

Aus der
Institut für Klinische Neuroimmunologie
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Untersuchung der strukturellen Plastizität hippocampaler Somatostatin
exprimierender Interneurone am Tiermodell der
N-methyl-D-aspartat-Rezeptor Autoimmunenzephalitis**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Anna-Katherina Brauer

aus
München

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Dr. Sabine Liebscher
Zweites Gutachten: Prof. Dr. Arthur Liesz
Drittes Gutachten: Prof. Dr. Anna-Sophia Wahl-Ommer

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2025



Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Brauer, Anna-Katherina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchung der strukturellen Plastizität hippokampaler Somatostatin positiver Interneurone am Tiermodell der N-methyl-D-aspartat-Rezeptor Autoimmunenkephalitis

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 18.09.25

Ort, Datum

Anna-Katherina Brauer

Unterschrift Anna-Katherina Brauer

Eidesstattliche Versicherung

Stand: 19.07.2024



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Brauer, Anna-Katherina

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

**Untersuchung der strukturellen Plastizität hippokampaler Somatostatin positiver Interneurone
am Tiermodell der N-methyl-D-aspartat-Rezeptor Autoimmunenkephalitis**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 18.09.25

Ort, Datum

Anna-Katherina Brauer

Unterschrift Anna-Katherina Brauer

Übereinstimmung abgegebener Exemplare

Stand: 20.12.2024

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VIII
Abstract	X
1 Einleitung	1
1.1 <i>NMDAR-Enzephalitis</i>	1
1.1.1 N-methyl-D-aspartat-Rezeptoren	1
1.1.2 Die klinische Manifestation und Behandlung von Anti-NMDAR Autoimmunenzephalitis ...	2
1.1.3 Molekulare Mechanismen der NMDAR AE	4
1.1.4 Ein Mausmodell der NMDAR AE	6
1.2 <i>Der Hippokampus</i>	6
1.2.1 Die Schichten des CA 1	7
1.2.2 Inhibitorische Interneurone und ihre Schaltkreise	9
1.2.3 PV-exprimierende Interneurone	9
1.2.4 SST-exprimierende Interneurone	10
1.2.5 5- Hydroxytryptamine Rezeptor -3a (5-HT3aR)-exprimierende Nervenzellen	11
1.2.6 Synaptische Plastizität	12
1.2.7 Dendritische Dornen.....	13
1.2.8 Zwei-Photonen Mikroskopie	15
1.3 <i>Die Auswirkung einer NMDAR Dysfunktion auf neuronale Schaltkreise</i>	15
1.3.1 NMDAR Hypofunktion- Was wissen wir aus anderen Erkrankungen?	15
1.3.2 NMDAR auf inhibitorischen Interneuronen – Eine andere Beeinflussung durch andere Rezeptoreigenschaften?	17
1.3.3 Beeinflussung inhibitorischer Interneurone durch NMDAR Autoantikörper	18
1.3.4 Mikroglia	19
1.4 <i>Zielsetzung</i>	21
2 Material und Methoden	23
2.1 <i>Methoden</i>	23
2.1.1 Humane monoklonale Antikörper	23
2.1.2 Mauslinie und Tierhaltung.....	23
2.1.3 Operation.....	23
2.1.3.1 Vorbereitung der miniosmotischen Pumpen	23
2.1.3.2 Implantation der intraventrikulären Katheter und des hippokampalen Fenster	24
2.1.3.3 Implantation der miniosmotischen Pumpe.....	27
2.1.4 Zwei-Photonen Mikroskopie	28
2.1.5 Kardiale Perfusion.....	29
2.1.6 Anfertigung von Gehirn-Schnitten.....	29
2.1.7 Immunfluoreszenz	30
2.1.8 Konfokale Mikroskopie	31
2.1.9 Bildprozessierung	33
2.1.10 Analyse der Bilddateien	33
2.1.11 Statistische Auswertung der Daten	35
2.2 <i>Material</i>	36
2.2.1 Mikroskope.....	36
2.2.2 Operationszubehör.....	36
2.2.3 Arzneistoffe	37
2.2.4 Antikörper.....	38
2.2.5 Programme	38
3 Ergebnisse	40
3.1 <i>Mausmodell der NMDAR AE</i>	40

3.2	<i>Zunahme der Dornendichte und Dichte der stummelförmigen Dornen auf SST-Interneuronen nach NMDAR AK Infusion.....</i>	40
3.3	<i>Unveränderte Dornendichte und Dynamik dendritischer Dornen SST-exprimierender Interneurone in vivo.....</i>	42
3.4	<i>Aktivierung von Mikrogliazellen im Mausmodell der NMDAR AE</i>	44
3.5	<i>Abnahme der Internalisierung exzitatorischer präsynaptischer Fragmente durch Mikrogliazellen nach NMDAR AK Exposition</i>	46
4	Diskussion.....	48
4.1	<i>Zunahme der Dornendichte und der Dichte der stummelförmigen Dornen auf SST-Interneuronen nach NMDAR AK Exposition</i>	48
4.2	<i>Keine Veränderung der Dichte und des Dornenumsatzes SST-exprimierender Interneurone nach NMDAR AK Exposition in vivo.....</i>	55
4.3	<i>Aktivierung von Mikrogliazellen im Mausmodell der NMDAR AE</i>	59
4.4	<i>Reduzierte Lokalisation von vGlut1 in Mikrogliazellen – verminderte Interaktion von Mikroglia mit exzitatorischen präsynaptischen Elementen bei NMDAR AE?.....</i>	61
4.5	<i>Fazit und Ausblick.....</i>	65
5	Abkürzungsverzeichnis	67
6	Abbildungsverzeichnis	68
7	Tabellenverzeichnis	69
8	Autorenbeiträge	69
9	Literaturverzeichnis	70
10	Danksagung	93
11	Anhang	94
11.1	<i>Publikationsliste</i>	94
11.2	<i>Lebenslauf</i>	94

Zusammenfassung

Die N-methyl-D-aspartat-Rezeptor Autoimmunenzephalitis (NMDAR AE) ist eine erst kürzlich beschriebene Autoimmunerkrankung des Gehirns, die durch Autoantikörper gegen die GluN1 Untereinheit des NMDAR ausgelöst wird. Klinisch kommt es oft zu einem charakteristischen, phasenhaften Verlauf. Die Erkrankung beginnt häufig mit grippalen Beschwerden, bevor sich psychiatrische Symptome wie Persönlichkeitsveränderungen, Wahn oder Halluzinationen manifestieren. In diesem Stadium ist die Unterscheidung zu primär psychiatrischen Erkrankungen, wie der Schizophrenie, sehr schwierig. Weiterhin entwickeln sich neurologische Ausfälle, welche von Sprach- oder Gedächtnisstörungen bis hin zum Koma reichen. Betroffene müssen aufgrund der vital bedrohlichen neurologischen Manifestationen häufig wochenlang auf Intensivstation behandelt werden. Bei frühzeitigem Therapiebeginn bestehen sehr gute Heilungschancen. Trotzdem bleiben bei vielen PatientInnen lang anhaltende kognitive Defizite bestehen.

Die molekularen Pathomechanismen der Erkrankung sind bisher wenig untersucht. In humanen Autopsien sieht man unter anderem eine inflammatorische Reaktion mit starker Mikrogliaaktivierung im Hippokampus. Aus Zellkulturexperimenten ist bekannt, dass die Antikörperbindung an offenen NMDAR zu einer Verlinkung und Internalisation des NMDAR führt. Dies resultiert in einer Verminderung der oberflächlichen NMDAR Dichte und einer Reduktion der NMDAR abhängigen postsynaptischen Ströme und dementsprechend in einer NMDAR Hypofunktion. Zudem gibt es erste Hinweise, dass vor allem im Hippokampus neben den exzitatorischen Pyramidenzellen auch inhibitorische Interneurone betroffen sind. Insbesondere durch abweichende Rezeptoreigenschaften zwischen den Zelltypen könnten Interneurone anders durch NMDAR Antikörper beeinflusst werden. Eine Dysfunktion der inhibitorischen Interneurone könnte das feine Gleichgewicht zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Signalen im Hippokampus stören. Diese pathophysiologischen Veränderungen hippokampaler Schaltkreise bei NMDAR Autoimmunenzephalitis sind bisher kaum untersucht. Die Erforschung dieser inhibitorischen Schaltkreise ist für ein besseres Verständnis der Pathogenese der NMDAR Enzephalitis von großer Relevanz. Erkenntnisse über die Folgen der Antikörper induzierten Internalisierung der NMDAR könnten auch für andere, ebenfalls durch eine NMDAR Hypofunktion bedingte Erkrankungen des zentralen Nervensystems, wegweisend sein.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, die strukturellen Veränderungen dieser inhibitorischen Interneurone zu untersuchen. Der Fokus lag hierbei auf der Untersuchung von Somatostatin (SST) - exprimierenden Interneuronen, einer Untergruppe inhibitorischer Nervenzellen, die eine zentrale Rolle in Lern- und Gedächtnisprozessen spielt und in vielen neuropsychiatrischen Erkrankungen beeinträchtigt ist. Die Besonderheit dieser Interneurone ist, dass sie sogenannte dendritische Dornen (stachelartige Membranfortsätze) ausbilden. Dendritische Dornen beherbergen Postsynapsen - Veränderungen ihrer Dichte, Form und Dynamik können daher Hinweise auf eine Veränderung der Funktionalität und Konnektivität dieses Interneuronentypes sowie Störungen hippokampaler neuronaler Schaltkreise liefern. Zur Visualisierung der dendritischen Dornen nutzte ich eine transgene Mauslinie, welche ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) in SST-positiven Interneuronen exprimiert. Durch eine chronische Infusion von NMDAR Autoantikörpern in die Ventrikel von Mäusen wird ein Tiermodell der NMDAR AE generiert. Da im Hippokampus die maximale Antikörperbindung nachweisbar war, konzentrierte ich mich für meine

