockier-Agenz in PBS
Inkubation	Primärantikörper in Blockier-Agenz
Waschung für 3×15min	PBS
Inkubation für max. 5h	Sekundärantikörper 1:500 in PBS
Waschung für 3×15min	PBS
optional: Inkubation für max. 2h	Rabbit anti GFP Alexa-Fluor 488 in PBS
Waschung für 3×15min	PBS
optional: Inkubation für max. 15min	DAPI-Lösung
optional: Waschung für 3×15min	PBS
Konservierung	Aufziehen auf Objektträger mit Deckglas, Konservierung mit Dako über Nacht und Versiegelung mit Nagellack

β-Catenin Blockier-Agenz: iBlock. Primärantikörper: rabbit anti β-Catenin 1:300 über Nacht. Sekundärantikörper: goat anti rabbit Alexa-Fluor 647.

GFP Zur Gewinnung von Spine-Daten wurden alle Schnitte zur Verstärkung des schwachen intrinsischen YFP-Signals mit Anti-GFP Alexa-Fluor 488 gekop-

pelten Antikörpern nachgefärbt. Blockierung mit iBlock für 3h. Primärantikörper: 1:300 in PBS für 3h.

GSK-3 β Blockier-Agenz: iBlock. Primärantikörper: rabbit anti GSK-3 β 1:100 über Nacht. Sekundärantikörper: goat anti rabbit Alexa-Fluor 647.

MAP1b Blockier-Agenz: iBlock + FAB 1:10. Primärantikörper: mouse anti MAP1b 1:200 in iBlock über Nacht. Sekundärantikörper: goat anti mouse Alexa-Fluor 647.

PSD-95+Synapsin Blockier-Agenz: 10% Normal Goat Serum/PBS + 0,2% Triton-X-100. Primärantikörper: rabbit anti PSD-95 1:500 und mouse anti Synapsin 1:1000 in Blockier-Agenz über Nacht. Sekundärantikörper: goat anti rabbit Alexa-Fluor 647 und goat anti mouse Alexa-Fluor 488.

Synapsin Blockier-Agenz: 10% Normal Goat Serum/PBS + 0,2% Triton-X-100. Primärantikörper: mouse anti Synapsin 1:1000 in Blockier-Agenz über Nacht. Sekundärantikörper: goat anti mouse Alexa-Fluor 647.

Tau-1 Blockier-Agenz: iBlock + FAB 1:10. Primärantikörper: mouse anti Tau-1 1:200 in iBlock über Nacht. Sekundärantikörper: goat anti mouse Alexa-Fluor 647.

5.3 Konfokalmikroskopie

Konfokale Laser-scanning Aufnahmen von dendritischen Spines oder immunhistochemisch prozessierten Schnitten erfolgten an einem inversen Konfokalmikroskop LSM 780. Die Anregung von Alexa-Fluor 488 geschah mit einem Argon-Laser mit 488nm. Alexa-Fluor 647 wurde mit einem Helium-Neon-Laser mit 633nm, DAPI mit einem Dioden-Laser mit 405nm angeregt. Das Emissionslicht wurde über den Strahlenteiler MBS 488/561/633 für Alexa-Fluor 488 und für Alexa-Fluor 647, und über den Strahlenteiler MBS 405/760 für DAPI auf den Spektralteiler gelenkt. Die Detektion erfolgte immer mit multi-track Einstellungen und wurde über Durchblutungs-Tests verifiziert. Bei Dreifachfärbungen fand folgendes Trennmuster Anwendung: Detektor Ch1=DAPI(410nm-585nm), Detektor ChS1=Alexa-Fluor 488(490nm-633nm), Detektor Ch2=Alexa-Fluor 633(638nm-755nm). Bei Zweifachfärbungen wurde folgende Konfiguration verwendet: Detektor Ch1=Alexa-Fluor 488(493nm-630nm), Detektor Ch2=Alexa-Fluor 633(638nm-755nm). Aufnahmen

dendritischer Spines erfolgten mittels eines $40\times/1,4$ Ölimmersionsobjektivs, Übersichtsaufnahmen ganzer Hirnschnitte im tilescan-Modus mit einem $10\times/0,3$ Objektiv. Generell wurde unter Zuhilfenahme des Range-Indicators gearbeitet, um Überbelichtung zu unterbinden.

5.4 IT-Lösungen

5.4.1 Hardwareapplikation *Heizpad*

Um die Labortiere vor thermischer Unterkühlung zu schützen, wurde eine benutzerfreundliche Heizplatte (Heizpad) (Abbildung 5.2C,D) angefertigt. Es ist für die Bedürfnisse des Mikroskops skalierbar und erzeugt keine thermische Ausdehnung im Mikroskopietisch (Abbildung 5.2A,B). Die Leiterplatten-Entwürfe wurden auf Folie gedruckt, auf fotosensitive belichtbare Epoxyd-Leiterplatten plan aufgelegt und mit einer Glasplatte beschwert. Anschließend wurden die Leiterplatten nun für ca. 5min mit einem Abstand von knapp 30cm mit einem Gesichtsbräuner belichtet und in Entwickler-Lösung entwickelt. Die entwickelten Leiterplatten wurden anschließend im Abzug mit Ätzlösung geätzt bis nur noch die Leiterbahnen erhalten waren. Restlack wurde durch Nachbelichtung oder mit Isopropanol entfernt. Die Leiterplatten wurden danach in Zinnbad-Lösung veredelt und anschließend mit Lötack versiegelt. Die Bohrlöcher für die Durchkontaktierung bedrahteter Bauelemente wurden mit einem Platinenbohrer mit 0,8mm-1mm Durchmesser mit einer Fräsmaschine angefertigt. Die Bestückung und Verlötlung der Leiterplatten erfolgte bei $\geq 400^\circ\text{C}$ mit einem Lötssystem und bleifreiem Lötzinn. Für den zukünftigen Nachbau eignet es sich, den PCB-Entwurf direkt an eine Leiterplatten-Manufaktur zu schicken und anfertigen zu lassen. Die Heizwendel wurde zusätzlich in PE-Schlauchfolie eingeschweißt und versiegelt und auf extra-porösem Styropor auf der „Keppler2000“-Maushalterung (hauseigene Anfertigung) untergebracht. Die Mess- und Kontroll-Logik wurde in ein einfaches Halbschalen-Gehäuse eingebaut.

Die programmierbare Mess- und Kontroll-Logik basiert auf einem AVR Mikrocontroller-System, das mit einem Standard 12-15V Labor-Netzteil betrieben wird. Der Schaltkreis an sich wird erst mit der Verbindung der Kontroll-Logik mit der Heizwendel über Pfostenbuchsen und Flachbandkabel mit Spannung versorgt und aktiviert. Ein Spannungswandler beliefert dann den Mikrocontroller und den i^2C -SMD-Temperatursensor auf der Heizwendel mit Logikspannung. Der Mikrocontrol-

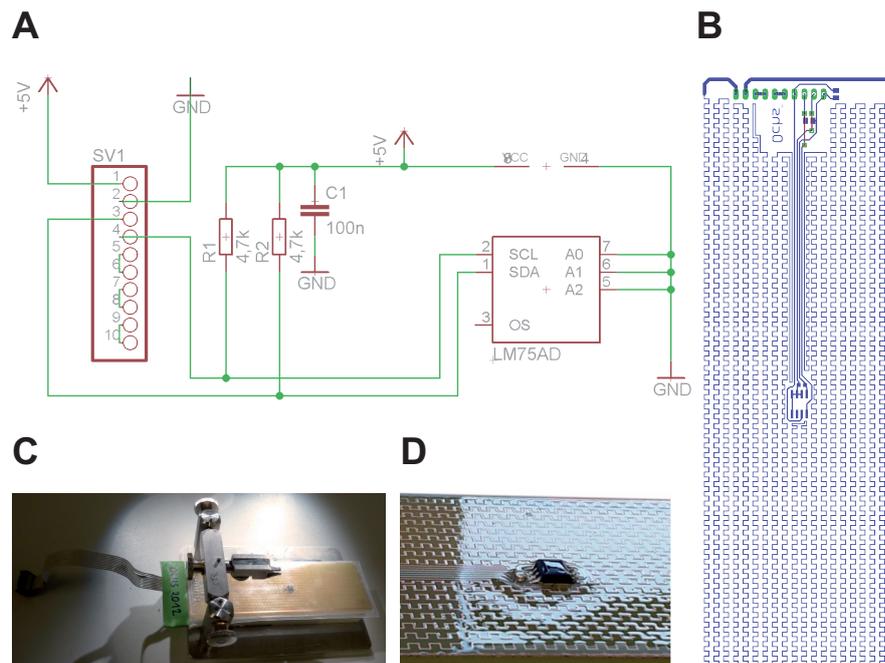
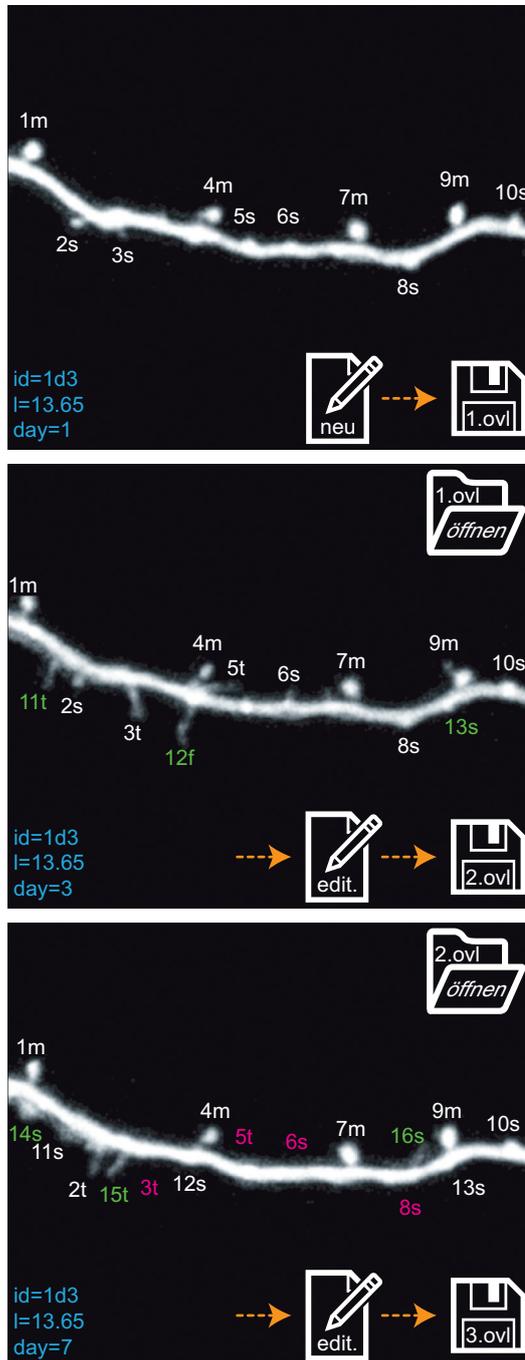


Abbildung 5.2: Skalierbares Heiz-System für die intravitale Mikroskopie. (A) Schaltkreis des Heizpads ohne Kontrolllogik. (B) PCB-Entwurf von (A). (C) Heizwendel und kalibrierter I²C-SMD-Temperatursensor LM75. (D) Unterbringung des Heizpads auf dem „Keppler2000“ (haus eigene Anfertigung).

ler wurde in hardwarenahem C zu einem simplen Differenzialregler programmiert. Eine Ausarbeitung komplexer Integral- und Proportional-Anteile war nicht notwendig, da die hohe Trägheit (und damit verbunden hohe Dilatationszeiten) der Regelstrecke keine derart exakten Betriebsmodi erforderte. Die Soll-Temperatur und das Intervall der Temperaturabtastung ist im Quelltext frei definierbar. Die Stellgröße wird durch das Setzen und Löschen eines Logikpegels an einem Hochleistungstransistor kontrolliert, was zu einer sofortigen Be-/Entlastung der Heizwendel mit Versorgungsspannung führt. Die Messgröße wird digital von dem auf der Heizwendel untergebrachten I²C-Temperatursensor erfasst. Soll- und Ist-Werte werden auf einer 2 × 16 Punktmatrix Flüssigkristall-Anzeige bereitgestellt.

Die elektrischen Schaltkreise und das Platinen-Layout wurden mit Eagle 5.6.0 erstellt. Der C-Quelltext wurde mit dem freien Editor PSPad geschrieben und mit WinAVR und AVR Studio in Hexadezimal-Tabellen übersetzt. Als externe Quellen dienten die i2cmaster- und LCD-Bibliotheken von Peter Fleury. Die Übertragung des Programms gelang über einen AVR-Programmierer mit Avrdude über die serielle Schnittstelle des Computers. Detaillierte Schaltpläne, Layouts sowie der Programmquelltext für die Applikation befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

5.4.2 Softwareapplikation *SpineMiner(XT)*



Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Verfahren ausgearbeitet, mit dem *in vivo* mikroskopisch aufgenommene Dendriten und Spines mit der Hälfte der bisher veranschlagten Zeit ausgewertet werden können. Das numerische benutzerfreundliche Spine-Zählwerk *SpineMiner* ist eine Kreuz-Plattform kompilierbare ISO C++-Anwendung mit Anbindung an eine eingebettete SQL-Datenbank. Es erfasst nach einem speziell definierten Protokoll die in die Bild-Stapel eingefügten und abgespeicherten Annotationen (OVLs) und transcodiert diese Informationen in die Datenbank. Nach der Erfassung werden die Eingaben überprüft und bei Korrektheit weiter analysiert.

Die Spines werden in den 3D-Bildstapeln nach folgendem Protokoll annotiert: Der Bildstapel wird in die ZEN2009 Software geladen und dort mit Text-Boxen aus den Overlay-Optionen beschriftet: id=X (Farbe #4, blau) ist die Zuweisung einer ID zu einem Dendriten. X bleibt für jeden Dendriten während der gesamten Imaging-

Sitzung konstant und kann folgende Zeichen enthalten: a-z A-Z 0-9. l=Y (Farbe #4, blau) ist die Zuweisung der Dendriten-Länge. Nachkommastellen werden mit einem Punkt getrennt (also YY.YY). Die Länge bleibt in der Regel konstant. day=Z (Farbe #4, blau) beschreibt den aktuellen Imaging-Zeitpunkt. Diese müssen nicht

notwendigerweise Tage sein. Z ist ganzzahlig und muss mit einer Zahl > 0 beginnen. Nun werden die Spines annotiert. Zum ersten Zeitpunkt erhalten alle Spines die Farbe #1, weiß. Diese Farbe repräsentiert stable Spines. Jedem Spine wird dabei eine einzigartige ID zugewiesen, die numerisch sein muss. Wenn Spine-Morphologien mitberücksichtigt werden sollen, muss hinter jede ID noch ein Morphologie-Tag angehängt werden. „m“ steht dabei für mushroom, „s“ für stubby, „t“ für thin und „f“ für filopodium. Es ist wichtig, dass die Entscheidung, ob Morphologien von Interesse sind, **vor Beginn der Auswertung** getroffen wird, da die Applikation nicht mit Mixturen arbeiten kann. Es wird an dieser Stelle empfohlen, Morphologie-Tags immer zu verwenden.

Ist die Annotation komplett, wird das Overlay gespeichert. Daraufhin öffnet man den nächsten Imaging-Zeitpunkt und das zuvor gespeicherte Overlay. Danach muss zuerst die day-Annotation auf den nächsten Zeitpunkt angepasst werden. Im Anschluss werden alle Spines überarbeitet. Ist ein Spine neu entstanden, so wird er mit einer neuen einzigartigen ID gekennzeichnet, die die Farbe #2, grün erhält. Verloren gegangene Spines erhalten dagegen die Farbe #3, rot. Wenn sich die Spine-Morphologien im Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt geändert haben, müssen diese ebenfalls angepasst werden. Das Overlay kann nun unter einem neuen Namen gespeichert und für den nächsten Imaging-Zeitpunkt geöffnet und wieder angepasst werden. Auf diese Weise werden alle Bildstapel sukzessive prozessiert.

Sind alle Annotationen abgeschlossen, werden nun die OVL-Dateien durch den Aufruf von `spineminer.exe` in der Kommandozeile eingelesen. Alle Programmaufrufe aus der Kommandozeile beziehen sich auf das aktuelle Arbeitsverzeichnis, in der `spineminer.exe` liegt. Folgende Programmaufrufe werden derzeit erkannt:

Programmaufrufe		
Aufruf	Argument	Bedeutung
<code>spineminer.exe</code>		Überprüft alle OVL-Dateien auf korrekte Annotation.
<code>spineminer.exe</code> <code>-w:<datei></code>		Transcodiert Annotationen in OVL-Dateien in eine durch <datei> spezifizierte Datenbankdatei.
<code>spineminer.exe</code> <code>-w:<datei></code>	<code>-ignoremorphologies</code>	Diese Option ist zu verwenden, wenn keine Spine-Morphologie-Tags verwendet wurden.
<code>spineminer.exe</code> <code>-w:<datei></code>	<code>-nofilopodia</code>	Filopodium-ähnliche Spines werden wie thin-ähnliche behandelt.
<code>spineminer.exe</code> <code>-r:<datei></code>		Öffnet die Datenbank und überprüft die Datenbankintegrität.

spineminer.exe -r:<datei>	-calcsurvival:<zp>	Neuberechnung des Spine-Überlebens unter der Benutzung von <zp> als Start-Zeitpunkt. (Standard = 1)
spineminer.exe -r:<datei>	-calcnewgained:<zp>	Neuberechnung des Spine-Überlebens von Spines, die zum Zeitpunkt <zp> entstanden sind. (Standard = 2)
spineminer.exe -r:<datei>	-calctransients:<lz>	Neudetektion transienter Spines. Transient sind jene, die eine Mindestlebenszeit von <lz> haben. (Standard ≤ 8)
spineminer.exe -r:<datei>	-survival:<dendrit-id>	Minimal-Überlebenskurve eines durch <dendrit-id> spezifizierten Dendriten.
spineminer.exe -r:<datei>	-trace:<dendrit-id>, <spine-id>	Verfolgt und stellt das Schicksal eines durch <dendrit-id> und <spine-id> spezifizierten Spines dar.
spineminer.exe -r:<datei>	-check	Testet Datenbankintegrität.
spineminer.exe -r:<datei>	-tor:<dendrit-id>	Zeigt die tägliche Spine-Durchsatzrate eines mit <dendrit-id> spezifizierten Dendriten.
spineminer.exe -r:<datei>	-dbscan:<dendrit-id>, ϵ, μ	Berechnet ein dichte-basiertes Clustering für einen durch <dendrit-id> spezifizierten Dendriten. Wird * verwendet, gilt die Berechnung für alle Dendriten. Der Algorithmus erwartet ϵ als Dichteradius und μ für die Minimalanzahl von Clusterpunkten.
spineminer.exe -r:<datei>	-quickdbscan	Berechnung eines dichte-basierten Clusterings für alle Dendriten. Der Dichteradius wird automatisch ermittelt, die Minimalanzahl von Clusterpunkten wird mit 4 angenommen.
spineminer.exe -r:<datei>	-pipe:<sqldatei>	Stapelverarbeitung von SQL-Befehlen, die in der Datei <sqldatei> hinterlegt sind. Die Resultate werden in <sqldatei>.result.txt gespeichert.
spineminer.exe -q:<datei>		Öffnet eine SQL-Sitzung zur durch <datei> spezifizierten Datenbank, um Eingaben zu bearbeiten. Die Sitzung wird mit der Eingabe von !q beendet.
spineminer.exe -c:<datei>		Erstellt ein für Microsoft Excel lesbares CSV-Dateiformat der durch <datei> angegebenen Datenbank mitsamt den Analyseergebnissen.
spineminer.exe -replace	<finde>,<ersetze>	Ersetzt in allen OVL-Dateien die Zeichenkette, die in <finde> angegeben ist mit der Zeichenkette, die durch <ersetze> bestimmt ist. Warnung: diese Funktion hat β -Status und kann Daten-Korruption zur Folge haben.