Untersuchungen auf die CA1 und CA2 Regionen des Hippokampus. In konfokalen Aufnahmen der Hirnschnitte zeigte sich eine Dichtezunahme der gesamten Dornen nach NMDAR Autoantikörper Infusion im Vergleich zu Kontrollantikörperinfusion. Bei einer Untersuchung der morphologischen Parameter imponierten kürzere Dornen mit kleineren Dornenköpfen in der NMDAR AE Gruppe. Dendritische Dornen können anhand ihrer Form in die Gruppen „stummelförmig“, „dünn“ und „pilzförmig“ eingeteilt werden. In der Analyse dieser Untergruppen konnte ich eine Zunahme der stummelförmigen Dornen nach NMDAR Autoantikörper Infusion beobachten. Dies zeigt, dass Postsynapsen auf SST-Interneuronen morphologische Anpassungen nach NMDAR Autoantikörper Exposition im Sinne einer Zunahme dendritischer Dornen durchlaufen, welche möglicherweise einen kompensatorischen Mechanismus auf die veränderte Netzwerkaktivität darstellen. Da Synapsen dynamische Strukturen sind, welche neugebildet werden oder verloren gehen können, untersuchte ich die Kinetik der dendritischen Dornen im Rahmen einer chronischen *in vivo* Zwei-Photonen mikroskopischen Studie. Hier ließ sich interessanterweise keine Veränderung der Dynamik und Umsatzrate dendritischer Dornen infolge einer NMDAR Autoantikörperexposition nachweisen.

Da Mikroglia nachweislich auch die Dichte und Form von Synapsen modulieren können, untersuchte ich im zweiten Teil der Arbeit anhand des Mausmodells der NMDAR Enzephalitis sowohl morphologische Veränderungen als Hinweis auf eine Aktivierung von Mikrogliazellen, als auch deren Potential synaptische Strukturen zu entfernen. In konfokalen Aufnahmen Iba-1 markierter Mikrogliazellen fanden sich starke morphologische Veränderungen der Mikrogliazellen als Zeichen ihrer Aktivierung nach NMDAR Autoantikörper Infusion. Mikroglia interagieren mit synaptischen Elementen, wobei sie synaptische Fragmente umschlingen und eliminieren (engl. synaptic engulfment). In konfokalen immunhistologischen Aufnahmen quantifizierte ich die Kollokalisierung von synaptischen Strukturen und Lysosomen in Mikroglia. Hierbei zeigte sich keine veränderte Aufnahme exzitatorischer oder inhibitorischer präsynaptischer Fragmente über lysosomale Stoffwechselwege. Interessanterweise zeigte sich jedoch nach NMDAR Autoantikörperexposition eine verringerte Lokalisation exzitatorischer synaptischer Fragmente in Mikroglia bei unveränderter Kollokalisierung mit lysosomalen Markern. Diese Daten suggerieren, dass die Überwachung synaptischer Strukturen durch Mikroglia beeinträchtigt sein könnte, was möglicherweise den Dornenüberschuss SST-exprimierender Interneurone bedingen könnte.

Zusammengefasst zeige ich in dieser Arbeit, dass es zu kompensatorischen morphologischen Veränderungen der postsynaptischen Dornen SST - exprimierender inhibitorischen Interneurone nach NMDAR Autoantikörperinfusion kommt. Außerdem zeige ich, dass es im Mausmodell der NMDAR AE zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen und einer möglicherweise verminderten Interaktion von Mikroglia mit exzitatorischen Synapsen kommt. Diese Veränderungen zeigen, dass nicht nur exzitatorische Nervenzellen, sondern auch inhibitorische Interneurone und Mikroglia durch NMDAR Autoantikörper betroffen sind und zur Störung der Netzwerkfunktion beitragen können.

Abstract

N-methyl-D-aspartate receptor autoimmune encephalitis (NMDAR AE) is a recently identified autoimmune brain disorder that is triggered by autoantibodies against the GluN1 subunit of NMDAR. The disease follows a characteristic course, beginning with upper respiratory complaints, followed by psychiatric symptoms such as personality changes, delusions or hallucinations manifest. At this stage, it is very difficult to distinguish it from primary psychiatric illnesses such as schizophrenia. Neurological deficits develop, ranging from speech or memory disorders to coma. Affected patients often require intensive care for weeks due to the life-threatening neurological manifestations. Early treatment improves the chances of recovery. Nevertheless, many patients still suffer from long-lasting cognitive deficits.

The molecular pathomechanisms of the disease have been scarcely studied to date. Human autopsies show an inflammatory reaction with strong microglial activation in the hippocampus. Cell culture experiments revealed that antibody binding to open NMDAR leads to a linking and internalisation of the NMDAR. This results in a reduction of the superficial NMDAR density and NMDAR-dependent postsynaptic currents, leading to NMDAR hypofunction. Not only excitatory cells, but also hippocampal inhibitory interneurons seem to be affected. Due to differing receptor properties between the cell types, interneurons could be affected differently by NMDAR antibodies. A dysfunction of inhibitory interneurons could disrupt the fine balance between excitatory and inhibitory signalling in the hippocampus. These pathophysiological changes of hippocampal circuits in NMDAR AE have hardly been investigated. Studying these inhibitory circuits is crucial for a deeper understanding of the pathogenesis of NMDAR AE. Insights into the effects of antibody-induced internalisation of NMDAR could also have groundbreaking implications for other central nervous system disorders linked to NMDAR hypofunction.

The first aim of this work was to investigate the structural changes in inhibitory interneurons. The focus was on the investigation of somatostatin (SST)-expressing interneurons, a subgroup of inhibitory neurons that plays a central role in learning and memory processes and is impaired in many neuropsychiatric diseases. SST interneurons form so-called dendritic spines (spine-like membrane protrusions). Dendritic spines harbour postsynapses - changes in their density, shape and dynamics can therefore provide indications of a change in the functionality and connectivity of hippocampal neuronal circuits. A transgenic mouse line that expresses a green fluorescent protein (GFP) in SST-positive interneurons was used to visualize dendritic spines. An animal model of NMDAR AE is generated by chronic infusion of NMDAR autoantibodies into the ventricles of mice. Since the maximum antibody binding was detectable in the hippocampus, I focussed my investigations on the CA1 and CA2 regions of the hippocampus. Confocal microscopy showed an increase in the density of the total spines after NMDAR autoantibody infusion compared to control antibody infusion. An examination of the morphological parameters revealed shorter spines with smaller spine heads in the NMDAR AE group. Dendritic spines can be categorised into the groups 'stubby', 'thin' and 'mushroom-shaped' based on their shape. When analysing these subgroups, I observed an increase in stubby spines after NMDAR autoantibody infusion. This shows that postsynapses on SST interneurons undergo morphological adaptations after NMDAR autoantibody exposition in the sense of an increase in dendritic spines, which may represent a compensatory mechanism for the altered network activity. Since synapses are dynamic structures that can be newly formed

or lost, I investigated the kinetics of dendritic spines in a chronic in vivo two-photon microscopic study. Interestingly, there was no change in the dynamics and turnover rate of dendritic spines after NMDAR autoantibody exposure.

As microglia have also been shown to modulate the density and shape of synapses, the second part of the thesis focusses on both morphological changes as an indication of microglial cell activation and their potential to remove synaptic structures in the mouse model of NMDAR AE. Confocal images of Iba-1 labelled microglial cells showed strong morphological changes of the microglial cells as a sign of their activation after NMDAR autoantibody infusion. Microglia interact with synaptic elements by engulfing and eliminating synaptic fragments (synaptic engulfment). The colocalization of synaptic structures and lysosomes in microglia was quantified in confocal images. There was no change in the uptake of excitatory or inhibitory presynaptic fragments via lysosomal metabolic pathways. However, after NMDAR autoantibody exposure there was a reduced localisation of excitatory synaptic fragments in microglia with unchanged colocalization with lysosomal markers. These data suggest that the surveillance of synaptic structures by microglia may be impaired, possibly causing the spine excess of SST-expressing interneurons.

In summary, NMDAR autoantibodies induce compensatory morphological changes in SST interneurons and activate microglia in a mouse model of NMDAR AE, possibly leading to impaired interactions with excitatory synapses. These findings highlight the involvement of both excitatory and inhibitory neurons, as well as microglia, in NMDAR AE pathophysiology and network dysfunction.

1 Einleitung

1.1 NMDAR-Enzephalitis

1.1.1 N-methyl-D-aspartat-Rezeptoren

N-methyl-D-aspartat-Rezeptoren (NMDAR) sind Liganden-gesteuerte, ionotrope Rezeptoren im zentralen Nervensystem (ZNS), welche bei Aktivierung erregende postsynaptische Signale auslösen und eine zentrale Rolle in Erinnerungs- und Lernprozessen spielen (Traynelis et al. 2010). Der NMDAR besteht aus vier Untereinheiten: Zwei GluN1 Untereinheiten (mit acht verschiedenen Subtypen) und zwei GluN2 (GluN2A-D) oder GluN3 (GluN3A-B) Untereinheiten (Hansen et al. 2021; Traynelis et al. 2010). Bei Aktivierung des Rezeptors kommt es durch den Einstrom von Natrium und Calcium zu einer Depolarisation, dem exzitatorischen postsynaptischen Signal (EPSP). Dieses wird mit anderen synaptischen Vorgängen verrechnet und kann zu der Generierung eines Aktionspotenzials führen (Booker and Wyllie 2021; Magee 2000).

Die Besonderheit des Rezeptors ist, dass für eine Aktivierung sowohl die gleichzeitige Bindung von Glutamat und Glycin oder D-Serin, als auch die Lösung der spannungsabhängigen Blockade durch extrazelluläres Magnesium notwendig ist (Hansen et al. 2018). Diese Magnesium-Blockade ist vor allem bei Ruhepotential oder in einem hyperpolarisierten Zustand der Zelle effektiv und löst sich bei Depolarisation (Mayer et al. 1984; Mony and Paoletti 2023; Nowak et al. 1984). Nachdem eine prä- und postsynaptische Aktivierung vorliegen muss, um eine Öffnung des NMDAR zu bewirken, werden diese auch als Koinzidenz-Detektoren bezeichnet (Bliss and Collingridge 1993; Gribkova and Gillette 2021). Erwähnenswert ist auch der langsame Beginn und die lange Dauer der postsynaptischen Stromkomponente über mehrere hundert Millisekunden (Lester et al. 1990), sowie die relativ hohe Permeabilität für Calcium (MacDermott et al. 1986; Mayer and Westbrook 1987). Dieser NMDAR abhängige Calcium Einstrom reguliert intrazelluläre Signalwege und ist entscheidend für Prozesse der synaptischen Plastizität (Pagano et al. 2021; Traynelis et al. 2010). Andererseits kann es bei einer NMDAR Überaktivierung zu einer Calcium abhängigen neuronalen Toxizität, auch „excitotoxicity“ genannt, kommen (Choi et al. 1988; Olney 1969). NMDAR können sowohl neuronale Plastizität und Aktivität fördern, als auch Nervenzellen töten. Dieses Paradoxon kann durch die unterschiedliche Lokalisation der Rezeptoren erklärt werden: Bei Aktivierung synaptischer NMDAR führt die intrazelluläre Verarbeitungskaskade zum Abruf von überlebensfördernden und plastizitätsrelevanten Programmen, bei Aktivierung extrasynaptischer NMDAR führt sie zur Aktivierung von Zelltodsignalen (Hardingham and Bading 2010; Pagano et al. 2021). Auch die Zusammensetzung des Rezeptors aus verschiedenen GluN2 Untereinheiten kann über die Auswirkung einer Aktivierung entscheiden. GluN2A enthaltende Rezeptoren scheinen sich eher innerhalb der Synapse zu befinden und neuronales Überleben zu fördern, während NMDAR mit GluN2B eher extrasynaptisch liegen und mit Zelltod assoziiert sind (Kabir et al. 2019; Ladagu et al. 2023; Parsons and Raymond 2014). Durch ihre einzigartigen Eigenschaften haben NMDAR eine zentrale Rolle in Lern- und Gedächtnisprozessen (Dupuis et al. 2023; Paoletti et al. 2013). Eine Dysfunktion des Rezeptors tritt bei

verschiedenen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen wie beispielsweise der Alzheimer Erkrankung oder der Schizophrenie auf und die Erforschung des Rezeptors birgt potenzielle neue Therapiemöglichkeiten (Nakazawa and Sapkota 2020; Yu et al. 2023).

1.1.2 Die klinische Manifestation und Behandlung von Anti-NMDAR Autoimmunenzephalitis

Die Anti-NMDAR Autoimmunenzephalitis (NMDAR AE) ist eine vor ungefähr 20 Jahren erstmals beschriebene Autoimmunerkrankung, bei der Antikörper gegen die GluN1 Untereinheit des NMDAR ein komplexes neuropsychiatrisches Krankheitsbild auslösen (Abb. 1a) (Dalmau et al. 2008; Kreye et al. 2016). Diese Autoimmunenzephalitis betrifft vor allem junge Menschen und besonders häufig Frauen. Sie ist außerdem mit dem Auftreten von Tumoren assoziiert, wobei hauptsächlich ovarielle Tumore beobachtet werden (Dalmau et al. 2008; Nguyen and Wang 2023). Es wurde postuliert, dass durch apoptotische Tumorzellen Antigene freigesetzt werden, welche dann über Antigen-präsentierende Zellen dem Immunsystem zugeführt werden und zur Bildung von Plasmazellen führen. Nach Überquerung der Blut-Hirn-Schranke kommt es zu einer erneuten Stimulation, Affinitätsreifung und einer klonalen Expansion durch Reifung zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen (Martinez-Hernandez et al. 2011). Ein anderer häufig diskutierter Auslöser ist die Herpes-Simplex Enzephalitis, welche zur Bildung von NMDAR Autoantikörpern (NMDAR AK) führen kann. Vermutlich kommt es durch neuronale Degeneration und Entzündung zu einer Antigenpräsentation und zur Reifung von Plasmazellen (Armangué et al. 2014; Dalmau 2016; Quade et al. 2023).

Bei vielen der PatientInnen tritt ein Prodromalstadium mit unspezifischen Symptomen wie Kopfschmerzen, Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall oder respiratorischen Symptomen auf. Erst ein bis zwei Wochen später entwickeln sich dann vielfältige psychiatrische Symptome (Dalmau et al. 2011; Zhao et al. 2023). Sehr typisch sind beispielsweise neu auftretende, häufig aggressive oder bizarre Verhaltensveränderungen, Halluzinationen oder Wahn. Es sind auch affektive Störungen wie Stimmungsschwankungen, Depression oder Manie beschrieben (Dalmau et al. 2011; Warren et al. 2018). Viele der PatientInnen stellen sich mit diesen Auffälligkeiten zuerst in psychiatrischen Einrichtungen vor und werden auch häufig fehldiagnostiziert (Dalmau et al. 2008; Dalmau et al. 2011; Subeh et al. 2021). Im Vergleich zu primär psychiatrischen Erkrankungen entwickeln sich die Symptome der NMDAR AE jedoch wesentlich schneller als bei PatientInnen ohne psychiatrische Vorgeschichte oder Familienanamnese (Warren et al. 2018). Bei PatientInnen mit NMDAR AE kommt es nach dieser initialen psychiatrischen Phase zu schweren neurologischen Manifestationen. Hierbei kommt es beispielsweise oft zu epileptischen Anfällen, Sprach- und Gedächtnisauffälligkeiten und Bewusstseinsverlust, aber auch zu Katatonie und Dyskinesien. Zusätzlich kommt es zu autonomen Symptomen wie Hyperthermie, wechselnder Tachy- bzw. Bradykardie oder Bluthochdruck. Die PatientInnen werden teilweise im Verlauf komatös und müssen beatmet werden. In diesem Zustand sind die

Betroffenen oft nur noch auf einer Intensivstation führbar (Dalmau et al. 2011; Xu et al. 2021).