Beim Erstellen einer neuen Datenbank (Aufruf `-w:`) werden nach dem Einspeisen der Annotationen die Daten automatisch weiter analysiert und die Analyseergebnisse zurückgeschrieben. Der komplette Funktionsumfang und die Algorithmik von SpineMiner sind in der angehängten Abbildung 7.5 auf Seite 118 dargestellt. Im Kern handelt es sich um folgenden Programmablauf:

1. Einlesen der Annotationen in die Datenbank. Es werden „virtuelle Neurone“ erstellt.

2. Berechnung der Spine-Dichte, Fraktionen entstandener, verlorengegangener und stabiler Spines.
3. Detektion transienter Spines.
4. Detektion von Spines, die am gleichen Ort wieder entstanden sind.
5. Berechnung der täglichen Spine-Umsatzrate (dTOR).
6. Berechnung der Minimaldistanzen und des dichte-basierten Clusterings neu entstandener Spines.
7. Berechnung des Spine-Überlebens und des Überlebens neu entstandener Spines.
8. Berechnung morphologieabhängiger Spine-Kinetiken.
9. Überprüfung der Datenbankintegrität.

Die Analysenergebnisse lassen sich in ein lesbares CSV-Datenformat exportieren (Aufruf `-c`:). Dabei werden folgende Datenbestände generiert (beliebig erweiterbar):

Datensätze		
Spine-Dichte	Überlebensfraktion	Überlebensfraktion neu entstandener Spines
dTOR	Transienten-Dichte	Transienten-Fraktion
Persistenten-Dichte	Persistenten-Fraktion	Fraktion/Dichte entstandener Spines
Fraktion/Dichte stabiler Spines	Fraktion/Dichte verlorener Spines	Formänderfrequenz
Dichte f-, m-, t-, s- Spines	Dichte persistenter f-, m-, t-, s- Spines	Dichte transienter f-, m-, t-, s- Spines
Dichte entstandener f-, m-, t-, s- Spines	Dichte stabiler f-, m-, t-, s- Spines	Dichte verlorener f-, m-, t-, s- Spines
Dichte entstandener persistenter f-, m-, t-, s- Spines	Dichte stabiler persistenter f-, m-, t-, s- Spines	Dichte verlorener persistenter f-, m-, t-, s- Spines
Dichte entstandener transienter f-, m-, t-, s- Spines	Dichte stabiler transienter f-, m-, t-, s- Spines	Dichte verlorener transienter f-, m-, t-, s- Spines
Wiederentstandene Spines Verhältnis Wiederentstandener/entstandener Spines	Dichte wiederentstandener Spines Latenzzeiten wiederentstandener Spines	Fraktion wiederentstandener Spines Lebenszeiten wiederentstandener Spines
Morphologiekontingenz wiederentstandener Spines	Minimaldistanzen zwischen entstandenen Spines	Cluster entstandener Spines

Durch die Anweisung `-pipe` kann das Programm mit beliebigen, selbst geschriebenen Erweiterungen zur Datenbank-Manipulation erweitert werden. Alle Ausgaben des Programms werden generell in ein lokal gelegenes Logbuch „log.txt“ abgespeichert.

Da die Arbeit an der Kommandozeile aufwendig ist, wurde eine benutzerfreundliche Windows-Oberfläche (SpineMinerXT, XT für Extension (Programmerweite-

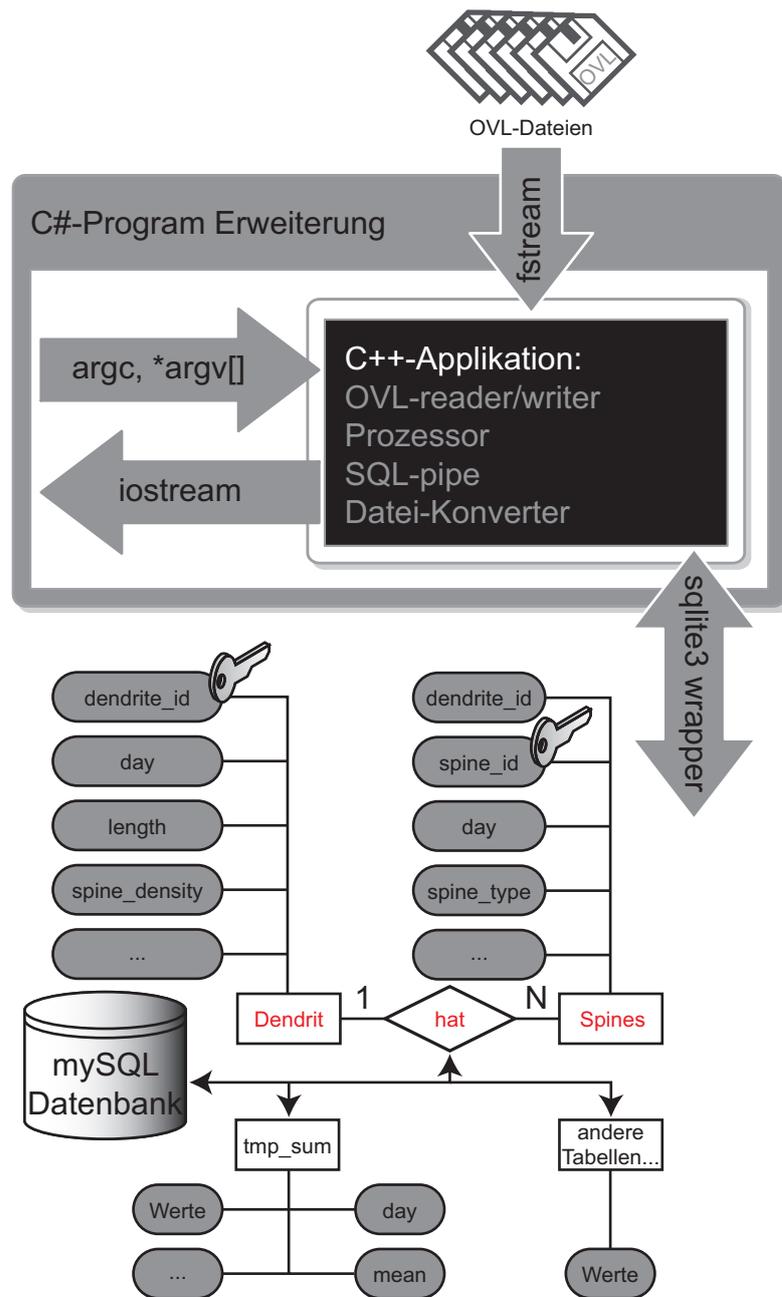


Abbildung 5.3: Modell von SpineMiner und SpineMinerXT. Die intern verwaltete Datenbank folgt einer 1:N-Relation: ein Dendrit kann mehrere Spines haben, jeder Spine aber nur einem Dendriten angehören.

rung)) entwickelt. Diese Oberfläche basiert auf C# und arbeitet mit dem .NET-Framework 4 oder höher. In der Oberfläche können ebenfalls die wichtigsten Parameter, die SpineMiner sonst per Kommandozeile erwartet, individuell eingestellt werden. SpineMinerXT für Windows bettet SpineMiner ein und extrahiert es beim Programmstart. SpineMiner wiederum bettet den Kern-Prozessor ein, der die Datenbank intern nach einer simplen 1:N Entitäten-Relation bedient (Abbildung 5.3). SpineMinerXT kann sich selbst updaten, wenn auf dem im Programmquelltext hin-

terlegten Webserver die neueste Version hochgeladen wird. Dazu muss die neue Anwendung das Format „spineMinerXT_X.XX.exe“ haben, wobei X.XX für die Versionsnummer steht (z.B. 1.23). Diese Versionsnummer muss entsprechend auf dem Webserver in der Datei „curr_vers.txt“ hinterlegt sein.

SpineMiner wurde mit Code::Blocks 12.11 erstellt und ist mit dem mitgelieferten MinGW-Compiler 4.7 kompilierbar. Als externe Quellen wurden die CImg-, kdTree- und sqlite3- Bibliotheken mit eingebunden. Linker optionen: -gdi32. SpineMinerXT wurde mit Microsoft Visual Studio 2010 Ultimate erstellt, die eingebundenen Bildressourcen mit Microsoft Visio 2007 und Adobe CS4. SpineMiner umfasst ca. 6000 Zeilen, SpineMinerXT etwa 600 Zeilen Quelltext. Im Anhang finden sich Hinweise zum Veröffentlichungsort der Open-Source-Projekte.

5.4.3 Generelle Bildprozessierung

Zu Abbildungszwecken wurden die Aufnahmen dendritischer Spines zunächst mit Imaris in den Image-Cytometry-Standard umgewandelt und dann mit AutoQuant dekonvoliert, um Hintergrundrauschen zu entfernen. Zur Dekonvolution wurde die sphärische Abberation automatisch detektiert und 10 Iterationen mit maximalem Rauschanteil festgelegt. Die Kontrastanpassung und Entfernung störender Elemente erfolgte mit Adobe CS4.

5.4.4 Spine-Dichte-Analyse

Für jeden Datensatz wurde der Mittelwert über alle Dendriten pro Maus in Prism5 übertragen. Somit zeigen die Graphen aus Prism5 Mittelwerte von Mittelwerten.

5.4.4.1 *in vivo*

Die *in vivo* Bildstapel aus der intravitalem Zweiphotonenmikroskopie wurden nach dem im vorherigen Abschnitt definierten Annotations-Protokoll mit der ZEN 2009 Software bearbeitet und ausgewertet (siehe auch Abschnitt 5.4.2 „Softwareapplikation *SpineMiner(XT)*“ auf Seite 75). Die Darstellung und statistische Analyse der Daten erfolgte mit Adobe CS4 bzw. Prism5.

5.4.4.2 *ex vivo*

Die Hirnschnitte wurden vor der Konfokalmikroskopie mit einem gegen GFP gerichteten und Alexa-Fluor 488 gekoppelten Antikörper immunhistochemisch gefärbt, um das schwache intrinsische YFP-Signal zu verstärken (siehe auch Abschnitt 5.2.2 „Färbungen“ auf Seite 71). Zur Detektion einer regionalen Abhängigkeit des Effekts wurden dendritische Spines von hippocampalen CA1, Schicht 3 und Schicht 5 Neuronen, jeweils entlang apikaler und basaler Dendriten zweiter Ordnung analysiert (siehe auch Abschnitt 3.3 „GSK-3 β -Knockout reduziert dendritische Spine-Dichten“ auf Seite 24). Die Dendritenabschnitte sollten dabei mindestens die doppelte Breite des Zellkörpers vom Hauptschaft entfernt sein. Die Auszählung erfolgte im LSM Image Browser durch manuelles Markieren der einzelnen Spines, während durch den dreidimensionalen Bildstapel durchgerollt wurde. Die Anzahl der Spines geteilt durch die Länge des gezählten Abschnitts entspricht der Spine-Dichte. Für gezählte Dendriten-Abschnitte, die sich mit mehr als 10 μ m in die Tiefe erstreckten, wurde die Dendriten-Länge nach dem Satz des Pythagoras korrigiert. Die Auswertung der Daten geschah mit Prism5.

5.4.5 Morphologieanalysen

Zur Morphologieanalyse wurden dekonvolvierte Dendritenabschnitte in Imaris geladen. Die Filamente und einzelnen Spines mussten anschließend manuell nachgezeichnet und die Oberfläche ausgehend von den Bilddaten gerendert werden. Danach wurde ein in MatLab implementierter und angepasster Algorithmus über die in Imaris vorhandene Java-Brücke gestartet und ausgeführt. Der Algorithmus wurde nach den im Abschnitt 3.8 des Ergebnisteils (siehe auch Abschnitt 3.8 „GSK-3 β -Knockout verändert Spine-Morphologien“ auf Seite 30) beschriebenen Parametern angepasst. Die Klassifizierung lieferte im Anschluss Daten zu allen Dendriten, die in Prism5 übertragen und ausgewertet wurden.

5.4.6 Quantifizierung Immunhistochemischer Daten

5.4.6.1 Tau

Die Quantifizierung immunhistochemischer Konfokalbilder aus einer Tau-Färbung erfolgte mittels eines Skriptsatzes, der von meinem Kollegen Dr. Mario Dorostkar

ausgearbeitet wurde. Im Wesentlichen handelt es sich dabei um folgende Schritte:

1. Setzen eines Schwellenwerts im YFP-Kanal.
2. Die dadurch erzeugten Flächen entsprechen dann ausgehend vom YFP einer binären Maske.
3. Integration des Tau-Signals innerhalb und außerhalb der Maske.
4. Division der Werte erzeugt das Verhältnis zwischen innerhalb und außerhalb der Zelle und gibt damit Aufschluss über die Verteilung des Proteins.

Die Resultate wurden anschließend mit Prism5 analysiert.

5.4.6.2 Synapsin/PSD-95

Die Punktdetektion für Synapsin und PSD-95 erfolgte nach einem ähnlichen Protokoll, das von Dr. Mario Dorostkar publiziert wurde^[53]:

1. Dekonvolution der Bilder.
2. Laplace-Operation: $\nabla^2 I = \frac{\partial^2 I}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 I}{\partial y^2}$
3. Schwellenwert-Operation: $\Theta(x) : \mathbb{R} \rightarrow \{0, 1\} \quad x \mapsto \begin{cases} 0 : x < 2\sigma_X \\ 1 : x \geq 2\sigma_X \end{cases}$
4. Zuordnung der erzeugten Binär-Flächen zu ROIs.
5. Massenmittelpunkt-Bestimmung für jedes ROI: $\vec{R}_i = \frac{\sum (\vec{r}_i \times m_i)}{\sum m_i}$
6. Jeder Massenmittelpunkt entspricht einer Prä- oder Postsynapse. Über die Fläche erhält man die Synapsen-Dichte.

Die Resultate wurden anschließend mit Prism5 analysiert.

5.4.6.3 Synapsin/YFP-Distanz

Die Präsynapsen-Detektion in Abhängigkeit von der Distanz zum Dendriten erfolgte nach einem IgorPro Skriptsatz, der von Dr. Mario Dorostkar ausgearbeitet wurde:

1. Dekonvolution der Bilder.
2. Synapsen-Detektion wie im vorigen Unterabschnitt beschrieben.
3. Distanztransformation zum YFP-Signal.
4. Segmentierung in μm -Abstände.
5. Synapsen-Dichte-Bestimmung innerhalb der Segmente.

Die Resultate wurden anschließend mit Prism5 analysiert.

5.4.6.4 MAP1b

Um zu zeigen, dass das MAP1b-Protein sich vom proximalen Dendriten in Richtung Zellkörper verlagert, wurden manuell mit dem LSM Image Browser Bereiche definiert. Diese Bereiche schließen den Zellkörper (ohne Zellkern) oder nur den proximalen Dendritenschaft ein. Die Integration der Flächen und das Verhältnis der Werte ergaben Aufschluss über die Umverteilung des Proteins (siehe auch Abschnitt 3.13.1 „Sondierung putativer GSK-3 β -Mediatoren“ auf Seite 41). Die Resultate wurden mit Prism5 ausgewertet.

5.5 Elektrophysiologie

Zunächst wurden ca. 8-9 Wochen alte Tiere anästhesiert (siehe auch Abschnitt 5.2.1 „Gewinnung fixierter Hirnschnitte“ auf Seite 70), danach enthauptet und das Gehirn in eiskalte Schneide-Lösung überführt. Mit einem Vibratom wurden 200 μ m dicke Koronalschnitte erzeugt und für 30min in 34°C warme Schneide-Lösung eingelegt. Danach wurden sie für mindestens eine Stunde auf Raumtemperatur gehalten. Die Patch-Pipetten wurden aus Borosilikat-Rohlingen mit einem End-Widerstand von 3-4M Ω gezogen und mit Pipetten-Lösung befüllt. mEPSCs wurden unter dem Mikroskop von fluoreszierenden (und somit transgenen) hippocampalen CA1-Pyramidal-Neuronen von akuten Hirnschnitten abgeleitet. Als Kontrolle dienten benachbarte, nicht fluoreszierende Neurone. Der Patch-Vorgang fand bei 70mV in Patch-Lösung in Anwesenheit von 1 μ M Bicucullin, 1 μ M Strychnin und 0,5 μ M Tetrodotoxin statt. Zur Aufnahme der Spuren wurde ein EPC10 USB Patch-Clamp Verstärker unter der Kontrolle der PatchMaster Software verwendet, und die mEPSC-Ereignisse mit der MiniAnalysis Software detektiert. Diese Experimente wurden von Dr. Gayane Aramuni durchgeführt und mit freundlicher Genehmigung in diese Arbeit aufgenommen.