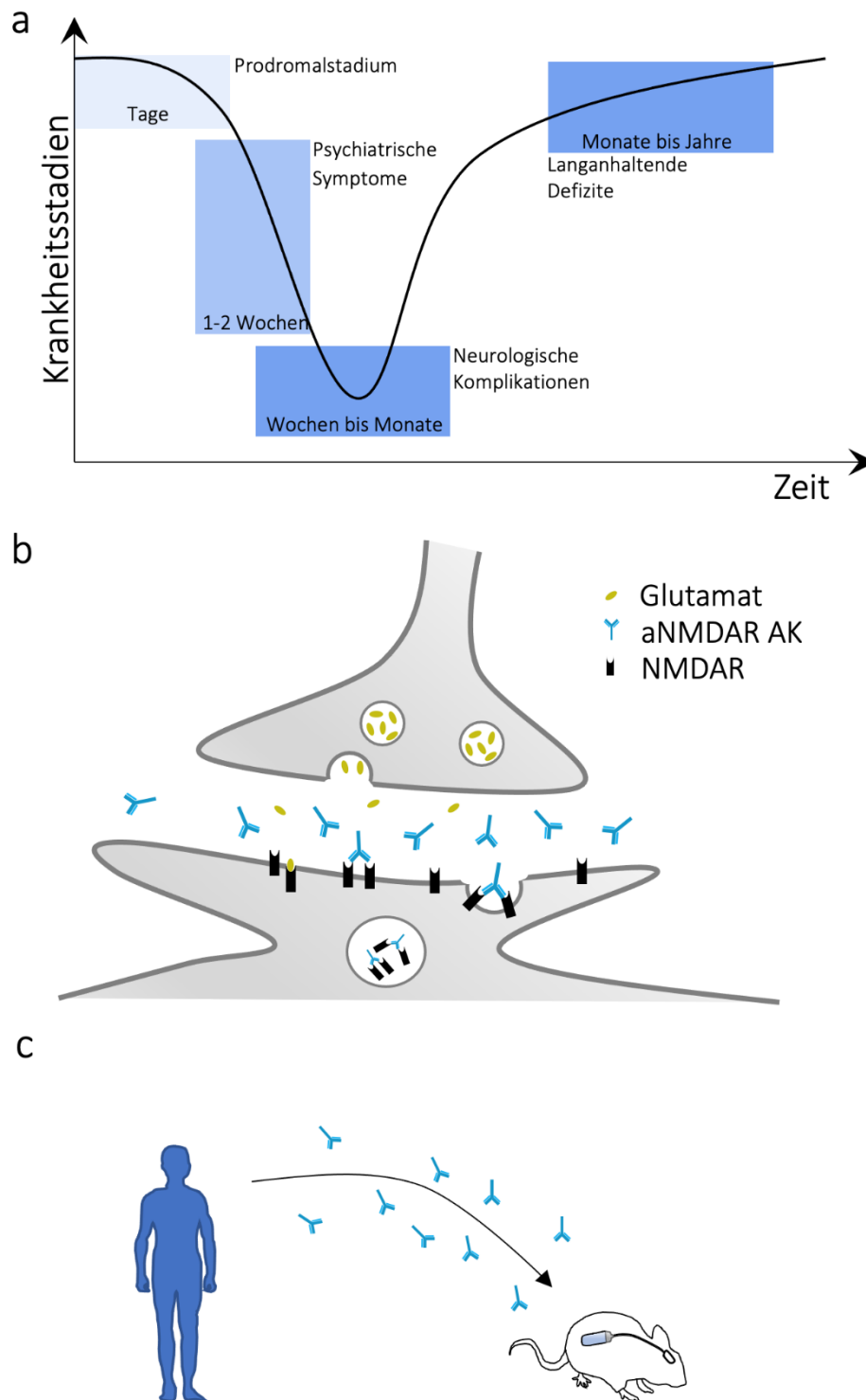


Abbildung 1: NMDAR Autoimmunenzephalitis. a) Klinische Stadien der NMDAR AE mit einer grippeähnlichen Prodromalphase, psychiatrischen und neurologischen Manifestationen und lang anhaltenden kognitiven Defiziten (Abbildung modifiziert aus Dalmau et al. 2019). b) Molekularer Mechanismus der NMDAR AE. Die Antikörper binden an GluN1 Untereinheiten der NMDAR, was zu einer Quervernetzung und Internalisierung der Rezeptoren und damit zu einer verminderten NMDAR Dichte und NMDAR Hypofunktion führt (Abbildung modifiziert aus Huang et al. 2020). c) Mausmodell der NMDAR AE. Durch die intraventrikuläre Infusion von humanen NMDAR Autoantikörpern kann ein Mausmodell der Erkrankung erzeugt werden (Abbildung modifiziert aus Dalmau et al. 2019)

Die Behandlung der Erkrankung fokussiert sich auf Immuntherapie und Tumorsuche, sowie der Entfernung der Tumoren. Betroffene werden zunächst häufig mit Steroiden, Immunglobulinen oder Plasmapherese behandelt. Viele benötigen eine Zweitlinientherapie mit Rituximab und/oder Cyclophosphamiden (Abboud et al. 2021). Glücklicherweise kommt es unter Therapie bei den meisten PatientInnen zu einer Verbesserung der Symptome (Nguyen and Wang 2023; Titulaer et al. 2013). Die Genesung schreitet langsam und häufig in umgekehrter Reihenfolge zur Entwicklung der Symptome voran. Nach der Stabilisierung der Vitalparameter und autonomen Funktionen erlangen die PatientInnen zunehmend wieder das Bewusstsein und die Fähigkeit einfachen Aufforderungen und Interaktionen zu folgen. Erst später entwickeln sich die Sprachprobleme weiter zurück (Dalmau et al. 2011). Die Normalisierung von Sozialverhalten und komplexen exekutiven Anforderungen kann mehrere Monate dauern oder sogar ausbleiben (Dalmau et al. 2011). In der postakuten Phase der Erkrankung weisen die PatientInnen ähnliche kognitive und psychiatrische Beschwerden auf wie SchizophreniepatientInnen in einer stabilen Phase (Guasp et al. 2022). Im Gegensatz zur Schizophrenie bilden sich die Defizite zurück und die Rückkehr in den Alltag und teilweise auch in das Berufsleben ist möglich (Guasp et al. 2022; Titulaer et al. 2013). Bei vielen Betroffenen sind Jahre später nicht einmal mehr Antikörper nachweisbar (Finke et al. 2012). Leider scheinen bei vielen PatientInnen langanhaltende kognitive Defizite wie Konzentrationsprobleme und Gedächtnisstörungen zu bleiben (Finke et al. 2012; Heine et al. 2021; Nicolle and Moses 2018).

1.1.3 Molekulare Mechanismen der NMDAR AE

Ursächlich für die komplexen neuropsychiatrischen Symptome der NMDAR AE sind Antikörper gegen den NMDAR (Kreye et al. 2016). Dabei hängt die klinische Symptomatik mit dem im Liquor gemessenen Antikörpertiter zusammen (Dalmau et al. 2011). Die Antikörper binden an der amino-terminalen Domäne der GluN1 Untereinheit des NMDAR (Abb. 1b). Obwohl die GluN1 Untereinheit in NMDAR weit verteilt im ZNS vorkommt, konnte die Antikörperbindung in immunhistochemischen Färbungen vor allem im Hippokampus und teilweise im Kortex nachgewiesen werden (Dalmau et al. 2008). NMDAR AK scheinen eher an häufig aktive und damit offene NMDAR zu binden. Dabei stabilisieren sie zwar akut den geöffneten Zustand, verursachen aber selbst keine Aktivierung des Rezeptors (Gleichman et al. 2012). Durch die Bindung kommt es zu einer Quervernetzung der Rezeptoren. Diese führt zu einer reversiblen Internalisierung und damit zu einer Reduktion der NMDAR Dichte an der Zelloberfläche (Abb.1b). Hierdurch kommt es zu einer Reduktion der NMDAR vermittelten synaptischen Ströme und damit zu einer Hypofunktion des NMDAR (Hughes et al. 2010; Moscato et al. 2014). Der Rückgang der NMDAR an der Synapse korreliert mit dem Antikörpertiter im Liquor und ist bei Wegnahme der Antikörper reversibel. Dieser Prozess wirkt sich nicht auf die Anzahl exzitatorischer Synapsen aus, scheint andere synaptische Proteine nicht zu beeinträchtigen und beeinflusst auch das Gesamtüberleben der Zellen nicht (Hughes et al. 2010).