5.6 Statistik

Alle Statistiken wurden mit Prism5 berechnet. Vergleiche von Spine-Dichten zwischen zwei Gruppen unterlagen dem ungepaarten, zweiseitigen t-Test unter An-

nahme einer Normalverteilung der Daten. Diese Annahme stützt sich auf dem Central-Limit-Theorem, da die Spine-Dichten aus Mittelwerten von Mittelwerten jeder Maus berechnet wurden. Für Mehrfach-Vergleiche wurde der Einweg ANOVA mit Bonferronis Post-Hoc-Test herangezogen. Vergleiche zwischen Kohorten bei Intravital-Zeitserien wurden über Zweiweg ANOVA Tests angestellt. Zum Vergleich zwischen verschiedenen Kurven-Fits wurde der F-Test angewendet. Kontingenzdaten aus Morphologie-Analysen wurden über χ^2 -Tests verglichen. Die Elektrophysiologie-Daten wurden zum Vergleich nicht-parametrischer Mann-Whitney-Tests unterzogen. Die Varianz ist in der gesamten Arbeit als Standardabweichung angegeben.

5.7 Mausmodelle

5.7.1 SlickV

Originalname: B6;SJL-Tg(Thy1-cre/ERT2,-EYFP)VGfng/J

Beschaffung: Jackson Laboratory (<http://jaxmice.jax.org/>) unter der Stock-Number #007610.

Kurzinformation: Das Mausmodell wurde von Young et al. 2008 generiert und vollständig charakterisiert^[230]. Die Mäuse bilden zufällig und vereinzelt in Nervenzellen in den Schichten 2/3 und 5 des somatosensorischen Kortex und im Hippocampus YFP zusammen mit der Tamoxifen induzierbaren Cre-ERT²-Rekombinase (siehe auch Abschnitt 3.1 „Die GSK-3 β ^{LoxP(EX2)} \times SlickV-Mauslinie“ auf Seite 21). Das SlickV Transgen alleine hat keine Auswirkung auf die Physiologie der betroffenen Zellen. Heterozygotie des Transgens genügt, um einen Cre-ERT²-medierten Knockout erfolgreich durchzuführen.

Zu beachten: Bei homozygoter Linienführung wurde nach 2-3 Generationen ein Zuchtstopp beobachtet. Das Problem wurde durch Verpaarungen mit BL/6-Tieren behoben. Keimbahn-Rekombination bewirkte in seltenen Fällen negative PCR-Resultate obwohl alle Verwandten homozygot positiv waren.

Genotypisierung: Die genomische DNA wurde aus Mausschwanzbiopsien mittels des pegGold Tissue DNA Mini Kits entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert. Folgendes Protokoll wurde für die Genotypisierung durch Polymerase-Kettenreaktion verwendet:

Primertabelle		
Name	5'-Sequenz	
IMR7303	TCTGAGTGGCAAAGGACCTTAGG	
IMR8744	CAAATGTTGCTTGTCTGGTG	
IMR8745	GTCAGTCGAGTGCACAGTTT	
IMR9296	CGCTGAACTTGTGGCCGTTTACG	

Reaktionsansatz		PCR-Programm		
Komponente	Menge	T / °C	t / sec	Zyklen
<i>ddH₂O</i>	10,6µl	94	180	
5' Mastermix	10µl	94	30	
10µM IMR7303	1µl	61	60	35
10µM IMR9296	1µl	72	45	
10µM IMR8744	0,7µl	72	60	
10µM IMR8745	0,7µl	10	∞	
DNA	1µl	Auftrag auf 1,5% w/v Agarose-Gel		

Bestimmungstabelle für 1,5% w/v Agarose-Gel		
200bp (Interleukin)	300bp (YFP)	Genotyp
positiv	negativ	SlickV ^{+/+}
positiv	stark positiv	SlickV ^{T/?}

5.7.2 GSK-3 β ^{LoxP(EX2)}

Originalname: B6/129;GSK3b-LoxP(EX2) (extrapolierter Name)

Beschaffung: Ein freundliches Geschenk von Prof. Fred van Leuven, Experimentelle Genetik der KU Leuven (<http://med.kuleuven.be/legtegg/>) im Rahmen des *neuro.GSK3*-Konsortiums.

Kurzinformation: Das Mausmodell wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Fred van Leuven generiert. Es handelt sich hierbei um einen Knock-In, bei dem das Exon 2 des GSK-3 β -Gens mit LoxP-Stellen für die Cre-medierte Rekombination flankiert wurde. Die Deletion des Exon 2 aus GSK-3 β führt zur GSK-3 β -Defizienz in der gesamten Zelle. Die LoxP-Mutationen hatten keinerlei Auswirkungen auf die Tierphysiologie. Die Mauslinie ist *per-se* nicht publiziert worden. Für die GSK-3 β -Knockout-Experimente wurde die Linie mit SlickV verkreuzt.

Zu beachten: Die Linie hatte ursprünglich BL/6 und 129-white Mischhintergrund, die Kreuzung GSK-3 β ^{LoxP(EX2)} × SlickV ist durch die mehrfache Einkreuzung von SlickV inzwischen auf BL/6 Hintergrund zu führen.

Genotypisierung: Die genomische DNA wurde aus Mausschwanzbiopsien mittels des pegGold Tissue DNA Mini Kits entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert. Folgendes Protokoll wurde für die Genotypisierung durch Polymerase-Kettenreaktion verwendet:

Primertabelle			
Name		5'-Sequenz	
NE1095		CGAAAGTGATTGAAATGGAT	
NE1053		TCTGGGCTATAGCTATCTAGTAACG	

Reaktionsansatz		PCR-Programm		
Komponente	Menge	T / °C	t / sec	Zyklen
<i>ddH₂O</i>	6µl	98	10	
Phusion Mastermix	10µl	98	2	35
10µM NE1095	1µl	54	5	
10µM NE1053	1µl	72	7	
10ng/µl DNA	1µl	72	60	
100% DMSO	1µl	4	∞	
Auftrag auf 1,5% w/v Agarose-Gel				

Bestimmungstabelle für 1,5% w/v Agarose-Gel			
200bp	300bp	500bp	Genotyp
negativ	negativ	positiv	GSK-3β ^{LoxP/LoxP}
negativ	positiv	negativ	GSK-3β ^{+/+}
negativ	positiv	positiv	GSK-3β ^{LoxP/+}
positiv	negativ	negativ	GSK-3β ^{-/-}

5.7.3 *catnb*^{LoxP(EX3)}

Originalname: B6;*catnb*-LoxP(EX3) (extrapolierter Name)

Beschaffung: Im Rahmen eines Materialien-Transfer-Abkommens, von Prof. Makoto M. Taketo vom Institut für Pharmakologie der Universität Kyoto erhalten (<http://www4.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>).

Kurzinformation: Das Mausmodell wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Makoto M. Taketo generiert. Es handelt sich hierbei um einen Knock-In, bei dem das Exon 3 des β-Catenin-Gens mit LoxP-Stellen für die Cre-medierte Rekombination flankiert wurde. Die Deletion des Exon 3 aus β-Catenin führt zur β-Catenin-Stabilisierung in der gesamten Zelle. Die Funktion als Transkriptionsfaktor bleibt unverändert. Die LoxP-Mutationen hatten keinerlei Auswirkungen auf die Tierphysiologie. Die Mauslinie wurde von Harada et al. 1999 charakterisiert^[82]. Für die β-Catenin-Stabilisierungs-Experimente wurde die Linie mit SlickV verkreuzt.

Zu beachten: Die Mauslinie züchtet am besten auf Heterozygotie.

Genotypisierung: Die genomische DNA wurde aus Mausschwanzbiopsien mittels des pegGold Tissue DNA Mini Kits entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert. Folgendes Protokoll wurde für die Genotypisierung durch Polymerase-Kettenreaktion verwendet:

Primertabelle		
Name	5'-Sequenz	
mbCatFw	CGTGGACAATGGCTACTCAA	
mbCatRv	TGTCCAACTCCATCAGGTCA	

Reaktionsansatz		PCR-Programm		
Komponente	Menge	T / °C	t / sec	Zyklen
<i>ddH₂O</i>	9,6µl	94	180	
5' Mastermix	10µl	94	30	
20µM mbCatFw	1µl	60	60	35
20µM mbCatRv	1µl	72	30	
DNA	2µl	72	120	
		6	∞	
Auftrag auf 1,5% w/v Agarose-Gel				

Bestimmungstabelle für 1,5% w/v Agarose-Gel		
330bp	500bp	Genotyp
positiv	negativ	catnb ^{+/+}
negativ	positiv	catnb ^{LoxP/loxP}

5.7.4 GFP-M

Originalname: B6/Cg-Tg(Thy1-EGFP)MJrs/J

Beschaffung: Jackson Laboratory (<http://jaxmice.jax.org/>) unter der Stock-Number #007788.

Kurzinformation: Transgene Mauslinie, die eGFP (enhanced GFP) in Neurone des Hippocampus, und den kortikalen Schichten 2/3 und 5 unter der Kontrolle des Thy-1-Promotors ausbildet. Das Transgen hatte keinerlei Auswirkungen auf die Tierphysiologie.

Zu beachten: Zucht auf Heterozygotie vollkommen ausreichend.

Genotypisierung: Die genomische DNA wurde aus Mausschwanzbiopsien mittels des pegGold Tissue DNA Mini Kits entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert. Folgendes Protokoll wurde für die Genotypisierung durch Polymerase-Kettenreaktion verwendet:

Primertabelle		
Name	5'-Sequenz	
IMR0872	AAGTTCATCTGCACCACCG	
IMR1416	TCCTTGAAGAAGATGGTGCG	

Reaktionsansatz		PCR-Programm		
Komponente	Menge	T / °C	t / sec	Zyklen
<i>ddH₂O</i>	11,2µl	94	90	
Hot Mastermix	10µl	94	30	
20µM IMR0872	0,6µl	60	60	35
20µM IMR1416	0,6µl	72	60	
DNA	2µl	72	120	
		6	∞	
Auftrag auf 1,5% w/v Agarose-Gel				

Bestimmungstabelle für 1,5% w/v Agarose-Gel	
173bp	Genotyp
positiv	eGFP-M ^{T/?}
negativ	eGFP-M ^{+/+}

5.7.5 BACE1-Knockout

Originalname: B6/129;Bace^{tm1Pcw/J}

Beschaffung: Jackson Laboratory (<http://jaxmice.jax.org/>) unter der Stock-Number #004714.

Kurzinformation: Das Mausmodell wurde von Cai et al. 2001 generiert und beschrieben^[22]. In dieser Mauslinie fehlt das Exon 1 des BACE1-Gens, was zum vollständigen Verlust der Genexpression führt. Für mikroskopische Untersuchungen wurde über mehrere Generationen GFP-M eingekreuzt, so dass die Linie fortan auf BL/6 Hintergrund geführt wird. Der Knockout hatte keinerlei Auswirkungen auf die Tierphysiologie.

Zu beachten: Zucht auf Homozygotie für BACE1-Knockout.

Genotypisierung: Die genomische DNA wurde aus Mausschwanzbiopsien mittels des pegGold Tissue DNA Mini Kits entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert. Folgendes Protokoll wurde für die Genotypisierung durch Polymerase-Kettenreaktion verwendet:

Primertabelle		
Name	5'-Sequenz	
IMR3169	AGGCAGCTTTGTGGAGATGGTG	
IMR3170	CGGGAAATGGAAAGGCTACTCC	
IMR3171	TGGATGTGGAATGTGTGCGAG	

Reaktionsansatz		PCR-Programm		
Komponente	Menge	T / °C	t / sec	Zyklen
<i>ddH₂O</i>	9,6µl	94	180	
5' Mastermix	10µl	94	30	35
20µM IMR3169	0,6µl	52	60	
20µM IMR3170	0,6µl	72	60	
20µM IMR3171	0,6µl	72	120	
DNA	2µl	6	∞	
Auftrag auf 1,5% w/v Agarose-Gel				

Bestimmungstabelle für 1,5% w/v Agarose-Gel		
330bp	500bp	Genotyp
positiv	negativ	catnb ^{+/+}
negativ	positiv	catnb ^{LoxP/loxP}

5.8 Ingredienzien

Name	Herkunft / Produktbezeichner
Agarose	Serva / 11404
AR-A014418	Sigma / A3230
Bepanthen	Bayer / 20113
Bicucullin	Sigma / 14343-50MG
<i>CaCl₂</i>	Roth / CN93.2
Carbogen	Fakultät für Chemie und Pharmazie, LMU München
Carprophen (Rimadyl)	WDT / 07202
Casein I	Applied Biosystems / T2015
Cefotaxim	Pharmore
DAPI	Roche / 236 276 10mg
Dexamethason	WDT / 98056
DMSO	Sigma / D4540
EDTA	Sigma / ED4SS
EGTA	Sigma / 03777-10G
Ethanol	VWR / 1.00983.1000
Erdnuss-Öl	Sigma / C-8267
Essigsäure	Merck / 1.00063.2500
FAB	Dianova / AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG+IgM 115-005-068
Glucose	Merck / 1.08337.1000
goat anti rabbit Alexa-Fluor 647	Invitrogen / A-21244
goat anti mouse Alexa-Fluor 647	Invitrogen / A-21236
<i>H₂O₂</i> 30% v/v	Roth / 8070.1
<i>H₂SO₄</i> 98% v/v	Merck / 1.12080.1000
<i>HCl</i> 37% v/v	Roth / 4625.2
HEPES	Invitrogen / 15630-056

Hot Mastermix	VWR / 220041
Isofluran	Abbott / Forene 100% v/v
Isopropanol	Staub
Isotonische <i>NaCl</i> -Lösung 0,9% w/v	Braun / 3710647
<i>KCl</i>	Merck / 1.04936
Ketamin 10% (100 mg/ml)	WDT / 02946
<i>KH₂PO₄</i>	Merck / 4873.1000
<i>MgCl₂</i>	Roth / KK36.3
mouse anti MAP1b	Santa Cruz Biotechnology / sc-25729
mouse anti Synapsin	Synaptic Systems
mouse anti Tau-1	Millipore / MAB3420
<i>Na₂HPO₄</i>	Sigma / 71636
<i>Na₃ATP</i>	Sigma / G7127-250MG
<i>Na₃GTP</i>	Sigma / G8877-250MG
<i>NaCl</i>	VWR / 1.06404.1000
<i>NaH₂PO₄</i>	Sigma / 71507
<i>NaHCO₃</i>	Roth / 6885.1
<i>NaOH</i> 1M	Merck / 1.09137.1000
<i>NaOH</i> 4M	Merck / 191373M
Normal Goat Serum	Dako
Paraformaldehyd	VWR / 28794.295
PEG-300	AppliChem / A5537,1000
peqGold Tissue DNA Mini Kit	Peqlab / 12-3396-02
Primer	MWG Eurofins
rabbit anti β -Catenin	Abcam / ab6302
rabbit anti GFP Alexa-Fluor 488	Invitrogen / A-21311
rabbit anti GSK-3 β	Santa Cruz Biotechnology / sc-9166
rabbit anti PSD-95	Synaptic Systems
Rompun 2% (Xylazin)	WDT / 03406
Saccharose	Merck / 1.07687.1000
<i>SnCl₂</i>	VWR / A16202.22
Strychnin	Sigma / S0532
Sybr-Gold	Life Technologies / S114940
Tamoxifen	Sigma / T-5648
Tetrodotoxin	BioTrend / BN0517
Thioharnstoff	GE-Healthcare / RPN 6301
Tris-Base	Sigma / T1503-1KG
Triton-X-100	Sigma / T9284
Tween-20	Sigma / P1379

5.9 Rezepte

Name	Zusammensetzung
4% w/v PFA	1g Paraformaldehyd 25ml PBS 2 Tropfen <i>NaOH</i> 4M Bei 70°C lösen und Filtrieren

Ätzlösung	300ml <i>ddH₂O</i> 100ml <i>H₂O₂</i> 30% v/v 200ml <i>HCl</i> 37% v/v
Agarose-Gel (1,5% w/v)	2,3g Agarose 3µl Sybr-Gold 150ml 1 × TAE-Puffer
DAPI-Arbeitslösung	1µl DAPI-Stammlösung 999µl PBS
DAPI-Stammlösung	10mg DAPI 2ml PBS
Entwickler-Lösung	475ml <i>ddH₂O</i> 25ml <i>NaOH</i> 4M
iBlock	1g Casein I 50ml PBS 0,5ml Tween-20
Ketamin / Xylazin Narkose	4 ml Ketamin 100mg/ml 1ml Xylazin 20mg/ml 24ml isotonische <i>NaCl</i> -Lösung
Patch-Lösung	118mM <i>NaCl</i> 3mM <i>KCl</i> 1,5mM <i>CaCl₂</i> 1mM <i>MgCl₂</i> 25mM <i>NaHCO₃</i> 1mM <i>NaH₂PO₄</i> 10mM Glucose Oxygenierung mit Carbogen pH := 7,4
PBS (10×)	80g <i>NaCl</i> 2g <i>KCl</i> 14,4g <i>Na₂HPO₄</i> 2,4g <i>KH₂PO₄</i> 1L <i>ddH₂O</i>
Pipetten-Lösung	140 mM <i>KCl</i> 1mM <i>CaCl₂</i> 10mM EGTA 2mM <i>MgCl₂</i> 4mM <i>Na₃ATP</i> 0,5mM <i>Na₃GTP</i> 10mM HEPES pH := 7,3
Schneide-Lösung	2,5mM <i>KCl</i> 1,25mM <i>Na₂HPO₄</i> 26mM <i>NaHCO₃</i> 25mM Glucose 200mM Saccharose 0,5mM <i>CaCl₂</i> 6mM <i>MgCl₂</i> Oxygenierung mit Carbogen pH := 7,4
TAE-Puffer	121g Tris-Base 28,5ml Essigsäure 9,31g EDTA ad 500ml <i>ddH₂O</i>

Zinnbad-Lösung	350ml <i>ddH₂O</i> 20ml <i>H₂SO₄</i> 98% v/v 5g <i>SnCl₂</i> 25g Thioharnstoff ad 500ml <i>ddH₂O</i>
----------------	---

5.10 Materialien, Geräte, Werkzeuge

Name	Herkunft / Produktbezeichner
10x/0,3 Objektiv	Zeiss / Plan-Neofluar 10x/0,3
10x/0,8 Objektiv für die Elektrophysiologie	Zeiss / IR-Achroplan 10x/0,8
20x/1.0 Objektiv	Zeiss / W Plan-Apochromat 20x/1.0 DIC
40x/0,8 Objektiv für die Elektrophysiologie	Olympus / LumPlan FL N 40x/0,8
40x/1,4 Ölimmersionsobjektiv	Zeiss / W Plan-Apochromat 40x/1,4 DIC
Argon-Laser	Zeiss / LASOS RMC 7812Z2
Ausgießstation	Microm / EC350
AVR-Programmer	AVR910 / http://www.klaus-leidinger.de
Axioskop LSM 7MP	Zeiss
Binokular	Olympus / SZ51 mit Kaltlicht-Schwanenhalslampe KL1500LED
Biopsie-Punch	Calmed, 33-35
Borosilikat-Rohlinge	Science products GmbH / GB150TF-8P
BP470-550	Zeiss
Dako	Dako / S302380-2
Deckglas	VWR / 631-0146
Dentalbohrer	Gebrüder Brasseler GmbH, Rosetten-Bohrer / H71 104 004
Dentalkleber	Henry Schein Dental Depot, Cyano Veneer / 4582169
Dentalzement	Henry Schein Dental Depot, Cyano Veneer / 1574354
Dioden-Laser	Zeiss / LASOS RMC 7812Z2
EPC10 USB Patch-Clamp Verstärker	HEKA
Flügelkanüle	Helpi-Medical / ABB600627
Folie für Leiterplattenherstellung	Amazon / Tartan 901
Fräsmaschine (Microfräse MF70 Proxxon)	Conrad / 812193
GaAsP-Detektor	Hamamatsu
Gelfoam	Paeser und Lorei / 09 0315 08
Gelkammer	CBS Scientific / SGU-030T-02
Gesichtsbräuner	TCM
Helium-Neon-Laser	Zeiss / LASOS RMC 7812Z2
Hot Bead Sterilizer	FST / 18000-45
Isofluranverdampfer	Abbott / Trajan808, Dräger
Kamera	Canon / Power Shot G1 Digital
Kanülen Neolus, diverse Stärken	VWR
Konfokal-Mikroskop	Zeiss / LSM 780
Labor-Netzteil (1,5V-15V, 1,5A)	Conrad / 511805-62
Epoxyd-Leiterplatten (Bungard, UV sensitiv)	Conrad / 529206-62
Lötlack	Conrad / 813907-62

Lötssystem (Ersa Lötstation Analog 60 0ANA60)	Conrad / 810053-62
Lötzinn (bleifrei)	Conrad / 828697-22
LP690	Zeiss
MBS 405/760	Zeiss
MBS 488/561/633	Zeiss
Mikromanipulator	Luigs und Neumann / SM-5
Mikropipettenpuller	Sutter Instruments / P-87
Mikroskop für Elektrophysiologie	Olympus / BX50WI
Multiplatte	Hartenstein / MU04
Nagellack	Essence / color & go transparent
Nano-Drop	ThermoFisher Scientific / ND1000
Objektträger Superfrost Plus	VWR / 631-9483
OP-Besteck	FST / 00632-11, 15000-00, 11006-12, 91150-20, 11223-20, 91197-00, 91460-11
OP-Deckgläschen (Ø 5mm)	Menzel / CB00050RA1
OP-Heizapparatur	StoeltingEurope / 50300V, 50305, 50304
PCR-Cycler	Eppendorf / Thermocycler Master Cycler
peqGold Tissue DNA Mini Kit	Peqlab / 12-3396-02
PE-Schlauchfolie	Hartenstein / PE10
Platinenbohrer	Conrad / 826686-62
Rasierklingen	VWR / 13510.35
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Schüttler	Edmund Bühler / KM-2 AKKU
Skalpelle	VWR / 233-5366
SP690	Zeiss
Spritzen, diverse	VWR
Sugi	Kettenbach GmbH / 30601
Thermoblock	Eppendorf
Titan-Saphir-Laser	Spectra Physics / MaiTai HP DeepSee
Tupfer	Böttger / 09.113.9105
Vibratom für die Elektrophysiologie	Leica / LeicaVT1200S
Vibratom für fixierte Hirnschnitte	Leica / VT1000S
Vortexer	Scientific Industries / Vortex Genie 2
X,Y-verstellbarer motorisierten Tisch	Luigs und Neumann / 380 FM
Zentrifuge	Eppendorf / 5804R

5.11 Elektronische Bauteile

Name (Schaltplansymbol)	Herkunft / Produktbezeichner
AVR Mikrocontroller (IC)	Reichelt / ATMEGA8-16DIP
Buchsen (SV)	Reichelt / PFL10, PFL14
Buchsenleiste (JP)	Reichelt / BL1X20G82,54
Diode	Reichelt (D) / 1N4004
Flachbandkabel	Reichelt / AWG28-24G3M
Halbschalen-Gehäuse (Polystyrol)	Conrad / 523117-62
Hochleistungstransistor (Q)	Reichelt / IRLZ34N

IC-Sockel	Reichelt / GS28-S
I ² C-Temperatursensor (IC)	Reichelt / LM75SMD
Klemmen (X)	Reichelt / AKL101-02, AKL101-04
Kondensatoren (C) (Keramik, Tantal, etc...)	Reichelt / SORTIMENT SMD 1, SORTIMENT 1-SMD
Kondensatoren (C) (Elektrolyt)	Conrad / 442896-62
Kühlkörper	Reichelt / V CK633
LC-Display	Reichelt / LCD162C
Potentiometer (R) 10K	Reichelt / PT10-L10K
Spannungswandler (IC)	Reichelt / μ A 78S05
Stecker (SV)	Reichelt / HEBW25, WSL10G, WSL14G, WSL10SK
Stiftleiste (JP)	Reichelt / SL1X50G2,54
Widerstände (R) (Kohleschicht, etc...)	Reichelt / SORTIMENT SMD 3, KOHLE E 12

5.12 Software

Name	Herkunft
Adobe CS4	Adobe / Abteilung Medizintechnik und IT, München
AutoQuant	Media Cybernetics autoQuant X2 / http://www.mediacy.com
AVR Studio	AVR Studio 5.1 http://www.atmel.com/
Code::Blocks	Code::Blocks 12.11 / http://www.codeblocks.org/
Eagle	CadSoft Eagle 5.6.0 / http://www.cadsoft.de/
Imaris	Bitplane Imaris 7.5.1 / http://www.bitplane.com/
LSM Image Browser 4.2.0	Zeiss / http://microscopy.zeiss.com/
MatLab 2012b	The MathWorks / http://www.mathworks.de
MikTex 2.9	http://miktex.org/
MiniAnalysis	Synaptosoft MiniAnalysis 6.0.3 / http://www.synaptosoft.com/
PatchMaster	PatchMaster für EPC10 / http://www.heka.com/
Prism5	Graphpad / http://www.graphpad.com
PSPad	PSPad 4.5.6 / http://www.pspad.com/
TeXnicCenter 2.0	http://www.texniccenter.org/
Visio 2007	Microsoft / http://www.microsoft.com
Visual Studio 2010 Ultimate	Microsoft / http://www.microsoft.com
WinAVR	WinAVR Build 2010-01-20 http://sourceforge.net/projects/winavr/files/
ZEN2009	Zeiss / http://microscopy.zeiss.com/

6 Literaturverzeichnis

- [1] Abrams, T.W. Encyclopedia of Neuroscience, chapter Cyclic AMP (cAMP) Role in Learning and Memory, pages 265–277. Elsevier Ltd., 2009. <http://www.sciencedirect.com/science/referenceworks/9780080450469>, Zugriff: Jan 2013.
- [2] Akbik, F. V., Bhagat, S. M., Patel, P. R., Cafferty, W. B., and Strittmatter, S. M. Anatomical plasticity of adult brain is titrated by Nogo Receptor 1. *Neuron*, **77**(5):859–866, Mar 2013.
- [3] Alberts, B. Molecular Biology of The Cell, chapter 15, Mechanisms of Cell Communication. Garland Science, 2008.
- [4] Ali, A., Hoefflich, K. P., and Woodgett, J. R. Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem. Rev.*, **101**(8):2527–2540, Aug 2001.
- [5] Anderton, B. H., Callahan, L., Coleman, P., Davies, P., Flood, D., Jicha, G. A., Ohm, T., and Weaver, C. Dendritic changes in Alzheimer's disease and factors that may underlie these changes. *Prog. Neurobiol.*, **55**(6):595–609, Aug 1998.
- [6] Araya, R., Jiang, J., Eisenthal, K. B., and Yuste, R. The spine neck filters membrane potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**(47):17961–17966, Nov 2006.
- [7] Arellano, J. I., Espinosa, A., Fairen, A., Yuste, R., and DeFelipe, J. Non-synaptic dendritic spines in neocortex. *Neuroscience*, **145**(2):464–469, Mar 2007.
- [8] Arikath, J. Regulation of dendrite and spine morphogenesis and plasticity by catenins. *Mol. Neurobiol.*, **40**(1):46–54, Aug 2009.
- [9] Bailey, C. H. and Chen, M. Long-term memory in Aplysia modulates the total number of varicosities of single identified sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**(7):2373–2377, Apr 1988.
- [10] Bailey, C. H. and Chen, M. Time course of structural changes at identified sensory neuron synapses during long-term sensitization in Aplysia. *J. Neurosci.*, **9**(5):1774–1780, May 1989.
- [11] Barros, C. S., Calabrese, B., Chamero, P., Roberts, A. J., Korzus, E., Lloyd, K., Stowers, L., Mayford, M., Halpain, S., and Muller, U. Impaired maturation of dendritic spines without disorganization of cortical cell layers in mice lacking NRG1/ErbB signaling in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**(11):4507–4512, Mar 2009.
- [12] Beattie, E. C., Carroll, R. C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., Zastrow, M. von, and Malenka, R. C. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat. Neurosci.*, **3**(12):1291–1300, Dec 2000.
- [13] Becker, N., Wierenga, C. J., Fonseca, R., Bonhoeffer, T., and Nagerl, U. V. LTD induction causes morphological changes of presynaptic boutons and reduces their contacts with spines. *Neuron*, **60**(4):590–597, Nov 2008.
- [14] Bennett, E. L., Rosenzweig, M. R., and Diamond, M. C. Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. *Science*, **163**(3869):825–826, Feb 1969.
- [15] Bliss, T. V. and Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond.)*, **232**(2):331–356, Jul 1973.
- [16] Blum, S. Encyclopedia of Neuroscience, chapter MAP Kinase Signaling in Learning and Memory, pages 657–662. Elsevier Ltd., 2009. <http://www.sciencedirect.com/science/referenceworks/9780080450469>, Zugriff: Jan 2013.
- [17] Boersma, M. C., Dresselhaus, E. C., De Biase, L. M., Mihalas, A. B., Bergles, D. E., and Meffert, M. K. A requirement for nuclear factor-kappaB in developmental and plasticity-associated synaptogenesis. *J. Neurosci.*, **31**(14):5414–5425, Apr 2011.
- [18] Bourgin, C., Murai, K. K., Richter, M., and Pasquale, E. B. The EphA4 receptor regulates dendritic spine remodeling by affecting beta1-integrin signaling pathways. *J. Cell Biol.*, **178**(7):1295–1307, Sep 2007.
- [19] Bourne, J. and Harris, K. M. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr. Opin. Neurobiol.*, **17**(3):381–386, Jun 2007.
- [20] Bradley, C. A., Peineau, S., Taghibiglou, C., Nicolas, C. S., Whitcomb, D. J., Bortolotto, Z. A., Kaang, B. K., Cho, K., Wang, Y. T., and Collingridge, G. L. A pivotal role of GSK-3 in synaptic plasticity. *Front Mol Neurosci*, **5**:13, 2012.
- [21] Burgold, S., Bittner, T., Dorostkar, M. M., Kieser, D., Fuhrmann, M., Mitteregger, G., Kretzschmar, H., Schmidt, B., and Herms, J. In vivo multiphoton imaging reveals gradual growth of newborn amyloid plaques over weeks. *Acta Neuropathol.*, **121**(3):327–335, Mar 2011.

- [22] Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., and Wong, P. C. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat. Neurosci.*, **4**(3):233–234, Mar 2001.
- [23] Calabrese, B., Wilson, M. S., and Halpain, S. Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology (Bethesda)*, **21**:38–47, Feb 2006.
- [24] Caroni, P. Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J. Neurosci. Methods*, **71**(1):3–9, Jan 1997.
- [25] Carvalho, A. L., Caldeira, M. V., Santos, S. D., and Duarte, C. B. Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *Br. J. Pharmacol.*, **153 Suppl 1**:S310–324, Mar 2008.
- [26] Cash, S. and Yuste, R. Input summation by cultured pyramidal neurons is linear and position-independent. *J. Neurosci.*, **18**(1):10–15, Jan 1998.
- [27] Chklovskii, D. B., Mel, B. W., and Svoboda, K. Cortical rewiring and information storage. *Nature*, **431**(7010):782–788, Oct 2004.
- [28] Chklovskii, D. B., Schikorski, T., and Stevens, C. F. Wiring optimization in cortical circuits. *Neuron*, **34**(3):341–347, Apr 2002.
- [29] Christoffel, D. J., Golden, S. A., Dumitriu, D., Robison, A. J., Janssen, W. G., Ahn, H. F., Krishnan, V., Reyes, C. M., Han, M. H., Ables, J. L., Eisch, A. J., Dietz, D. M., Ferguson, D., Neve, R. L., Greengard, P., Kim, Y., Morrison, J. H., and Russo, S. J. I κ B kinase regulates social defeat stress-induced synaptic and behavioral plasticity. *J. Neurosci.*, **31**(1):314–321, Jan 2011.
- [30] Ciani, L., Boyle, K. A., Dickins, E., Sahores, M., Anane, D., Lopes, D. M., Gibb, A. J., and Salinas, P. C. Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**(26):10732–10737, Jun 2011.
- [31] Clare, R., King, V. G., Wirenfeldt, M., and Vinters, H. V. Synapse loss in dementias. *J. Neurosci. Res.*, **88**(10):2083–2090, Aug 2010.
- [32] CLARK, W. L. Inquiries into the anatomical basis of olfactory discrimination. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, **146**(924):299–319, May 1957.
- [33] Clayton, E. L., Sue, N., Smillie, K. J., O’Leary, T., Bache, N., Cheung, G., Cole, A. R., Wyllie, D. J., Sutherland, C., Robinson, P. J., and Cousin, M. A. Dynamin I phosphorylation by GSK3 controls activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *Nat. Neurosci.*, **13**(7):845–851, Jul 2010.
- [34] Cohen, P. and Goedert, M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.*, **3**(6):479–487, Jun 2004.
- [35] Coleman, P. D. and Riesen, A. H. Environmental effects on cortical dendritic fields. I. Rearing in the dark. *J. Anat.*, **102**(Pt 3):363–374, Mar 1968.
- [36] Collingridge, G. L., Isaac, J. T., and Wang, Y. T. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**(12):952–962, Dec 2004.
- [37] Craig, A. M. and Kang, Y. Neurexin-neurologin signaling in synapse development. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **17**(1):43–52, Feb 2007.
- [38] Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**(6559):785–789, 1995.
- [39] Dailey, M. E. and Smith, S. J. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J. Neurosci.*, **16**(9):2983–2994, May 1996.
- [40] DaRocha-Souto, B., Coma, M., Perez-Nievas, B. G., Scotton, T. C., Siao, M., Sanchez-Ferrer, P., Hashimoto, T., Fan, Z., Hudry, E., Barroeta, I., Sereno, L., Rodriguez, M., Sanchez, M. B., Hyman, B. T., and Gomez-Isla, T. Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates beta-amyloid induced neuritic damage in Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Dis.*, **45**(1):425–437, Jan 2012.
- [41] De Felipe, J. History of Neuroscience: Santiago Ramón y Cajal (1852-1934). *IBRO History of Neuroscience*, 2002. http://www.ibro.info/Pub/Pub_Main_Display.asp?LC_Docs_ID=3456, Zugriff: Jan 2013.
- [42] De Roo, M., Klausner, P., Mendez, P., Poglia, L., and Muller, D. Activity-dependent PSD formation and stabilization of newly formed spines in hippocampal slice cultures. *Cereb. Cortex*, **18**(1):151–161, Jan 2008.
- [43] DeFelipe, J., Jones, E. G., and Cajal, S. Ramon y. Santiago Ramón y Cajal and methods in neurohistology. *Trends Neurosci.*, **15**(7):237–246, Jul 1992.
- [44] Deisseroth, K., Bitto, H., and Tsien, R. W. Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, **16**(1):89–101, Jan 1996.
- [45] Denk, W., Piston, D., and Webb, W. Handbook Of Biological Confocal Microscopy, chapter Multi-Photon Molecular Excitation in Laser-Scanning Microscopy, pages 535–549. Springer Verlag, 2006.
- [46] Denk, W., Strickler, J. H., and Webb, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, **248**(4951):73–76, Apr 1990.
- [47] Dewachter, I., Ris, L., Jaworski, T., Seymour, C. M., Kremer, A., Borghgraef, P., De Vijver, H., Godaux, E., and