Die NMDAR Dichte an der Synapse verringert sich zusätzlich durch eine Diffusion der synaptischen NMDAR weg vom synaptischen Spalt, da die Verbindung des Rezeptors mit dem Ankerprotein Ephrin-B2-Rezeptor unterbrochen wird (Mikasova et al. 2012; Washburn et al. 2020). Die Mobilität der extrasynaptischen NMDAR nimmt aufgrund der Quervernetzung ab (Dupuis et al. 2014; Hunter et al. 2021). Auf Basis dieser Beobachtungen entwickelten sich zwei erklärende Modelle: Im synaptozentrischen Modell binden die NMDAR AK vor allem an synaptischen NMDAR, aufgrund der fehlenden Verankerung in der Synapse wandern die NMDAR in extrasynaptische Bereiche wo sie dann verlinkt und internalisiert werden. Im extrasynaptozentrischen Modell geht man davon aus, dass die Antikörper aufgrund der besseren Zugänglichkeit in erster Linie extrasynaptische NMDAR angreifen und anschließend zum Ausgleich synaptische NMDAR dorthin diffundieren (Hunter et al. 2021). Durch eine Imbalance der synaptischen und extrasynaptischen Rezeptoren kommt es zu einer extrasynaptischen NMDAR Überfunktion. Symptome wie epileptische Anfälle, Dyskinesien und Katatonie könnten durch eine NMDAR Überfunktion bedingt sein, durch die synaptische Hypofunktion könnten Manifestationen wie Amnesie oder psychotische Symptome zustande kommen (Lynch et al. 2018).

Die antikörperabhängige Bindung und Internalisierung der Rezeptoren beschränkt sich nicht nur auf exzitatorische Nervenzellen, sondern betrifft auch inhibitorische Zellen (Moscato et al. 2014). Lynch et al. postulierten 2018, dass NMDAR AK unterschiedliche Pathomechanismen an inhibitorischen und exzitatorischen Zellen haben könnten. Demnach binden NMDAR AK an aktiven exzitatorischen Synapsen vor allem an offenen, zumeist GluN2A enthaltenden NMDAR (Lynch et al. 2018). Dahingegen werden an inhibitorischen Interneuronen zumeist extrasynaptische, GluN2B enthaltende NMDAR gebunden. Eine pathologische Aktivität von Interneuronen könnte durch eine Imbalance des neuronalen Netzwerkes auch zu epileptischen Anfällen führen (Lynch et al. 2018). Im Kortex scheinen NMDAR AK sogar in erster Linie an inhibitorischen Interneuronen zu binden. Hier wurde in *in vitro* Studien eine kortikale Hyperaktivität aufgrund einer verminderten Inhibition beobachtet (Andrzejak et al. 2022). Auch in hippokampalen Zellkulturexperimenten kommt es nach NMDAR AK Exposition sowohl bei exzitatorischen Pyramidenzellen (PC), als auch bei GAD6 markierten inhibitorischen Interneuronen zu einer Verringerung der oberflächlichen NMDAR (Moscato et al. 2014). Zudem gibt es durch immunhistochemische Anfärbung des inhibitorischen präsynaptischen vesikulären GABA Transporters (vGAT) in ebendiesen Zellkulturen Anzeichen dafür, dass inhibitorische Neurone kompensatorisch zu der Hypofunktion des NMDAR weniger Synapsen mit exzitatorischen Nervenzellen ausbilden (Moscato et al. 2014). Spannenderweise sind die in elektrophysiologischen Studien gemessenen postsynaptischen inhibitorischen Ströme hippokampaler PC nach NMDAR AK Gabe in Amplitude und Intervall trotzdem unverändert (Ceanga et al. 2023; Moscato et al. 2014). Im Hippokampus kommt es im Gegensatz zum Kortex zu einer verminderten Aktionspotentialfrequenz der PC, was auf eine regional unterschiedliche Beeinflussung neuronaler Schaltkreise durch NMDAR AK schließen lässt (Ceanga et al. 2023; Taraschenko et al. 2019).

1.1.4 Ein Mausmodell der NMDAR AE

Durch die intraventrikuläre Infusion von NMDAR AK lässt sich ein Mausmodell der NMDAR AE erzeugen (Abb. 1c). Dieses Modell verwendet Liquor von PatientInnen mit NMDAR AE und gesunden Kontrollen oder rekombinante Antikörper generiert von isolierten Plasmazellen, welche über 14 Tage in die Seitenventrikel von gesunden Mäusen gepumpt werden (Malviya et al. 2017; Planaguma et al. 2015). In Verhaltensuntersuchungen zeigte sich, dass die Mäuse nach Infusion von Liquor mit NMDAR AK im Vergleich zu Kontrollinfusionen fortschreitende Gedächtnisbeeinträchtigungen, sowie anhedonische und depressive Verhaltensweisen entwickelten (Planaguma et al. 2015). Gleichzeitig blieb ihre Leistung in anderen Verhaltens- und Bewegungsaufgaben unverändert. Die Gedächtnisbeeinträchtigungen erreichten ihr Maximum 18 Tage nach Beginn der Infusion, also 4 Tage nach Beendigung der Infusion, und normalisierten sich bis zu Tag 25 (Planaguma et al. 2015). Passend dazu zeigte sich in immunhistochemischen Färbungen hippokampaler Hirnschnitte ein zunehmender Nachweis humaner IgG Antikörper und eine Abnahme der synaptischen NMDAR Dichte im Laufe des Versuchs. Die Antikörperbindung erreichte ebenfalls an Tag 18 ihren Höhepunkt und nahm anschließend ab. Charakteristisch für diese Bindung ist ein fein punktiertes Muster an der Zelloberfläche von Nervenzellen und ihren Ausläufern (Planaguma et al. 2015). Die infundierten Antikörper binden vor allem an Hirnregionen mit einer ausgeprägten NMDAR Expression, wie etwa dem Hippokampus (Planaguma et al. 2015). Angesichts dieses Bindungsmusters und den hierdurch ausgelösten, potenziell bedeutsamen Effekten wurde in dieser Arbeit gezielt der Hippokampus untersucht.

1.2 Der Hippokampus

Der Hippokampus ist eine seepferdchenartige Struktur, die sich beim Menschen im Temporallappen befindet. Bei Nagetieren liegt der Hippocampus direkt unter dem Neokortex (Knierim 2015). Der Name der Struktur stammt von ihrer Ähnlichkeit mit der Flosse des mythologischen Seeungeheuers Hippocamp (Paulsen and Waschke 2017). Die hippokampale Formation besteht aus vier Regionen: Dem Gyrus dentatus (DG), dem Cornu ammonis (CA, auch: Hippokampus proper), dem subiculärem Komplex und dem entorhinalen Kortex (EC) (Chauhan et al. 2021). Die C-förmige Kurve des CA ähnelt dem Horn eines Widders, weshalb das Cornu ammonis nach dem widderköpfigen altägyptischen Gott Amun benannt ist (Chauhan et al. 2021). Dabei bilden das CA und der DG zwei C-förmige Ringe, die ineinander greifen. Das CA wird in die vier Sektoren CA1 - 4 unterteilt (Abb.2a) (Fogwe et al. 2023).

Bereits seit den 50er Jahren steht der Hippokampus im Fokus der neurowissenschaftlichen Forschung. Im Jahr 1957 wurde die berühmte Fallstudie H.M. veröffentlicht, in der ein Patient nach einer chirurgischen Entfernung des Hippokampus und anliegenden Strukturen die Fähigkeit verlor, neue Erinnerungen zu formen (Scoville and Milner 1957). In den darauffolgenden Jahrzehnten wurde die Entstehung von Erinnerungen, die Arten

des Gedächtnisses und die Rolle des Hippokampus darin intensiv erforscht. Schnell wurde klar, dass es zwei Arten des Gedächtnisses geben muss: Das deklarative Gedächtnis mit Fakten und Ereignissen und das nicht-deklarative Gedächtnis für motorische Fähigkeiten (Squire 2009). Der Hippokampus ist an verschiedenen kognitiven Prozessen wie dem deklarativen Gedächtnis, der Navigation und Emotionen beteiligt (Burgess et al. 2002; Phelps 2004; Shi et al. 2023). Die molekularen Mechanismen der Erinnerung zu verstehen, erwies sich als wesentlich komplizierter. Lernen und Gedächtnis im Hippocampus entsteht durch die korrekte Weiterleitung von Informationen und die Formierung von neuronalen Kontakten (Kandel et al. 2014). In den hier beteiligten komplexen Schaltkreisen spielen inhibitorische Interneurone eine zentrale Rolle. Ihre synaptischen Veränderungen können dieses Netzwerk maßgeblich beeinflussen und sind dementsprechend ein wichtiges Element in der Funktion des Hippokampus (Honore et al. 2021).