- Van Leuven, F. GSK3beta, a centre-staged kinase in neuropsychiatric disorders, modulates long term memory by inhibitory phosphorylation at serine-9. *Neurobiol. Dis.*, **35**(2):193–200, Aug 2009.
- [48] Diaspro, A., Bianchini, P., Vicidomini, G., Faretta, M., Ramoino, P., and Usai, C. Multi-photon excitation microscopy. *Biomed Eng Online*, **5**:36, 2006.
- [49] Dillon, C. and Goda, Y. The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu. Rev. Neurosci.*, **28**:25–55, 2005.
- [50] Dittgen, T., Nimmerjahn, A., Komai, S., Licznanski, P., Waters, J., Margrie, T. W., Helmchen, F., Denk, W., Brecht, M., and Osten, P. Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**(52):18206–18211, Dec 2004.
- [51] Dolan, P. J. and Johnson, G. V. The role of tau kinases in Alzheimer's disease. *Curr Opin Drug Discov Devel*, **13**(5):595–603, Sep 2010.
- [52] Dominguez, J. M., Fuertes, A., Orozco, L., Monte-Millan, M. del, Delgado, E., and Medina, M. Evidence for irreversible inhibition of glycogen synthase kinase-3 beta by tideglusib. *J. Biol. Chem.*, **287**(2):893–904, Jan 2012.
- [53] Dorostkar, MM, Dreosti, E, Odermatt, B, and L, Lagnado. Computational processing of optical measurements of neuronal and synaptic activity in networks. *J. Neurosci. Methods*, **188**(1):141–150, Apr 2010.
- [54] Drew, P. J., Shih, A. Y., Driscoll, J. D., Knutsen, P. M., Blinder, P., Davalos, D., Akassoglou, K., Tsai, P. S., and Kleinfeld, D. Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull. *Nat. Methods*, **7**(12):981–984, Dec 2010.
- [55] Ehrlich, I., Klein, M., Rumpel, S., and Malinow, R. PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**(10):4176–4181, Mar 2007.
- [56] Eldar-Finkelman, H., Licht-Murava, A., Pietrokovski, S., and Eisenstein, M. Substrate competitive GSK-3 inhibitors - strategy and implications. *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**(3):598–603, Mar 2010.
- [57] Embi, N., Rylatt, D. B., and Cohen, P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem.*, **107**(2):519–527, Jun 1980.
- [58] Engert, F. and Bonhoeffer, T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*, **399**(6731):66–70, May 1999.
- [59] Ethell, I. M. and Pasquale, E. B. Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog. Neurobiol.*, **75**(3):161–205, Feb 2005.
- [60] Feng, G., Mellor, R. H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q. T., Wallace, M., Nerbonne, J. M., Lichtman, J. W., and Sanes, J. R. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*, **28**(1):41–51, Oct 2000.
- [61] Fiala, J. C., Spacek, J., and Harris, K. M. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **39**(1):29–54, Jun 2002.
- [62] Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., and Tsai, L. H. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*, **447**(7141):178–182, May 2007.
- [63] Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D., and Matus, A. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*, **20**(5):847–854, May 1998.
- [64] Flood, D. G. Region-specific stability of dendritic extent in normal human aging and regression in Alzheimer's disease. II. Subiculum. *Brain Res.*, **540**(1-2):83–95, Feb 1991.
- [65] Fu, M., Yu, X., Lu, J., and Zuo, Y. Repetitive motor learning induces coordinated formation of clustered dendritic spines in vivo. *Nature*, **483**(7387):92–95, Mar 2012.
- [66] Fu, M. and Zuo, Y. Experience-dependent structural plasticity in the cortex. *Trends Neurosci.*, **34**(4):177–187, Apr 2011.
- [67] Fuhrmann, M., Mitteregger, G., Kretschmar, H., and Herms, J. Dendritic pathology in prion disease starts at the synaptic spine. *J. Neurosci.*, **27**(23):6224–6233, Jun 2007.
- [68] Gan, W-B. Encyclopedia of Neuroscience, chapter Spine Plasticity, pages 321–327. Elsevier Ltd., 2009. <http://www.sciencedirect.com/science/referenceworks/9780080450469>, Zugriff: Jan 2013.
- [69] Garaschuk, O., Milos, R. I., and Konnerth, A. Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging in vivo. *Nat Protoc*, **1**(1):380–386, 2006.
- [70] Garey, L. J., Ong, W. Y., Patel, T. S., Kanani, M., Davis, A., Mortimer, A. M., Barnes, T. R., and Hirsch, S. R. Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, **65**(4):446–453, Oct 1998.
- [71] Gelfo, F., De Bartolo, P., Giovine, A., Petrosini, L., and Leggio, M. G. Layer and regional effects of environmental enrichment on the pyramidal neuron morphology of the rat. *Neurobiol Learn Mem*, **91**(4):353–365, May 2009.
- [72] Glantz, L. A. and Lewis, D. A. Reduction of synaptophysin immunoreactivity in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. Regional and diagnostic specificity. *Arch. Gen. Psychiatry*, **54**(7):660–669, Jul 1997.
- [73] Glantz, L. A. and Lewis, D. A. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in

- schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, **57**(1):65–73, Jan 2000.
- [74] Golgi, C. Sulla struttura della sostanza grigia dell cervello. *Gazz. Med. Lombarda*, **33**:244–246, 1873.
- [75] Gomez-Sintes, R., Hernandez, F., Bortolozzi, A., Artigas, F., Avila, J., Zaratini, P., Gotteland, J. P., and Lucas, J. J. Neuronal apoptosis and reversible motor deficit in dominant-negative GSK-3 conditional transgenic mice. *EMBO J.*, **26**(11):2743–2754, Jun 2007.
- [76] Goold, R. G. and Gordon-Weeks, P. R. Glycogen synthase kinase 3beta and the regulation of axon growth. *Biochem. Soc. Trans.*, **32**(Pt 5):809–811, Nov 2004.
- [77] Goold, R. G., Owen, R., and Gordon-Weeks, P. R. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J. Cell. Sci.*, **112** (Pt 19):3373–3384, Oct 1999.
- [78] Gould, T. D., Einat, H., Bhat, R., and Manji, H. K. AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **7**(4):387–390, Dec 2004.
- [79] Greenough, W. T., Volkmar, F. R., and Juraska, J. M. Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. *Exp. Neurol.*, **41**(2):371–378, Nov 1973.
- [80] Grutzendler, J., Kasthuri, N., and Gan, W. B. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, **420**(6917):812–816, 2002.
- [81] Hampel, H., Ewers, M., Burger, K., Annas, P., Mortberg, A., Bogstedt, A., Frolich, L., Schroder, J., Schonknecht, P., Riepe, M. W., Kraft, I., Gasser, T., Leyhe, T., Moller, H. J., Kurz, A., and Basun, H. Lithium trial in Alzheimer's disease: a randomized, single-blind, placebo-controlled, multicenter 10-week study. *J Clin Psychiatry*, **70**(6):922–931, Jun 2009.
- [82] Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M., and Taketo, M. M. Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J.*, **18**(21):5931–5942, Nov 1999.
- [83] Harris, K. M. Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **9**(3):343–348, Jun 1999.
- [84] Harris, K. M., Jensen, F. E., and Tsao, B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J. Neurosci.*, **12**(7):2685–2705, Jul 1992.
- [85] Hayashi, Y. and Majewska, A. K. Dendritic spine geometry: functional implication and regulation. *Neuron*, **46**(4):529–532, May 2005.
- [86] He, C. X. and Portera-Cailliau, C. The trouble with spines in fragile X syndrome: density, maturity and plasticity. *Neuroscience*, Apr 2012.
- [87] Hebb, D.O. The effects of early experience on problem solving at maturity. *Am Psychol*, **2**:306–307, 1947.
- [88] Hebb, D.O. The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory. Wiley VCH, 1949.
- [89] Hernandez, F., Borrell, J., Guaza, C., Avila, J., and Lucas, J. J. Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments. *J. Neurochem.*, **83**(6):1529–1533, Dec 2002.
- [90] Hernandez, F., Barreda, E. Gomez de, Fuster-Matanzo, A., Lucas, J. J., and Avila, J. GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Exp. Neurol.*, **223**(2):322–325, Jun 2010.
- [91] Ho, V. M., Lee, J. A., and Martin, K. C. The cell biology of synaptic plasticity. *Science*, **334**(6056):623–628, Nov 2011.
- [92] Hoeflich, K. P., Luo, J., Rubie, E. A., Tsao, M. S., Jin, O., and Woodgett, J. R. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*, **406**(6791):86–90, Jul 2000.
- [93] Hofer, S. B., Mrcic-Flogel, T. D., Bonhoeffer, T., and Hubener, M. Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature*, **457**(7227):313–317, Jan 2009.
- [94] Holtmaat, A., Bonhoeffer, T., Chow, D. K., Chuckowree, J., De Paola, V., Hofer, S. B., Hubener, M., Keck, T., Knott, G., Lee, W. C., Mostany, R., Mrcic-Flogel, T. D., Nedivi, E., Portera-Cailliau, C., Svoboda, K., Trachtenberg, J. T., and Wilbrecht, L. Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nat Protoc*, **4**(8):1128–1144, 2009.
- [95] Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Knott, G. W., Welker, E., and Svoboda, K. Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature*, **441**(7096):979–983, Jun 2006.
- [96] Holtmaat, A. J., Trachtenberg, J. T., Wilbrecht, L., Shepherd, G. M., Zhang, X., Knott, G. W., and Svoboda, K. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron*, **45**(2):279–291, Jan 2005.
- [97] Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G. C., and Kasai, H. The subsynaptic organization of actin filaments regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*, **57**(5):719–729, Mar 2008.
- [98] Hoogenraad, C. C. and Akhmanova, A. Dendritic spine plasticity: new regulatory roles of dynamic microtubules. *Neuroscientist*, **16**(6):650–661, Dec 2010.
- [99] Hooper, C., Markevich, V., Plattner, F., Killick, R., Schofield, E., Engel, T., Hernandez, F., Anderton, B., Rosenblum,

- K., Bliss, T., Cooke, S. F., Avila, J., Lucas, J. J., Giese, K. P., Stephenson, J., and Lovestone, S. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur. J. Neurosci.*, **25**(1):81–86, Jan 2007.
- [100] Hotulainen, P. and Hoogenraad, C. C. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J. Cell Biol.*, **189**(4):619–629, May 2010.
- [101] Hu, S., Begum, A. N., Jones, M. R., Oh, M. S., Beech, W. K., Beech, B. H., Yang, F., Chen, P., Ubeda, O. J., Kim, P. C., Davies, P., Ma, Q., Cole, G. M., and Frautschy, S. A. GSK3 inhibitors show benefits in an Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals. *Neurobiol. Dis.*, **33**(2):193–206, Feb 2009.
- [102] Inestrosa, N. C. and Arenas, E. Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.*, **11**(2):77–86, Feb 2010.
- [103] Ittner, L. M., Ke, Y. D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., Eersel, J. van, Wolfing, H., Chieng, B. C., Christie, M. J., Napier, I. A., Eckert, A., Staufenbiel, M., Hardeman, E., and Gotz, J. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, **142**(3):387–397, Aug 2010.
- [104] Jaworski, J., Kapitein, L. C., Gouveia, S. M., Dortland, B. R., Wulf, P. S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S. A., Di Stefano, P., Demmers, J., Krugers, H., Defilippi, P., Akhmanova, A., and Hoogenraad, C. C. Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron*, **61**(1):85–100, Jan 2009.
- [105] Jiang, H., Guo, W., Liang, X., and Rao, Y. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators. *Cell*, **120**(1):123–135, Jan 2005.
- [106] JONES, W. H. and THOMAS, D. B. Changes in the dendritic organization of neurons in the cerebral cortex following deafferentation. *J. Anat.*, **96**:375–381, Jul 1962.
- [107] Jope, R. S. and Johnson, G. V. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.*, **29**(2):95–102, Feb 2004.
- [108] Jung, C. Der Einfluss eines Enriched Environments und von Schlüsselproteinen der Alzheimerschen Erkrankung auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines - eine in-vivo Analyse mithilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie. PhD thesis, LMU München, 2012.
- [109] Jung, C. K., Fuhrmann, M., Honarnejad, K., Van Leuven, F., and Herms, J. Role of presenilin 1 in structural plasticity of cortical dendritic spines in vivo. *J. Neurochem.*, **119**(5):1064–1073, Dec 2011.
- [110] Jung, C. K. and Herms, J. Structural Dynamics of Dendritic Spines are Influenced by an Environmental Enrichment: An In Vivo Imaging Study. *Cereb. Cortex*, Oct 2012.
- [111] Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, **294**(5544):1030–1038, Nov 2001.
- [112] Kapitein, L. C., Yau, K. W., and Hoogenraad, C. C. Microtubule dynamics in dendritic spines. *Methods Cell Biol.*, **97**:111–132, 2010.
- [113] Kayser, M. S., Nolt, M. J., and Dalva, M. B. EphB receptors couple dendritic filopodia motility to synapse formation. *Neuron*, **59**(1):56–69, Jul 2008.
- [114] Keck, T., Mrsic-Flogel, T. D., Vaz Afonso, M., Eysel, U. T., Bonhoeffer, T., and Hubener, M. Massive restructuring of neuronal circuits during functional reorganization of adult visual cortex. *Nat. Neurosci.*, **11**(10):1162–1167, Oct 2008.
- [115] Keck, T., Scheuss, V., Jacobsen, R. I., Wierenga, C. J., Eysel, U. T., Bonhoeffer, T., and Hubener, M. Loss of sensory input causes rapid structural changes of inhibitory neurons in adult mouse visual cortex. *Neuron*, **71**(5):869–882, Sep 2011.
- [116] Kempermann, G., Kuhn, H. G., and Gage, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, **386**(6624):493–495, Apr 1997.
- [117] Kimura, T., Yamashita, S., Nakao, S., Park, J. M., Murayama, M., Mizoroki, T., Yoshiike, Y., Sahara, N., and Takashima, A. GSK-3beta is required for memory reconsolidation in adult brain. *PLoS ONE*, **3**(10):e3540, 2008.
- [118] Klein, R. Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling. *Nat. Neurosci.*, **12**(1):15–20, Jan 2009.
- [119] Kleinfeld, D., Mitra, P. P., Helmchen, F., and Denk, W. Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**(26):15741–15746, Dec 1998.
- [120] Knott, G. W., Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Welker, E., and Svoboda, K. Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat. Neurosci.*, **9**(9):1117–1124, Sep 2006.
- [121] Kodama, A., Karakesisoglou, I., Wong, E., Vaezi, A., and Fuchs, E. ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell*, **115**(3):343–354, Oct 2003.
- [122] Kozorovitskiy, Y., Gross, C. G., Kopil, C., Battaglia, L., McBreen, M., Stranahan, A. M., and Gould, E. Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**(48):17478–17482, Nov 2005.
- [123] Kremer, A. Tau Fosforylatie en GSK3 in de ziekte van Alzheimer. PhD thesis, KU Leuven, 2012.

- <https://lirias.kuleuven.be/handle/123456789/338848>, Zugriff: Jan 2013.
- [124] Lai, C. S., Franke, T. F., and Gan, W. B. Opposite effects of fear conditioning and extinction on dendritic spine remodelling. *Nature*, **483**(7387):87–91, Mar 2012.
- [125] Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York, 1983.
- [126] Lamprecht, R. and LeDoux, J. Structural plasticity and memory. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**(1):45–54, Jan 2004.
- [127] Lan, J. Y., Skeberdis, V. A., Jover, T., Grooms, S. Y., Lin, Y., Araneda, R. C., Zheng, X., Bennett, M. V., and Zukin, R. S. Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nat. Neurosci.*, **4**(4):382–390, Apr 2001.
- [128] Lashley, K.S. In Search of the Engram. *Sym Soc Exp Biol*, **4**:454–482, 1950.
- [129] Law, A. J., Weickert, C. S., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., and Harrison, P. J. Reduced spinophilin but not microtubule-associated protein 2 expression in the hippocampal formation in schizophrenia and mood disorders: molecular evidence for a pathology of dendritic spines. *Am J Psychiatry*, **161**(10):1848–1855, Oct 2004.
- [130] Lee, F. H., Kaidanovich-Beilin, O., Roder, J. C., Woodgett, J. R., and Wong, A. H. Genetic inactivation of GSK3- α rescues spine deficits in Disc1-L100P mutant mice. *Schizophr. Res.*, **129**(1):74–79, Jun 2011.
- [131] Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y., and Sheng, M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell*, **119**(6):873–887, Dec 2004.
- [132] Lin, Y. C. and Koleske, A. J. Mechanisms of synapse and dendrite maintenance and their disruption in psychiatric and neurodegenerative disorders. *Annu. Rev. Neurosci.*, **33**:349–378, 2010.
- [133] Liu, S. J., Zhang, A. H., Li, H. L., Wang, Q., Deng, H. M., Netzer, W. J., Xu, H., and Wang, J. Z. Overactivation of glycogen synthase kinase-3 by inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C leads to hyperphosphorylation of tau and impairment of spatial memory. *J. Neurochem.*, **87**(6):1333–1344, Dec 2003.
- [134] Lucas, F. R., Goold, R. G., Gordon-Weeks, P. R., and Salinas, P. C. Inhibition of GSK-3 β leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium. *J. Cell. Sci.*, **111** (Pt 10):1351–1361, May 1998.
- [135] Ly, P. T., Wu, Y., Zou, H., Wang, R., Zhou, W., Kinoshita, A., Zhang, M., Yang, Y., Cai, F., Woodgett, J., and Song, W. Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. *J. Clin. Invest.*, **123**(1):224–235, Jan 2013.
- [136] Maguschak, K. A. and Ressler, K. J. Beta-catenin is required for memory consolidation. *Nat. Neurosci.*, **11**(11):1319–1326, Nov 2008.
- [137] Majewska, A. K., Newton, J. R., and Sur, M. Remodeling of synaptic structure in sensory cortical areas in vivo. *J. Neurosci.*, **26**(11):3021–3029, Mar 2006.
- [138] Maletic-Savatic, M., Malinow, R., and Svoboda, K. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science*, **283**(5409):1923–1927, Mar 1999.
- [139] Malinow, R. and Malenka, R. C. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.*, **25**:103–126, 2002.
- [140] Mao, Y., Ge, X., Frank, C. L., Madison, J. M., Koehler, A. N., Doud, M. K., Tassa, C., Berry, E. M., Soda, T., Singh, K. K., Biechele, T., Petryshen, T. L., Moon, R. T., Haggarty, S. J., and Tsai, L. H. Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3 β /beta-catenin signaling. *Cell*, **136**(6):1017–1031, Mar 2009.
- [141] Marik, S. A., Yamahachi, H., McManus, J. N., Szabo, G., and Gilbert, C. D. Axonal dynamics of excitatory and inhibitory neurons in somatosensory cortex. *PLoS Biol.*, **8**(6):e1000395, 2010.
- [142] Marrs, G. S., Green, S. H., and Dailey, M. E. Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites. *Nat. Neurosci.*, **4**(10):1006–1013, Oct 2001.
- [143] Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., and Kasai, H. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.*, **4**(11):1086–1092, Nov 2001.
- [144] Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C., and Kasai, H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, **429**(6993):761–766, Jun 2004.
- [145] MATTHEWS, M. R. and POWELL, T. P. Some observations on transneuronal cell degeneration in the olfactory bulb of the rabbit. *J. Anat.*, **96**:89–102, Jan 1962.
- [146] Matus, A. Encyclopedia of Neuroscience, chapter Dendritic Spine History, pages 453–457. Elsevier Ltd., 2009. <http://www.sciencedirect.com/science/referenceworks/9780080450469>, Zugriff: Jan 2013.
- [147] McOmish, C. E., Burrows, E., Howard, M., Scarr, E., Kim, D., Shin, H. S., Dean, B., Buuse, M. van den, and Hannan, A. J. Phospholipase C- β 1 knockout mice exhibit endophenotypes modeling schizophrenia which are rescued by environmental enrichment and clozapine administration. *Mol. Psychiatry*, **13**(7):661–672, Jul 2008.
- [148] Meador-Woodruff, J. H., Clinton, S. M., Beneyto, M., and McCullumsmith, R. E. Molecular abnormalities of the glutamate synapse in the thalamus in schizophrenia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1003**:75–93, Nov 2003.
- [149] Mines, M. A. and Jope, R. S. Glycogen synthase kinase-3: a promising therapeutic target for fragile x syndrome.

- Front Mol Neurosci*, **4**:35, 2011.
- [150] Mizrahi, A. and Katz, L. C. Dendritic stability in the adult olfactory bulb. *Nat. Neurosci.*, **6**(11):1201–1207, Nov 2003.
- [151] Mulkey, R. M., Endo, S., Shenolikar, S., and Malenka, R. C. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*, **369**(6480):486–488, Jun 1994.
- [152] Murase, S., Mosser, E., and Schuman, E. M. Depolarization drives beta-Catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function. *Neuron*, **35**(1):91–105, Jul 2002.
- [153] Murphy, D. D. and Segal, M. Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J. Neurosci.*, **16**(13):4059–4068, Jul 1996.
- [154] Nagerl, U. V., Kostinger, G., Anderson, J. C., Martin, K. A., and Bonhoeffer, T. Protracted synaptogenesis after activity-dependent spinogenesis in hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, **27**(30):8149–8156, Jul 2007.
- [155] Newpher, T. M. and Ehlers, M. D. Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends Cell Biol.*, **19**(5):218–227, May 2009.
- [156] NÄagerl, U. V., Eberhorn, N., Cambridge, S. B., and Bonhoeffer, T. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*, **44**(5):759–767, Dec 2004.
- [157] Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J. N., and Helmchen, F. Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat. Methods*, **1**(1):31–37, Oct 2004.
- [158] Noble, W., Planel, E., Zehr, C., Olm, V., Meyerson, J., Suleman, F., Gaynor, K., Wang, L., LaFrancois, J., Feinstein, B., Burns, M., Krishnamurthy, P., Wen, Y., Bhat, R., Lewis, J., Dickson, D., and Duff, K. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**(19):6990–6995, May 2005.
- [159] Nusse, R. List of target genes of Wnt/beta-catenin signaling. *Stanford University*, 2009. <http://www.stanford.edu/~rnutse/pathways/targets.html>, Zugriff: Jan 2013.
- [160] O'Driscoll, C., Wallace, D., and Cotter, T. G. bFGF promotes photoreceptor cell survival in vitro by PKA-mediated inactivation of glycogen synthase kinase 3beta and CREB-dependent Bcl-2 up-regulation. *J. Neurochem.*, **103**(3):860–870, Nov 2007.
- [161] Okamoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A., and Hayashi, Y. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat. Neurosci.*, **7**(10):1104–1112, Oct 2004.
- [162] Okuda, T., Yu, L. M., Cingolani, L. A., Kemler, R., and Goda, Y. beta-Catenin regulates excitatory postsynaptic strength at hippocampal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**(33):13479–13484, Aug 2007.
- [163] Ostroff, L. E., Fiala, J. C., Allwardt, B., and Harris, K. M. Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron*, **35**(3):535–545, Aug 2002.
- [164] Peineau, S., Bradley, C., Taghibiglou, C., Doherty, A., Bortolotto, Z. A., Wang, Y. T., and Collingridge, G. L. The role of GSK-3 in synaptic plasticity. *Br. J. Pharmacol.*, **153** Suppl 1:S428–437, Mar 2008.
- [165] Peineau, S., Nicolas, C. S., Bortolotto, Z. A., Bhat, R. V., Ryves, W. J., Harwood, A. J., Dournaud, P., Fitzjohn, S. M., and Collingridge, G. L. A systematic investigation of the protein kinases involved in NMDA receptor-dependent LTD: evidence for a role of GSK-3 but not other serine/threonine kinases. *Mol Brain*, **2**:22, 2009.
- [166] Peineau, S., Taghibiglou, C., Bradley, C., Wong, T. P., Liu, L., Lu, J., Lo, E., Wu, D., Saule, E., Bouschet, T., Matthews, P., Isaac, J. T., Bortolotto, Z. A., Wang, Y. T., and Collingridge, G. L. LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron*, **53**(5):703–717, Mar 2007.
- [167] Peng, Y. R., He, S., Marie, H., Zeng, S. Y., Ma, J., Tan, Z. J., Lee, S. Y., Malenka, R. C., and Yu, X. Coordinated changes in dendritic arborization and synaptic strength during neural circuit development. *Neuron*, **61**(1):71–84, Jan 2009.
- [168] Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., VanLeeuwen, J. E., and Woolfrey, K. M. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.*, **14**(3):285–293, Mar 2011.
- [169] Perez-Costas, E., Gandy, J. C., Melendez-Ferro, M., Roberts, R. C., and Bijur, G. N. Light and electron microscopy study of glycogen synthase kinase-3beta in the mouse brain. *PLoS ONE*, **5**(1):e8911, 2010.
- [170] Peters, A. and Kaiserman-Abramof, I. R. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am. J. Anat.*, **127**(4):321–355, Apr 1970.
- [171] Pfeiffer, B. E. and Huber, K. M. Fragile X mental retardation protein induces synapse loss through acute postsynaptic translational regulation. *J. Neurosci.*, **27**(12):3120–3130, Mar 2007.
- [172] Prickaerts, J., Moechars, D., Cryns, K., Lenaerts, I., Craenendonck, H. van, Goris, I., Daneels, G., Bouwknecht, J. A., and Steckler, T. Transgenic mice overexpressing glycogen synthase kinase 3beta: a putative model of hyperactivity and mania. *J. Neurosci.*, **26**(35):9022–9029, Aug 2006.
- [173] Cajal, S. Ramon y. Estructura de los centros nervioso de las aves. *Rev Trim Hitol norm Pat*, **1**:1–10, 1888.
- [174] Cajal, S. Ramon y. Neue Darstellung vom histologischen Bau des Centralnervensystems. *Arch Anat Physiol*, **17**:9–428, 1893.

- [175] Rampon, C., Tang, Y. P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kynin, M., and Tsien, J. Z. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat. Neurosci.*, **3**(3):238–244, Mar 2000.
- [176] Rema, V., Armstrong-James, M., Jenkinson, N., and Ebner, F. F. Short exposure to an enriched environment accelerates plasticity in the barrel cortex of adult rats. *Neuroscience*, **140**(2):659–672, Jun 2006.
- [177] Richard, C. Encyclopedia of Neuroscience, chapter Two-Photon Imaging, pages 1221–1229. Elsevier Ltd., 2009. <http://www.sciencedirect.com/science/referenceworks/9780080450469>, Zugriff: Jan 2013.
- [178] "Roddenberry, G.". Star Trek: Insurrection. *Memory Alpha*, 1998. http://en.memory-alpha.org/wiki/Star_Trek:_Insurrection, Zugriff: Jan 2013.
- [179] ROSENZWEIG, M. R., KRECH, D., BENNETT, E. L., and DIAMOND, M. C. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *J Comp Physiol Psychol*, **55**:429–437, Aug 1962.
- [180] Sala, C., Piech, V., Wilson, N. R., Passafaro, M., Liu, G., and Sheng, M. Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron*, **31**(1):115–130, Jul 2001.
- [181] Sanchez, C., Perez, M., and Avila, J. GSK3beta-mediated phosphorylation of the microtubule-associated protein 2C (MAP2C) prevents microtubule bundling. *Eur. J. Cell Biol.*, **79**(4):252–260, Apr 2000.
- [182] Savonenko, A. V., Melnikova, T., Laird, F. M., Stewart, K. A., Price, D. L., and Wong, P. C. Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**(14):5585–5590, Apr 2008.
- [183] Scales, T. M., Lin, S., Kraus, M., Goold, R. G., and Gordon-Weeks, P. R. Nonprimed and DYRK1A-primed GSK3 beta-phosphorylation sites on MAP1B regulate microtubule dynamics in growing axons. *J. Cell. Sci.*, **122**(Pt 14):2424–2435, Jul 2009.
- [184] Scanziani, M., Capogna, M., Gähwiler, B. H., and Thompson, S. M. Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron*, **9**(5):919–927, Nov 1992.
- [185] Segal, M. Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability. *Eur. J. Neurosci.*, **31**(12):2178–2184, Jun 2010.
- [186] Segal, M., Vlachos, A., and Korkotian, E. The spine apparatus, synaptopodin, and dendritic spine plasticity. *Neuroscientist*, **16**(2):125–131, Apr 2010.
- [187] Sereno, L., Coma, M., Rodriguez, M., Sanchez-Ferrer, P., Sanchez, M. B., Gich, I., Agullo, J. M., Perez, M., Avila, J., Guardia-Laguarta, C., Clarimon, J., Lleó, A., and Gomez-Isla, T. A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiol. Dis.*, **35**(3):359–367, Sep 2009.
- [188] Sfakianos, M. K., Eisman, A., Gourley, S. L., Bradley, W. D., Scheetz, A. J., Settleman, J., Taylor, J. R., Greer, C. A., Williamson, A., and Koleske, A. J. Inhibition of Rho via Arg and p190RhoGAP in the postnatal mouse hippocampus regulates dendritic spine maturation, synapse and dendrite stability, and behavior. *J. Neurosci.*, **27**(41):10982–10992, Oct 2007.
- [189] Sheng, M. and Greenberg, M. E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, **4**(4):477–485, Apr 1990.
- [190] Sheng, M. and Hoogenraad, C. C. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.*, **76**:823–847, 2007.
- [191] Sheng, M. and Kim, M. J. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science*, **298**(5594):776–780, Oct 2002.
- [192] Shi, Y. and Ethell, I. M. Integrins control dendritic spine plasticity in hippocampal neurons through NMDA receptor and Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated actin reorganization. *J. Neurosci.*, **26**(6):1813–1822, Feb 2006.
- [193] SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H., and SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea. *J Cell Comp Physiol*, **59**:223–239, Jun 1962.
- [194] Siegelbaum, S. A. and Kandel, E. R. Learning-related synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **1**(1):113–120, Jun 1991.
- [195] Song, B., Lai, B., Zheng, Z., Zhang, Y., Luo, J., Wang, C., Chen, Y., Woodgett, J. R., and Li, M. Inhibitory phosphorylation of GSK-3 by CaMKII couples depolarization to neuronal survival. *J. Biol. Chem.*, **285**(52):41122–41134, Dec 2010.
- [196] Spires, T. L., Meyer-Luehmann, M., Stern, E. A., McLean, P. J., Skoch, J., Nguyen, P. T., Bacskai, B. J., and Hyman, B. T. Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J. Neurosci.*, **25**(31):7278–7287, Aug 2005.
- [197] Stoothoff, W. H. and Johnson, G. V. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim. Biophys. Acta*, **1739**(2-3):280–297, Jan 2005.
- [198] Sutherland, C. What Are the bona fide GSK3 Substrates? *Int J Alzheimers Dis*, **2011**:505607, 2011.

- [199] Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D., and Tank, D. W. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature*, **385**(6612):161–165, Jan 1997.
- [200] Svoboda, K. and Yasuda, R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron*, **50**(6):823–839, Jun 2006.
- [201] Sztainberg, Y. and Chen, A. An environmental enrichment model for mice. *Nat Protoc*, **5**(9):1535–1539, Sep 2010.
- [202] Tada, T. and Sheng, M. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **16**(1):95–101, Feb 2006.
- [203] Tanzi, R. E. and Bertram, L. New frontiers in Alzheimer’s disease genetics. *Neuron*, **32**(2):181–184, Oct 2001.
- [204] Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., and Katzman, R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer’s disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.*, **30**(4):572–580, Oct 1991.
- [205] Thompson, R. Das Gehirn. Spektrum Akademischer Verlag, 2010.
- [206] Thornton, T. M., Pedraza-Alva, G., Deng, B., Wood, C. D., Aronshtam, A., Clements, J. L., Sabio, G., Davis, R. J., Matthews, D. E., Doble, B., and Rincon, M. Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science*, **320**(5876):667–670, May 2008.
- [207] Tian, Y., James, S., Zuo, J., Fritzsche, B., and Beisel, K. W. Conditional and inducible gene recombineering in the mouse inner ear. *Brain Res.*, **1091**(1):243–254, May 2006.
- [208] Togashi, H., Abe, K., Mizoguchi, A., Takaoka, K., Chisaka, O., and Takeichi, M. Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron*, **35**(1):77–89, Jul 2002.
- [209] Tortosa, E., Montenegro-Venegas, C., Benoist, M., Hartel, S., Gonzalez-Billault, C., Esteban, J. A., and Avila, J. Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is required for dendritic spine development and synaptic maturation. *J. Biol. Chem.*, **286**(47):40638–40648, Nov 2011.
- [210] Trachtenberg, J. T., Chen, B. E., Knott, G. W., Feng, G., Sanes, J. R., Welker, E., and Svoboda, K. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, **420**(6917):788–794, 2002.
- [211] Trivedi, N., Marsh, P., Goold, R. G., Wood-Kaczmar, A., and Gordon-Weeks, P. R. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation of MAP1B at Ser1260 and Thr1265 is spatially restricted to growing axons. *J. Cell. Sci.*, **118**(Pt 5):993–1005, Mar 2005.
- [212] Tropea, D., Majewska, A. K., Garcia, R., and Sur, M. Structural dynamics of synapses in vivo correlate with functional changes during experience-dependent plasticity in visual cortex. *J. Neurosci.*, **30**(33):11086–11095, Aug 2010.
- [213] Tsvetkov, A. S., Samsonov, A., Akhmanova, A., Galjart, N., and Popov, S. V. Microtubule-binding proteins CLASP1 and CLASP2 interact with actin filaments. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **64**(7):519–530, Jul 2007.
- [214] Twyman, R.M. Encyclopedia of Neuroscience, chapter Wnt Pathway and Neural Patterning, pages 497–502. Elsevier Ltd., 2009. <http://www.sciencedirect.com/science/referenceworks/9780080450469>, Zugriff: Jan 2013.
- [215] Praag, H. van, Kempermann, G., and Gage, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.*, **1**(3):191–198, Dec 2000.
- [216] Wagner, U., Utton, M., Gallo, J. M., and Miller, C. C. Cellular phosphorylation of tau by GSK-3 beta influences tau binding to microtubules and microtubule organisation. *J. Cell. Sci.*, **109** (Pt 6):1537–1543, Jun 1996.
- [217] Waxham, M.N. Encyclopedia of Neuroscience, chapter Calcium-Calmodulin Kinase II (CaMKII) in Learning and Memory, pages 581–588. Elsevier Ltd., 2009. <http://www.sciencedirect.com/science/referenceworks/9780080450469>, Zugriff: Jan 2013.
- [218] Wilbrecht, L., Holtmaat, A., Wright, N., Fox, K., and Svoboda, K. Structural plasticity underlies experience-dependent functional plasticity of cortical circuits. *J. Neurosci.*, **30**(14):4927–4932, Apr 2010.
- [219] Woo, T. U., Whitehead, R. E., Melchitzky, D. S., and Lewis, D. A. A subclass of prefrontal gamma-aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**(9):5341–5346, Apr 1998.
- [220] Woodgett, J. R. Regulation and functions of the glycogen synthase kinase-3 subfamily. *Semin. Cancer Biol.*, **5**(4):269–275, Aug 1994.
- [221] Woodgett, J. R. Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci. STKE*, **2001**(100):re12, Sep 2001.
- [222] Woolley, C. S. and McEwen, B. S. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **336**(2):293–306, Oct 1993.
- [223] Wu, D. and Pan, W. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem. Sci.*, **35**(3):161–168, Mar 2010.
- [224] Wu, Q., DiBona, V. L., Bernard, L. P., and Zhang, H. The polarity protein partitioning-defective 1 (PAR-1) regulates dendritic spine morphogenesis through phosphorylating postsynaptic density protein 95 (PSD-95). *J. Biol. Chem.*, **287**(36):30781–30788, Aug 2012.
- [225] Xiao, B., Tu, J. C., and Worley, P. F. Homer: a link between neural activity and glutamate receptor function. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **10**(3):370–374, Jun 2000.
- [226] Xu, T., Yu, X., Perlik, A. J., Tobin, W. F., Zweig, J. A., Tennant, K., Jones, T., and Zuo, Y. Rapid formation and

- selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature*, **462**(7275):915–919, Dec 2009.
- [227] Yamahachi, H., Marik, S. A., McManus, J. N., Denk, W., and Gilbert, C. D. Rapid axonal sprouting and pruning accompany functional reorganization in primary visual cortex. *Neuron*, **64**(5):719–729, Dec 2009.
- [228] Yang, G., Pan, F., and Gan, W. B. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*, **462**(7275):920–924, Dec 2009.
- [229] Yang, G., Pan, F., Parkhurst, C. N., Grutzendler, J., and Gan, W. B. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nat Protoc*, **5**(2):201–208, Feb 2010.
- [230] Young, P., Qiu, L., Wang, D., Zhao, S., Gross, J., and Feng, G. Single-neuron labeling with inducible Cre-mediated knockout in transgenic mice. *Nat. Neurosci.*, **11**(6):721–728, Jun 2008.
- [231] Yuste, R. *Dendritic Spines*. The MIT Press, 2010.
- [232] Yuste, R. Dendritic spines and distributed circuits. *Neuron*, **71**(5):772–781, Sep 2011.
- [233] Yuste, R. and Denk, W. Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature*, **375**(6533):682–684, Jun 1995.
- [234] Yuste, R., Majewska, A., and Holthoff, K. From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nat. Neurosci.*, **3**(7):653–659, Jul 2000.
- [235] Zhou, Q., Homma, K. J., and Poo, M. M. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, **44**(5):749–757, Dec 2004.
- [236] Zhu, L. Q., Liu, D., Hu, J., Cheng, J., Wang, S. H., Wang, Q., Wang, F., Chen, J. G., and Wang, J. Z. GSK-3 beta inhibits presynaptic vesicle exocytosis by phosphorylating P/Q-type calcium channel and interrupting SNARE complex formation. *J. Neurosci.*, **30**(10):3624–3633, Mar 2010.
- [237] Zhu, L. Q., Wang, S. H., Liu, D., Yin, Y. Y., Tian, Q., Wang, X. C., Wang, Q., Chen, J. G., and Wang, J. Z. Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments. *J. Neurosci.*, **27**(45):12211–12220, Nov 2007.
- [238] Ziv, N. E. and Smith, S. J. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*, **17**(1):91–102, Jul 1996.
- [239] Zuo, Y., Lin, A., Chang, P., and Gan, W. B. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron*, **46**(2):181–189, Apr 2005.
- [240] Zuo, Y., Yang, G., Kwon, E., and Gan, W. B. Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature*, **436**(7048):261–265, Jul 2005.