Der Informationsfluss zwischen diesen Regionen bildet eine bereits 1893 durch Cajal beschriebene entorhinale-hippocampale Schleife (= engl. trisynaptic loop). Der EC ist über den Tractus perforans mit dem DG verbunden (Amaral and Witter 1989). Zusätzlich gibt es Verbindungen aus verschiedenen Schichten des EC zu CA1-3 und dem Subiculum (Witter and Amaral 1991). Die Körnerzellen des DG projizieren über die Moosfasern in die CA2 und CA3 Regionen des Hippokampus (Nakahara et al. 2018; Swanson et al. 1978). Die PC der CA3 Region innervieren sich zum einen untereinander und bilden außerdem die sogenannten Schaffer Kollateralen in die CA1 Region (Amaral and Witter 1989; Chauhan et al. 2021; Swanson et al. 1978). Von der CA1 Region gibt es wiederum Verbindungen zurück zum EC und zum Subiculum (Amaral et al. 1991; Chauhan et al. 2021; Tamamaki and Nojyo 1995). Das Subiculum mit der angrenzenden Fornix wird häufig als Ausgangspunkt der hippokampalen Formation betrachtet, da hier die Projektionen in verschiedene Hirnregionen verlaufen (Chauhan et al. 2021; Swanson and Cowan 1977).

1.2.1 Die Schichten des CA 1

Das Ammonshorn ist durch die Position der PC in verschiedene Schichten aufgeteilt (Abb. 2a, b). Dabei bilden die Zellkerne der PC das Stratum pyramidale (StrP). Kaudal liegt das Stratum oriens (StrO) mit den basalen Dendriten der PC (Amaral and Witter 1989; Chauhan et al. 2021). Ein apikaler dendritischer Baum zieht von der Zellkernschicht durch das Stratum radiatum (StrR) in das Stratum lacunosum-moleculare (StrL-m) (Megias et al. 2001; Shi et al. 2023). Die PC der CA1 Region werden durch verschiedene exzitatorische Nervenzellen innerviert. Zunächst gibt es die bereits erwähnten Schaffer Kollateralen, welche von PC der CA3 Region ausgehen, in die CA1 Region projizieren und sich im Stratum oriens und im Stratum radiatum stark verzweigen (Shi et al. 2023; Takacs et al. 2012). Außerdem werden PC durch Fasern des EC innerviert, die durch das Subiculum oder den Alveus in den Hippokampus ziehen und im StrL-m enden (Deller et al. 1996; Takacs et al. 2012).

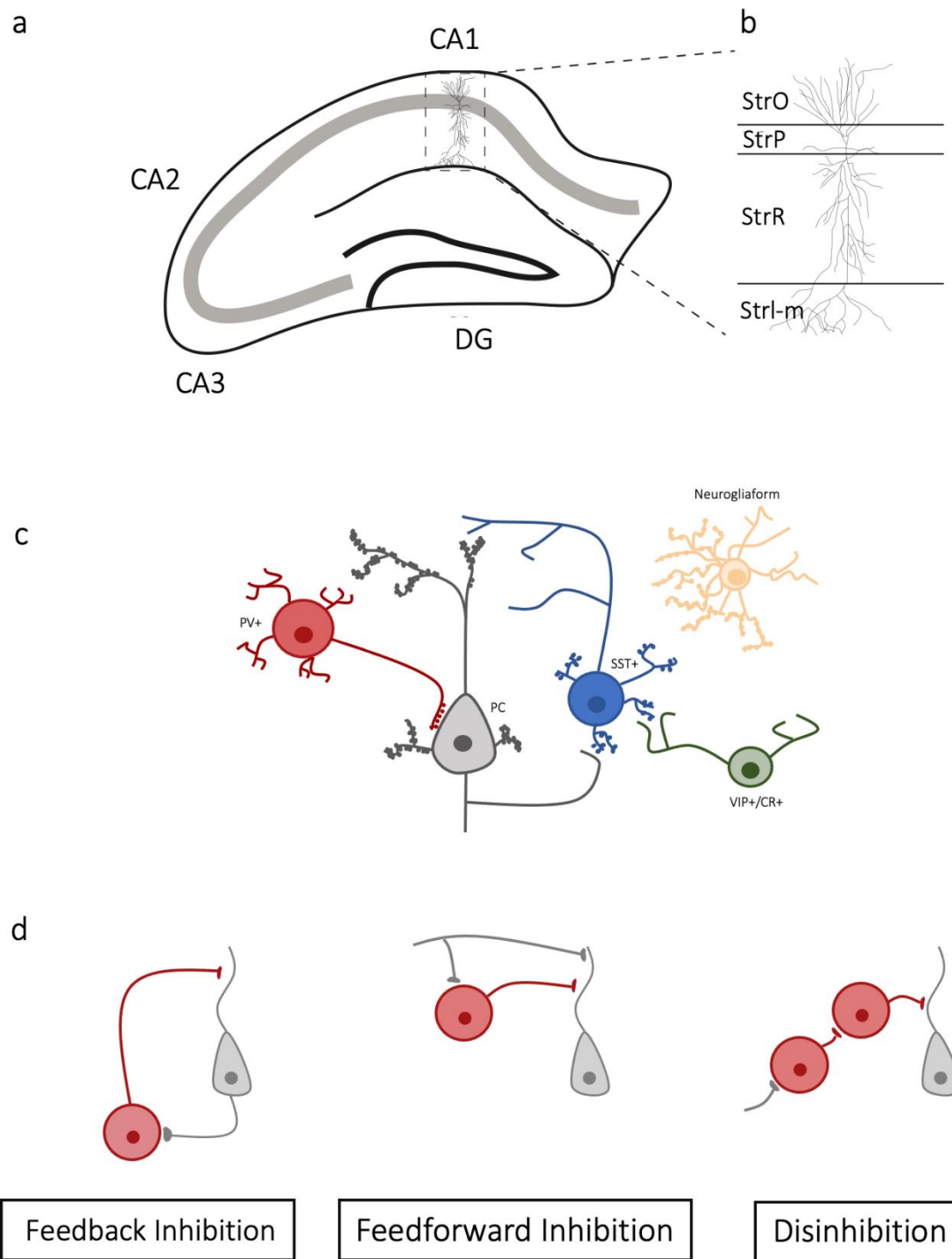


Abbildung 2: Der Aufbau, die Schichten und Interneurone des Hippokampus. a) Schemazeichnung des Hippokampus mit den Regionen CA 1-3, dem Stratum pyramidale (StrP, grau) mit beispielhafter Pyramidenzelle (PC) und dem Gyrus dentatus (DG) (Abbildung modifiziert aus Honore et al. 2021). b) Die zelluläre Schichtung der CA1 Region mit einer PC. Abgebildet sind das Stratum oriens (StrO), Stratum pyramidale (StrP) mit dem Zellkörper der PC, das Stratum radiatum (StrR) und das Stratum lacunosum-moleculare (StrL-m). c) Vereinfachte Darstellung der somatischen Inhibition einer Parvalbumin (PV) exprimierenden Zelle und der dendritischen Inhibition einer Somatostatin (SST) exprimierenden Zelle. Eine Vasoaktives Peptid/Calretinin (VIP/CR) exprimierende Zelle inhibiert andere inhibitorische Interneurone. Eine Neurogliaforme Zelle bildet ein inhibitorisches Netz (Abbildung modifiziert aus Spiegel and Hemmings 2021). d) Simplifizierte Interneuronenklassifikation mit exzitatorischen (grau) und inhibitorischen Interneuronen (rot) als klassische Feedback und Feedforward Inhibition, sowie Disinhibition (Abbildung modifiziert aus Kullmann and Lamsa 2007).

Auch die PC der CA1 selbst bilden Kollateralen sowohl in das Subiculum als auch in das StrO der CA1 Region aus (Takacs et al. 2012). Die PC des CA1 stellen neben den lokalen Kollateralen auch eine wichtige exzitatorische Projektion in andere Hirnregionen dar. Sie projizieren in das Subiculum und in den EC (Amaral and Witter 1989; Nakahara et al. 2018) und bilden lange Fasern in Regionen wie den Präfrontalkortex und den Nucleus accumbens aus (Lee et al. 2024; Swanson and Cowan 1977).