7 Anhang

Die chemischen Elementsymbole wurden entsprechend den IUPAC-Richtlinien annotiert.

Präfixe		
Kürzel	Bedeutung	Umrechnungsfaktor
M	Mega	10^6
k	Kilo	10^3
c	Centi	10^{-2}
m	Milli	10^{-3}
μ	Mikro	10^{-6}
n	Nano	10^{-9}
p	Pico	10^{-12}
f	Femto	10^{-15}

Symbole	
Kürzel	Bedeutung
%	Prozent
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
\emptyset	Durchmesser, Durchschnitt
=	ist gleich
:=	ist definiert als
\pm	plusminus
\approx	näherungsweise
\leq	kleiner gleich
\geq	größer gleich
<	kleiner als
>	größer als
α	Alpha
β	Beta
λ	Lambda
μ	Mü
∞	Unendlich

Abkürzungen	
Abkürzung	Bedeutung
2P	Zwei-Photonen
A	Adenin
A	Ampère (elektrische Stromstärke)
Abb.	Abbildung(en)
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
AICD	APP intracellular domain
Amp	Ampicillin
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANOVA	analysis of variance
AOM	akustooptischer Modulator

APP	Amyloid-Precursor-Protein
AR-A	Siehe AR-A014418
AR-A014418	ATP kompetitiver GSK-3 Inhibitor
ATP	Adenosintriphosphat
AVR	Atmel Mikroprozessor der RISC-Architektur
A β	Amyloid β
BACE1	β -site of APP cleaving enzyme
BL/6	C57BL/6, Labormaus-Linie
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C	Programmiersprache C
C#	Programmiersprache C#
C++	Programmiersprache C++
Ca ²⁺	Calciumionen
CA1	Hippocampale Region mit dem Namen Cornu Ammonis
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Protein-Kinasell
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
catnb	β -Catenin-Gen
ca.	circa
CRE	cAMP response element
Cre	cyclization recombination
Cre-ER ^{T2}	Besondere, durch Tamoxifen aktivierbare Form der Cre-Rekombinase
CRMP	Collapsin response mediator protein
CSV	Comma-Separated Values
Cx, CX	(Somatosensorischer) Cortex
d	day
dd	zweimal destilliert
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, ein Zellkernmarker
DISC1	Disrupted in schizofrenia
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTOR	Daily turnover rate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Enriched Environment
EK(H)	Einzelkäftig(-haltung)
engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	Mitglied der MAPK-Familie
EtOH	Ethanol
et al.	et alii
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
f	Filopodium
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FTDP-17	frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus verknüpft mit Chromosom 17
G	Guanin
g	Gramm
GaAsP	Gallium arsenide phosphide
(e)GFP	(Enhanced) Green Fluorescent Protein
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase 3
h	Stunden
HSP90	Hitze-Schock-Protein 90
http	Hypertext Transfer Protocol

IC	Integrated circuit
IHC	Immunhistochemie
I ² C	Inter-IC-Bus
ID	Identifikator
i.p.	Intraperitoneal
IR	Infrarot
ISO	International Organization for Standardization
ISP	In-System-Programmierung
IT	Informationstechnik
IVC	individual ventilated cage
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
kb	Kilobasen
KO	Knockout
Konz.	Konzentration
KU	Katholieke Universiteit
l, L	Liter
lat.	lateinisch
LC(D)	Liquid Crystal (Display)
LEF	Lymphoid enhancer-binding factor
LM	Lösungsmittel
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LoxP	Basensequenz, die von der Cre-Rekombinase erkannt wird
LP	Langpassfilter
Lsg.	Lösung
LSM	laser scanning microscopy
LTD	long-term depression
LTP	long-term potentiation
M	Molar
m	Meter
m	Mushroom
MAP1b	Microtubule-associated protein 1B
MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinasen
MAPT	Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau
mEPSC	miniature excitatory postsynaptic current
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
mind.	mindestens
mRNA	(messenger) Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NA	Numerische Apertur
NDD	non-descanned detector
NFκB	Nukleärer Faktor Kappa B
NMDA	N-Methy-D-Aspartat
OP	Operation (Medizin)
OVL	Overlay (Dateiformat)
p.a.	per analysis
PBS	phosphate buffered saline
PC	Personal computer
PCB	Printed Circuit Board, Leiterplatte
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PSD	Postsynaptische Dichte
PE	Polyethylen
PFA	Paraformaldehyd-Lösung oder Paraformaldehyd
pH	pondus hydrogenii (negativer, dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PKA	Protein-Kinase A
RISC	Reduced Instruction Set Computer
ROI	Region of interest

PMT	photomultiplier tube
PS1/2	Präsenilin1/2
PSD	Postsynaptic density
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunden
s	Stubby
SD	standard deviation
s. (u.)	siehe (unten)
sec.	Sekunde(n)
SlickV	Single-neuron labeling with inducible Cre-mediated knockout in transgenic mice strain V
SMD	Surface-mounted device
sog.	sogenannt
SQL	Structured Query Language
Std.	Stunde(n)
T	Thymin
T	Temperatur
t	Thin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCF	Transcriptionfactor 1
Thy-1	thymus cell antigen 1
TOR	siehe dTOR
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
URL	Universal Resource Locator
USA	United States of America
USB	Universal Serial Bus
üT	über Tag
u.v.m.	und viele mehr
UV	Ultraviolett
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v.a.	vor allem
vs.	versus
v/v	Volumenprozent (volume/volume)
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent (weight/volume)
www	World Wide Web
×	fach (z.B. 10× Objektiv)
YFP	Yellow fluorescent protein
z.T.	zum Teil
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
Ω	Ohm
.NET	Eine von Microsoft entwickelte Software-Plattform

7.1 Hardwareapplikation *Heizpad*

7.1.1 Schaltung

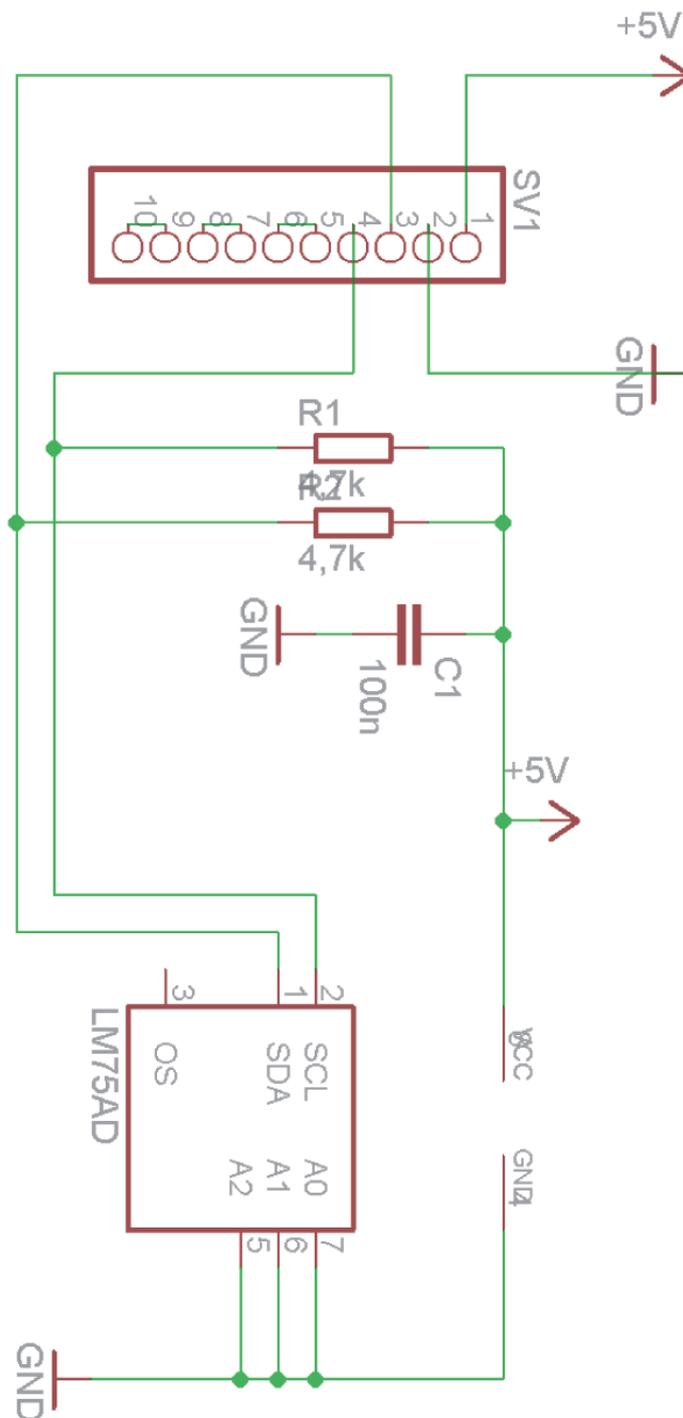


Abbildung 7.1: Elektrischer Schaltkreis der Heizwendel.

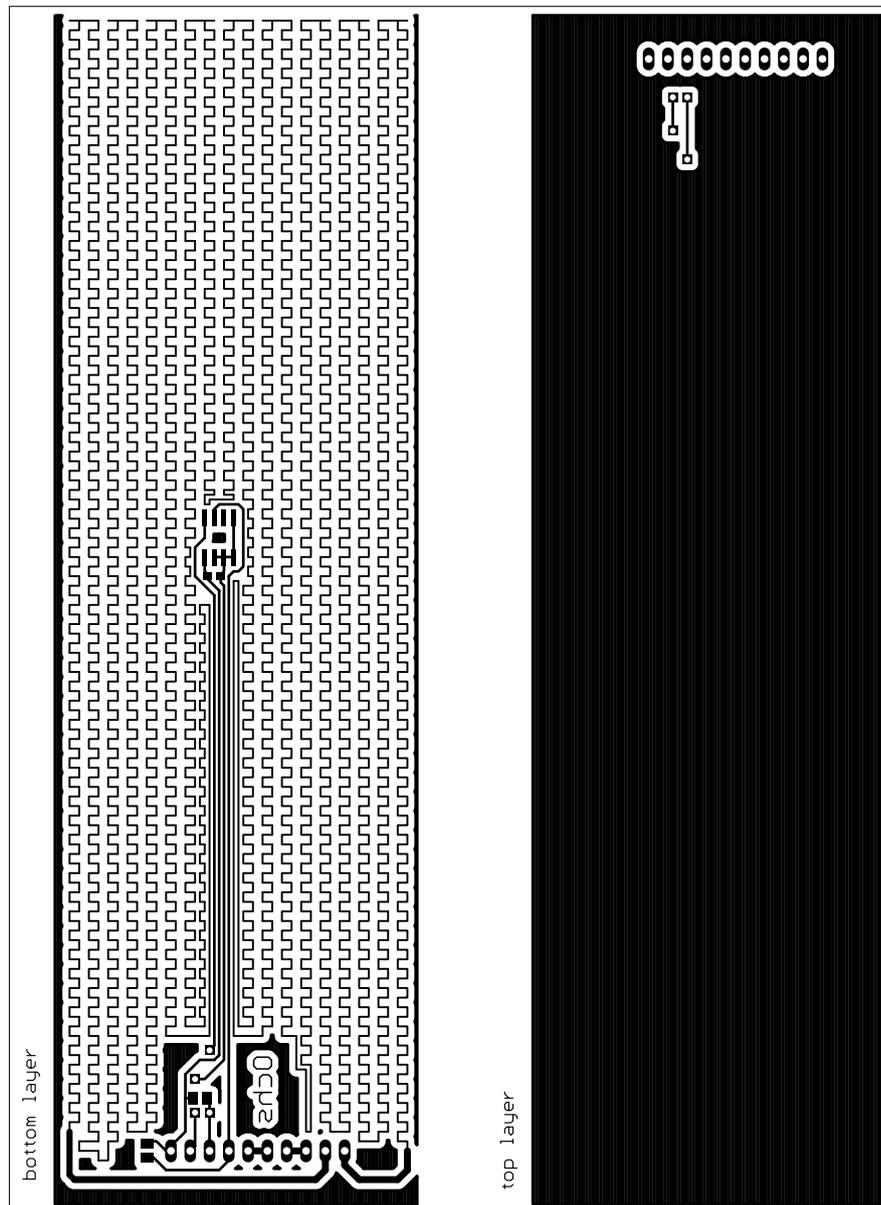


Abbildung 7.2: PCB-Layout der Heizwendel.

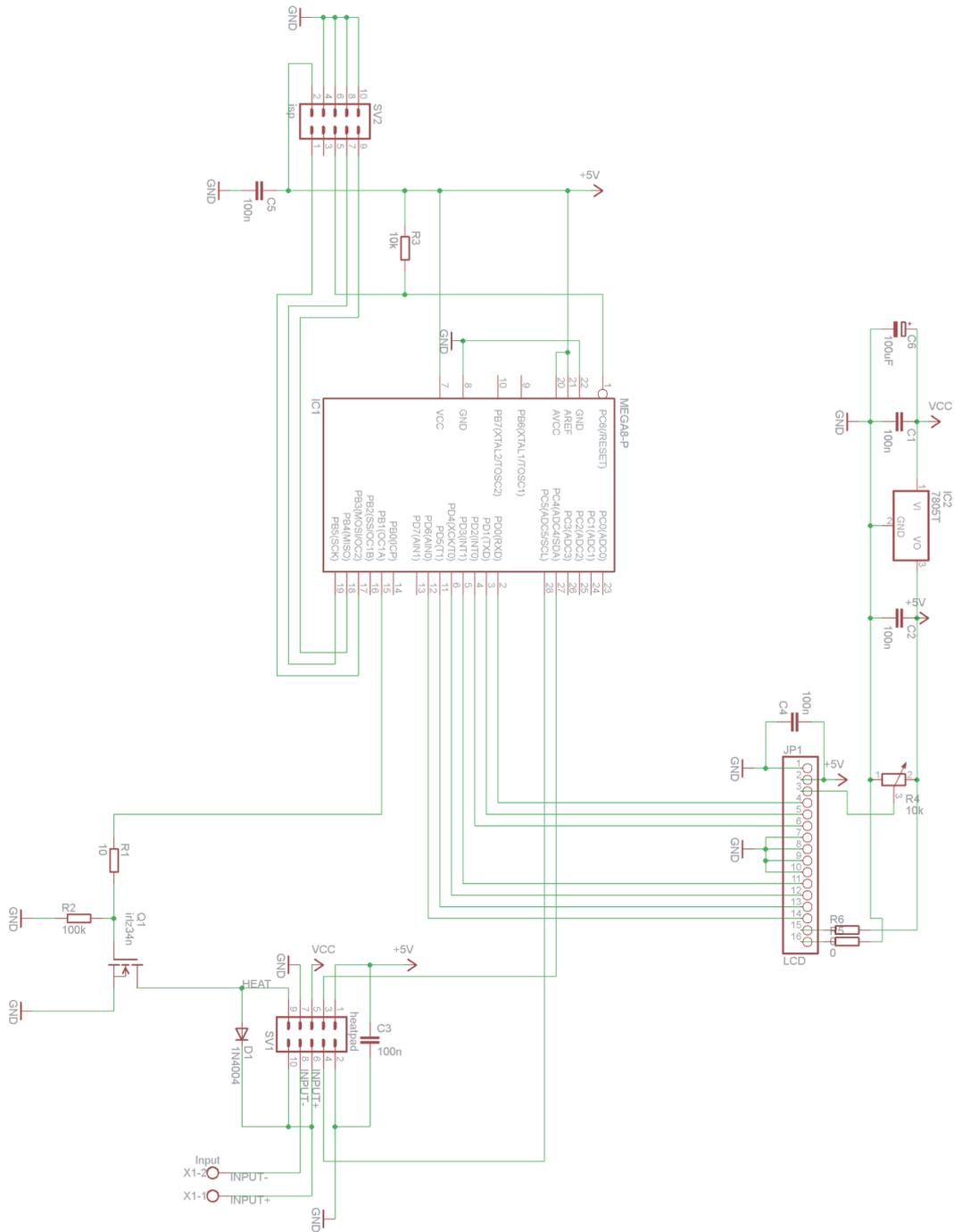


Abbildung 7.3: Elektrischer Schaltkreis der Mess- und Regel-Logik.

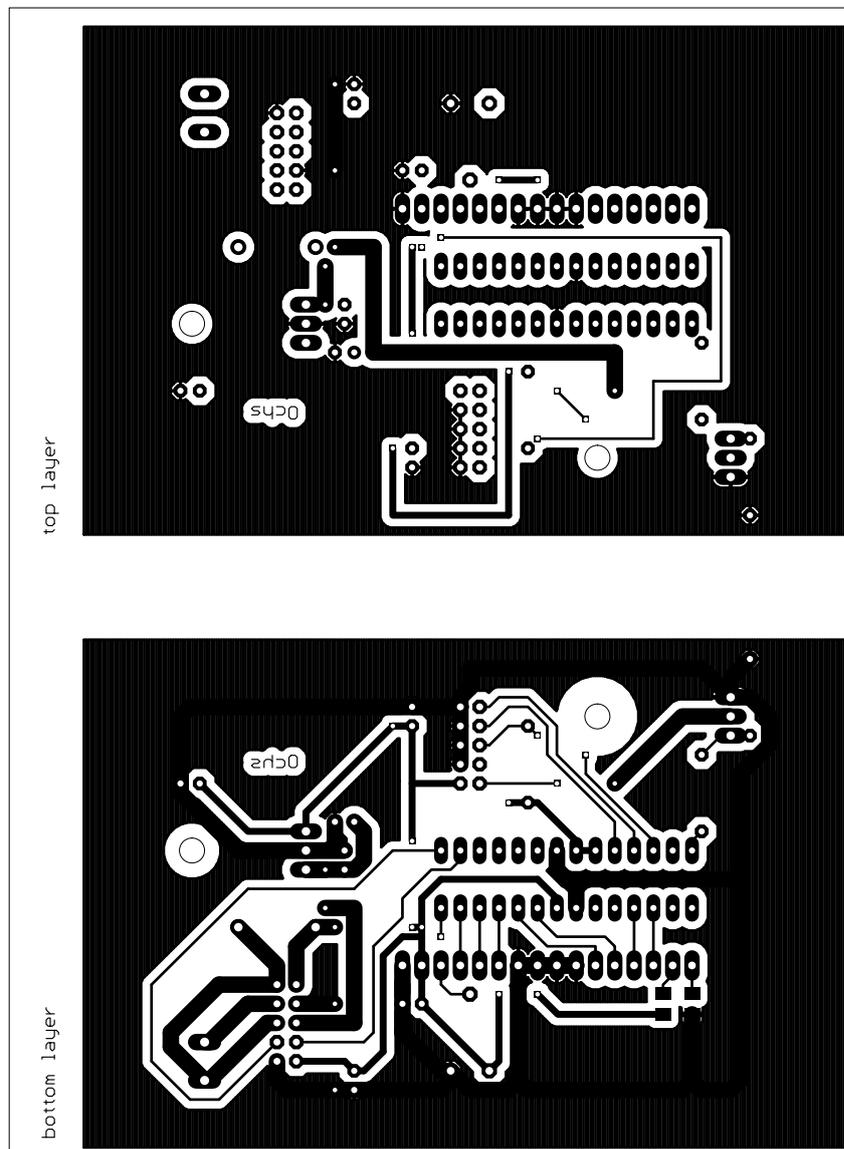


Abbildung 7.4: PCB-Layout der Mess- und Regel-Logik.

7.1.2 Quelltext

main.c:

```
1 /*
2  * HEIZPAD
3  * Copyright Simon M. Ochs, 2013
4  * In line with the Gnu Public Licence I agree with redistribution and modification
      of my code as long as you do no harm.
5  */
6
7 //runs with internal clock, frequency defined in makefile
8 //#define F_CPU 8000000UL
9 #include <avr/io.h>
10 #include <stdlib.h>
11 #include <util/delay.h>
12 #include <avr/wdt.h>
13
14 #include "lcd.c"
15 #include "lcd.h"
16 #include "twimaster.c"
17 #include "i2cmaster.h"
18
19 //blank line for lcd
20 #define LCD_LINE " "
21 //address of the temp sensor
22 #define LM75 0x90
23 //set temperature in degree celsius
24 #define SET_TEMP 37.0
25 //temperature at heating coil higher than at the sensor. Define difference bias in
      degree celsius
26 #define HEATER_BIAS 1
27
28 void lcd_clrln(void);
29
30 //empty second line on lcd
31 void lcd_clrln()
32 {
33     lcd_gotoxy(0,1);
34     lcd_puts_P(LCD_LINE);
35     lcd_gotoxy(0,1);
36     return;
37 }
38
39 int main( void )
40 {
41     // vars:
42     unsigned char ret;
43     uint8_t heating = 0;
44     uint8_t hyst = 1;
45     int8_t iic_temp;
46     int8_t iic_decimal;
47     float Temp;
48     char buffer[20];
49
50     //enable display
```

```
51     lcd_init(LCD_DISP_ON);
52     lcd_clrscr();
53
54     //start the system, init the iic sensor
55     lcd_puts_P("Ochs 2012.\nv1.0");
56     for (uint8_t i = 0; i < 200; i++)
57     {
58         _delay_ms(10);
59
60         if (i == 100)
61         {
62             lcd_clrln();
63             lcd_puts_P("Starting");
64         }
65
66         if (i == 130)
67         {
68             //heating coil attached to PD6, set output low
69             DDRD = (1 << DDD6);
70             PORTD &= ~(1<<PD6);
71             lcd_puts_P(".");
72         }
73
74         if (i == 160)
75         {
76             //init iic interface
77             i2c_init();
78             lcd_puts_P(".");
79         }
80
81         if (i == 190)
82         {
83             //try to reach sensor on iic bus
84             ret=i2c_start(LM75+I2C_WRITE);
85
86             //when no answer from iic bus, show error and halt
87             if (ret)
88             {
89                 PORTD &= ~(1<<PD6);
90                 lcd_clrln();
91                 lcd_puts_P("LM75 missing!");
92                 i2c_stop();
93                 for(;;);
94             }
95
96             lcd_puts_P(". OK");
97         }
98     }
99
100     //clear display.
101     lcd_clrscr();
102
103     //enable watchdog timer to two seconds: on system failure or program crash
104     //the avr will be restarted after 2 secs
105     wdt_enable(WDTO_2S);
106
107     //show explanation in first line on display
```

```

108     lcd_puts_P("SOLL IST HEIZE\n");
109
110     //endless loop
111     while(1)
112     {
113         //wait one sec
114         for (int i=0; i<100; i++) _delay_ms(10);
115         lcd_clrln();
116
117         //try to reach sensor on bus
118         ret=i2c_start(LM75+I2C_WRITE);
119
120         //show error and halt system when sensor not replying
121         if(ret)
122         {
123             //assure heating coil is inactive , PD6 = low.
124             PORTD &= ~(1<<PD6);
125             lcd_clrln();
126             lcd_puts_P("Err:LM75 missing");
127             i2c_stop();
128             for(;;);
129         }
130         else
131         {
132             //write pointer of temperature register in sensor (=0)
133             i2c_write(0x00);
134             //init iic bus to read mode using device address of te
            //sensor
135             i2c_rep_start(LM75+I2C_READ);
136             //read first byte (temperature) from temperature sensor
            //device from register (=0)
137             iic_temp = i2c_readAck();
138             //read second byte (decimal) from temperature sensor device
139             iic_decimal = i2c_readNak();
140             //release iic bus
141             i2c_stop();
142
143             //add the bias to the temperature
144             Temp = iic_temp + HEATER_BIAS;
145
146             //if a decimal was received from bus, add 0.5 degrees (
            //resolution of the sensor)
147             if(bit_is_set(iic_decimal, 7)) Temp += 0.5;
148
149             //show set/actual values on display
150             dtostrf( SET_TEMP, 4, 1, buffer );
151             lcd_puts(buffer);
152             lcd_puts_P(" ");
153             dtostrf( Temp, 4, 1, buffer );
154             lcd_puts(buffer);
155
156             //note: 0.00 is a hysteresis value which can be adapted to
            //any other value.
157             //activate heating coil when set temperature < , no
            //hysteresis behavior and heating coil is inactive
158             if ((Temp < SET_TEMP + 0.00) && heating == 0 && hyst == 0)
159             {

```

```

160         heating = 1;
161     }
162
163     //inactivate heating coil when temperature reached the set
    temperature. hysteresis behavior
164     if ((Temp >= SET_TEMP + 0.00))
165     {
166         heating = 0;
167         hyst = 1;
168     }
169
170     //temperature just dropped below the set temperature. exit
    hysteresis behavior
171     if ((Temp <= SET_TEMP - 0.00 ))
172     {
173         hyst = 0;
174     }
175
176     //enable heating coil
177     if (heating == 1)
178     {
179         PORTD |= (1<<PD6);
180         lcd_puts_P(" [x]");
181     }
182     //disable heating coil
183     else
184     {
185         PORTD &= ~(1<<PD6);
186         lcd_puts_P(" [ ]");
187     }
188 }
189 //tell watchdog the program functions within normal parameters
190 wdt_reset();
191 }
192
193 //hopefully we never end up here ...
194 return 0;
195 }

```

Angaben im Makefile, die vom Standard abweichen:

```

1 # MCU name
2 MCU = atmega8
3
4 # Processor frequency
5 F_CPU = 8000000
6
7 # Programming hardware
8 AVRDUDE_PROGRAMMER = avr910
9
10 # Programmer port
11 AVRDUDE_PORT = com1

```

Die Kompilierung des Programms und die Übertragung in den Flash-Speicher des AVR gelang durch die Eingabe folgender Befehle in die Kommandozeile:

```
make clean
make all
make program
```

7.2 Softwareapplikation *SpineMiner(XT)*

Die Quelltexte für SpineMiner und SpineMinerXT umfassen mehrere tausend Zeilen Quelltext, auf deren Aufnahme in diese Arbeit verzichtet wurde. Stattdessen wurden die Quelltexte, build Optionen und die zugehörigen Ressourcen als GitHub-Repository veröffentlicht. Über Releases stehen auch vorkompilierte ausführbare Dateien zum Download zur Verfügung.

SpineMiner: <https://github.com/siochs/SpineMiner>

SpineMinerXT: <https://github.com/siochs/SpineMinerXT>

In folgender Abbildung 7.5 ist die Algorithmik des Programms schematisch abgebildet.

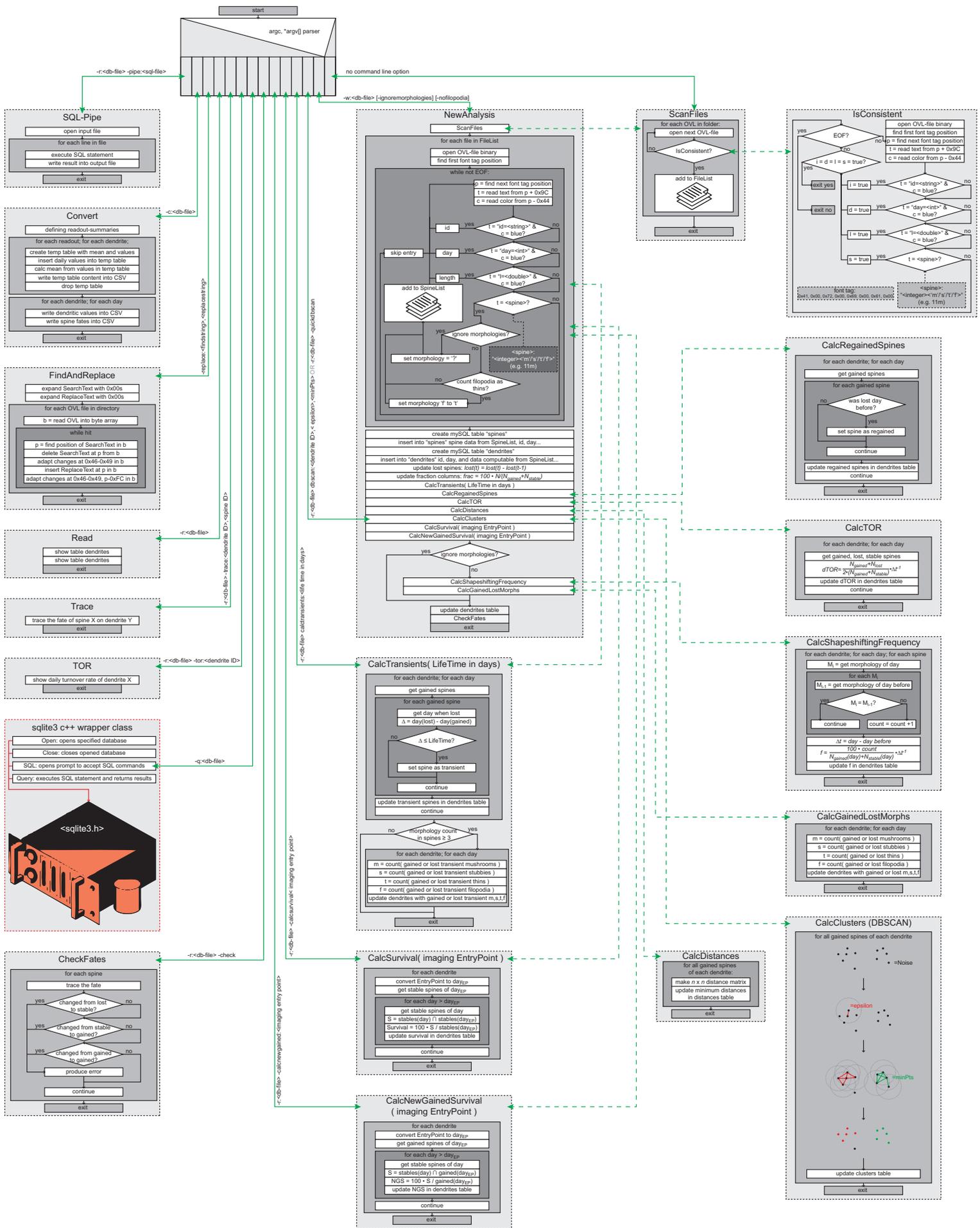


Abbildung 7.5: Algorithmik von SpineMiner.

8 Danksagung

Ich bedanke mich besonders bei Prof. Dr. Jochen Herms. Er vergab mir dieses interessante Promotionsprojekt, brachte mir viel Vertrauen entgegen und war mir stets ein guter Mentor. Ich weiß besonders zu schätzen, dass er mir meiner Kreativität freien Lauf ließ und mich auch bei meinen „Basteleien“ unterstützte.

Ich danke Prof. Dr. Rainer Uhl, der sich großzügig bereit erklärt hat, meine Doktorarbeit an der biologischen Fakultät der LMU zu vertreten. Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Dr. Hans Kretzschmar für die Aufnahme an seinem Institut und Prof. Dr. Fred van Leuven, der das *Neuro.GSK-3*-Projekt ins Leben rief und ein sehr inspirierendes Umfeld schuf.

Ich möchte an dieser Stelle Dr. Mario Dorostkar danken, der stets ein offenes Ohr für mich hatte und mit Rat und Tat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ich bedanke mich bei Dr. Gayane Aramuni für die Durchführung der Elektrophysiologie-Experimente. Vielen Dank an die AG Schüler für die β -Catenin-Mäuse. Ich danke Sonja S., Eric und Alan für die tatkräftige Unterstützung sowie dem Tierstall für die Betreuung meiner Maus-Linien. Bedanken möchte ich mich aber auch bei allen anderen Mitgliedern der AG Herms, für ihr Feedback und das sehr positive Laborklima. Danke an Sonja und Berni fürs Korrekturlesen.

Besonderer Dank gilt meiner Familie für den beständigen Rückhalt in jeder Situation. Ich danke Dir, Saskia, dass es Dich gibt und Du mich in schweren Zeiten aufgerichtet und motiviert hast. Ihr seid mir die wichtigsten Menschen und deshalb möchte ich Euch diese Arbeit widmen.

9 Lebenslauf und Eigene Publikationen

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Fassung entfernt.

Publikationen

Ochs SM, Dorostkar M, Aramuni G, Schön C, Filser S, Pöschl J, Kremer A, Van Leuven F, Herms J. Loss of neuronal GSK3 beta reduces dendritic spine stability and alters synaptic transmission via beta-catenin. *In Review bei Nature Molecular Psychiatry*. Aug 2013.

Ochs SM, Dean AC, Herms J. A novel database assisted strategy illuminates new characteristics of dendritic spine dynamics in vivo. *Manuscript in Vorbereitung*. Aug 2013.

Hoffmann NA, Schön C, **Ochs SM**, Dorostkar M, Burgold S, Goedert M, Herms J. Cortical dendritic spine pathology in a tauopathy mouse model is independent from insoluble tau-aggregates. *In Review bei Acta Neuropathol*. Aug 2013.

Ochs SM. SpineMiner - an Image Overlay Processor. *Open source GitHub repositories*. <https://github.com/siochs/SpineMiner>. Aug. 2013.

Ochs SM. SpineMinerXT - SpineMiner GUI Extension for Windows. *Open source GitHub repositories*. <https://github.com/siochs/SpineMinerXT>. Aug. 2013.

Schön C, Hoffmann NA, **Ochs SM**, Burgold S, Filser S, Steinbach S, Seeliger MW, Arzberger T, Goedert M, Kretschmar HA, Schmidt B, Herms J. Long-term in vivo imaging of fibrillar tau in the retina of P301S transgenic mice. *PLoS One*. **7(12)**:e53547. Dec 2012.

Ochs SM, Dorostkar M, Van Leuven F, Herms J. GSK3 beta is a critical regulator of dendritic spine density. *Poster 42nd SfN Meeting, New Orleans*. Oct 2012.

Ochs SM, Thumann S, Richau R, Weirauch MT, Lowe TM, Thomm M, Hausner W. Activation of archaeal transcription mediated by recruitment of transcription factor B. *J Biol Chem*. **25**;287(22):18863-71. Apr 2011.

Bittner T, Fuhrmann M, Burgold S, **Ochs SM**, Hoffmann N, Mitteregger G, Kretschmar H, LaFerla FM, Herms J. Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *PLoS One*. **5(11)**:e15477. Nov 2010.