1.2.2 Inhibitorische Interneurone und ihre Schaltkreise

Neben den exzitatorischen PC befinden sich im Hippokampus viele verschiedene Subgruppen inhibitorischer Interneurone (Abb. 2c). Obwohl inhibitorische Interneurone nur ungefähr 10-15% der gesamten neuronalen Zellpopulation im Hippokampus ausmachen, spielen sie eine zentrale Rolle in verschiedenen Schaltkreisregulationen und – funktionen (Pelkey et al. 2017). Sie setzen den Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA) frei, welcher an verschiedenen postsynaptischen Rezeptoren, den schnelleren ionotropen GABA_A Rezeptor oder dem langsameren metabotropen GABA_B Rezeptor, bindet. Bei Bindung an den GABA_A Rezeptor kommt es durch erhöhte Cl⁻ Permeabilität zu einer Hyperpolarisation. Postsynaptische GABA_B Rezeptoren führen meist durch einen G-Protein abhängigen postsynaptischen K⁺ Einstrom zu einer Hyperpolarisation. Präsynaptische GABA_B Rezeptoren führen durch eine Inhibition der spannungsabhängigen Ca²⁺ Kanäle zu einer verminderten Ausschüttung von Neurotransmittern (Booker and Vida 2018). Inhibitorische Interneurone kontrollieren so die Aktivität der nachgeschalteten PC (Royer et al. 2012). Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwei Mechanismen: Feedback und Feedforward Hemmung (Abb. 2d). Bei einer Feedback Hemmung kommt es nach Aktivierung einer exzitatorischen Zelle zur Aktivierung einer oder mehrerer inhibitorischen Zellen. Diese kann als Feedback Mechanismus wiederum exzitatorische Zellen hemmen. Unter Feedforward Hemmung versteht man die gleichzeitige Aktivierung einer exzitatorischen Zelle und inhibitorischen Interneuronen, die die exzitatorische Zelle hemmen (Buzsaki 1984).

Im Gegensatz zu den exzitatorischen PC sind die Zellkörper inhibitorischer Interneurone über alle Schichten des Hippokampus verteilt (Pelkey et al. 2017). Zwischen den verschiedenen Subgruppen gibt es viele Unterschiede in ihrer Anatomie, Konnektivität und ihren intrinsischen und synaptischen Eigenschaften (Booker and Vida 2018). Im Kortex hat sich mittlerweile die Klassifikation in die drei großen Gruppen Parvalbumin (PV)-exprimierende Interneurone, Somatostatin (SST)-exprimierende Interneurone und Serotonin Rezeptor 3a exprimierende Interneurone durchgesetzt (Abb. 2c) (Rudy et al. 2011).

1.2.3 PV-exprimierende Interneurone

Über 20% der Gabaergen Zellen im Hippocampus exprimieren PV, wobei es sich bei den meisten um PV exprimierende Korbzellen und axo-axonale Zellen handelt (Topolnik and Tamboli 2022). Die Axone der Korbzellen umwickeln und umschlingen perlenschnurartig

ihre postsynaptische Zielzelle (Klausberger et al. 2005; Miles et al. 1996). Aufgrund dieser Inhibition nahe dem Soma werden sie auch als perisomatische Interneurone bezeichnet (Booker and Vida 2018). PV-exprimierende Interneurone sind schnell-feuernde Zellen, die sich durch ihre schnelle Kinetik und kurzfristige Inhibition auszeichnen (Topolnik and Tamboli 2022). Diese perisomatische Inhibition sorgt für eine Feedforward Hemmung der CA1 PC und Kontrolle der Aktivitätsausbreitung (Booker and Vida 2018; Miles 1990; Miles et al. 1996). Ankommende exzitatorische Signale der Schaffer Kollateralen (CA3 PC) und des EC erregen nicht nur PC, sondern auch Interneurone, welche wiederum die lokalen PC hemmen. Nach der monosynaptischen Aktivierung der PC folgt nach einer kurzen Verzögerung die disynaptische Feedforward Hemmung (Chamberland et al. 2024; Miles 1990; Miles et al. 1996; Pouille and Scanziani 2001). Sie kontrollieren die Generierung von Aktionspotentialen und tragen zur Synchronisierung von PC in verschiedenen oszillatorischen Rhythmen bei (Topolnik and Tamboli 2022). Die genaue Verschaltung variiert zwischen den verschiedenen PV-exprimierenden Interneuronen und auch innerhalb der Regionen des Hippokampus und lässt damit PC Aktivität bei verschiedenen Prozessen zu (Topolnik and Tamboli 2022; Tukker et al. 2013; Viney et al. 2013).

1.2.4 SST-exprimierende Interneurone

Ungefähr 10% der Gabaergen Zwischenneurone im Hippokampus exprimieren SST (Bezaire and Soltesz 2013; Kosaka et al. 1988). Insgesamt ist diese Gruppe inhibitorischer Interneurone wesentlich diverser als die der PV-exprimierenden Interneurone (Booker and Vida 2018). Ein viel erforschtes Beispiel sind die in der CA1 lokalisierten, SST-positiven oriens/lacunosum-moleculare (O-LM) Zellen (Fernandez-Arroyo et al. 2024; Katona et al. 1999). Sie sind nach der Position ihrer Zellkörper und Ausbreitung ihrer Axone benannt: Stratum oriens Zellen mit lacunosum-molecularen Axonen. Ihre Zellkörper und Dendriten befinden sich im StrO, während sich ihre Axone zumeist im StrL-m ausbreiten (Maccaferri et al. 2000). Ihre Dendriten verzweigen sich sehr stark und bilden viele dendritische Dornen aus (Maccaferri et al. 2000). Sie erhalten erregende Signale von lokalen PC (Takacs et al. 2024) und hemmende Signale von anderen Interneuronen. Diese hemmende Verbindung ist wichtig für die Feedback Inhibition der O-LM Interneurone (Geiller et al. 2020; Tyan et al. 2014). Ein anderes Beispiel sind die sogenannten bistratified cells (BiC), welche neben SST auch PV exprimieren und vertikal ins StrO und ins StrR verlaufende Dendriten besitzen. Sie erhalten exzitatorische Signale durch Schaffer Kollateralen und inhibieren mit ihren langen Axonen CA1PC (Booker and Vida 2018; Buhl et al. 1994; Halasy et al. 1996).

SST-Interneurone hemmen PC bevorzugt an den dendritischen Ästen und werden daher auch als dendritische Interneurone bezeichnet (Booker and Vida 2018). Sie werden auch als klassische Feedback Neurone des Gehirns angesehen, da sie von PC aktiviert werden, die sie dann inhibieren (Chamberland et al. 2024). Zusätzlich sind sie durch hemmende Verbindungen zu anderen Interneuronen, wie beispielsweise PV-Interneuronen, in der Lage eine Disinhibition der PC zu gewährleisten (Chamberland et al. 2024; Takacs et al. 2024).

SST-Interneurone sind eher langsam-feuernde Zellen, die die Entstehung von Ca^{2+} abhängigen Aktionspotentialen in PC kontrollieren und eine spätere Phase der Inhibition darstellen (Chamberland et al. 2024; Maccaferri et al. 2000; Pelkey et al. 2017; Royer et al. 2012). Sie modulieren durch die dendritische Inhibition die Aktivität der nachgeschalteten CA1 PC und kontrollieren damit den Informationsfluss aus dem EC und der CA3 Region auf die CA1 PC (Leao et al. 2012). Am distalen Dendriten der PC werden ankommende Signale verrechnet. Bei gleichzeitigen erregenden Signalen kann es zu einer länger anhaltenden Depolarisation kommen, die zu Langzeitpotenzierung und synaptischem Umbau führt (Takahashi and Magee 2009). Außerdem kommt es bei solchen langanhaltenden Plateaus zu Aktionspotentialen in hoher Frequenz, dem sogenannten „burst-firing“ (Takahashi and Magee 2009). SST-Interneurone sind an dieser Verrechnung ankommender erregender Potenziale maßgeblich beteiligt und sorgen so für eine flexible und zustandsabhängige Erregbarkeit der PC (Lovett-Barron et al. 2012). Erst durch die Reduktion der dendritischen Inhibition kann es zur Generierung elektrischer Impulse kommen, was wiederum für die Entstehung des „burst firing“ notwendig ist (Lovett-Barron et al. 2012). Nachdem diese Aufsummierung exzitatorischer Potenziale eine entscheidende Rolle in der Regulierung synaptischer Plastizität spielt, ist es naheliegend dass dendritische Inhibition die Verstärkung bestimmter Afferenzen regulieren könnte (Royer et al. 2012). Insgesamt kontrollieren SST-Interneurone also die Integration ankommender Signale, die Formierung von Aktionspotentialen und die Entstehung des „burst firing“ der nachgeschalteten PC (Lovett-Barron et al. 2012; Pelkey et al. 2017; Royer et al. 2012; Topolnik and Tamboli 2022). Dieses Feintuning ankommender Signale ist höchstwahrscheinlich im Sinne einer Dämpfung irrelevanter oder kontextirrelevanter Signale für PC beim räumlichen Lernen und bei Orientierungsprozessen beteiligt (Topolnik and Tamboli 2022). Durch Anpassung ihrer Erregbarkeit können SST-Interneurone ihre Aktivität erhöhen und somit die Erinnerungsbildung unterstützen (Topolnik and Tamboli 2022). Aufgrund ihrer zentralen Rolle ist eine Dysfunktion oder verminderte Funktion von SST-Interneuronen mit vielen Erkrankungen des ZNS, wie der Schizophrenie, der Temporallappenepilepsie oder der Alzheimer Erkrankung assoziiert (Hashimoto et al. 2008; Lin and Sibille 2013; Lyu et al. 2023; Nagarajan et al. 2024).

1.2.5 5- Hydroxytryptamine Rezeptor -3a (5-HT3aR)-exprimierende Nervenzellen

Im Kortex kann in den meisten nicht PV- oder SST- exprimierenden Zellen der Serotonin Rezeptor 5HT3a R nachgewiesen werden. Diese dritte Interneuronengruppe bildet mit verschiedenen Untergruppen eine sehr heterogene Zellgruppe (Lee et al. 2010). Hierzu zählen Vasoaktives-Intestinales Peptid (VIP), Calretinin und Neuropeptid Y-exprimierende Interneurone (Vucurovic et al. 2010).

VIP- und Calretinin- exprimierende Interneurone machen fast 20% der inhibitorischen Neurone des Hippokampus aus (Bezaire and Soltesz 2013). Je nach Expressionsmuster und Morphologie können sie in weitere Untergruppen unterteilt werden, die sich stark unterscheiden (Topolnik and Tamboli 2022). Ihre Funktion ist es, andere Interneurone

zu inhibieren (Topolnik and Tamboli 2022). Während SST und PV-exprimierende Interneurone für eine flächendeckende Hemmung der umliegenden PC sorgen, sorgen VIP-exprimierende Interneurone durch eine Disinhibition von SST- und PV-Interneuronen für kleine Lücken der Hemmdecke (Abb.2c) (Karnani et al. 2014; Karnani et al. 2016; Turi et al. 2019). Diese Disinhibition ist im Hippocampus bei Verhaltens- und Lernprozessen beteiligt (Turi et al. 2019). Im Kortex hemmen VIP positive Zellen vor allem SST exprimierende Zellen (Pfeffer et al. 2013; Pi et al. 2013), im Hippokampus interagieren sie womöglich mit mehr verschiedenen Zelltypen (Gulyas et al. 1996; Turi et al. 2019). Es sind jedoch viele Kontakte mit SST-positiven O-LM Zellen in der CA1 Region des Hippokampus beschrieben, die die Rekrutierung der O-LM abhängigen Feedback Inhibition regulieren (Tyan et al. 2014). Eine Inhibition von SST- Interneuronen könnte zu vermehrter Signalentstehung und „burst firing“ in PC führen und damit neuronale Plastizität bei Lern- und Orientierungsprozessen fördern (Bittner et al. 2017; Lovett-Barron et al. 2012; Royer et al. 2012; Turi et al. 2019).

Neuropeptid Y exprimierende Neurogliaforme Zellen und Ivy Zellen machen 32,2% der inhibitorischen hippocampalen Interneurone aus (Bezaire and Soltesz 2013). Neurogliaforme Zellen sind hauptsächlich im Strl-m zu beobachten und zeichnen sich durch ihre kleinen Zellkörper mit kleinen, sternförmig angeordneten Dendriten und einem dichten lokalen Axongeflecht aus. Sie bilden nicht zwangsläufig klassische Zell-Zell-Kontakte mit einem klaren postsynaptischen Partner aus (Vida et al. 1998). Man geht davon aus, dass sie stattdessen mit den Ausläufern aller Zelltypen interagieren, die durch ihre dichte axonale Wolke verlaufen (Armstrong et al. 2011). Neurogliaforme Zellen und Ivy Zellen sorgen in verschiedenen Regionen und Schaltkreisen des Hippokampus für eine Feedforward Inhibition. In der CA1 Region erhalten sie die erregenden Signale der CA3 PC und des EC und inhibieren die distalen Dendriten der CA1 PC (Armstrong et al. 2012; Price et al. 2005; Sakalar et al. 2022).

1.2.6 Synaptische Plastizität

Um zu kommunizieren und Informationstransfer zu gewährleisten, benötigen Neurone Kontaktstellen. Diese sogenannten Synapsen sind Zell-Zell-Kontakte im Nervensystem, die Informationen von einer Nervenzelle ‚elektrochemisch‘ auf die Nächste übertragen (Sudhof 2021). Unter ‚synaptischer Plastizität‘ versteht man die Verstärkung oder Abschwächung der Wirksamkeit von Synapsen (Magee and Grienberger 2020). Die Idee, dass Erinnerungen durch Veränderungen der synaptischen Verbindungen gespeichert werden, gibt es schon lange. Donald Hebb vermutete bereits 1949, dass Nervenzellen bestimmte Eigenschaften aufweisen müssten, um Erinnerungen formen zu können. Er postulierte, dass die gleichzeitige Aktivierung prä- und postsynaptischer Neurone die Verbindung der beiden Zellen verstärken würde (Bliss and Lomo 1973). Später konnte die Theorie mit Experimenten untermauert werden, die erstmals eine NMDAR abhängige Long Term Potentiation (LTP), also eine lang anhaltende Verstärkung der synaptischen Übertragung, beschrieben (Bliss and Lomo 1973). Umgekehrt gibt es auch die Long Term Depression (LTP), eine lang anhaltende Abschwächung der synaptischen Übertragung

(Bear and Malenka 1994). Der NMDAR setzt die Hebb'sche Regel durch seine besondere Eigenschaft, sich nur bei gleichzeitiger prä- und postsynaptischer Aktivierung zu öffnen, auf synaptischer Ebene um (Bliss and Collingridge 1993; Gribkova and Gillette 2021). Durch den hohen Calcium- Einstrom durch NMDAR kommt es zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalwege. Die Calcium/Calmodulin abhängige Kinase wird aktiviert und löst die Phosphorylierung verschiedener Proteine aus. Durch diesen Prozess wird auch ein weiterer Glutamaterezeptor, der α - Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionsäurerezeptor (AMPA) phosphoryliert (Derkach et al. 1999; Nicoll and Schulman 2023). Hierdurch kommt es einerseits zu einer verstärkten Leitfähigkeit des Rezeptors, andererseits werden auch vermehrt AMPAR in die Synapsen eingebaut. Diese Vorgänge führen zu der Potenzierung der synaptischen Übertragung (Hayashi et al. 2000; Nicoll and Schulman 2023). Die NMDAR-abhängige LTP spielt eine zentrale Rolle in verschiedenen Formen des Lernens und der Entstehung von Erinnerungen (Hayashi 2022; Morris 1989). Außerdem sind diese aktivierungsabhängigen Veränderungen essenziell für die Formierung des räumlichen Gedächtnisses und des Verhaltensgedächtnisses (Baltaci et al. 2019; Goto 2022; Tsien et al. 1996; Whitlock et al. 2006). Die zellulären Mechanismen der synaptischen Plastizität werden als Grundlage für Gedächtnis- und Lernprozesse angesehen und die genauen Zusammenhänge zwischen diesen Prozessen sind Gegenstand zahlreicher Studien (Goto 2022).

1.2.7 Dendritische Dornen

Synaptische Aktivität führt neben physiologischen Veränderungen auch zu morphologischen Veränderungen. Ein strukturelles Korrelat der Postsynapse sind dendritische Dornen (Chidambaram et al. 2019; Engert and Bonhoeffer 1999; Maletic-Savatic et al. 1999). Dendritische Dornen sind kleine Ausstülpungen an der Oberfläche von Nervenzellen. Sie bestehen aus einem runden Kopf („head“), der über eine dünne Ausstülpung („neck“) mit dem Neuron verbunden ist (Chidambaram et al. 2019; Gray 1959). Am Kopf befinden sich die Rezeptoren und Kanäle, was durch eine postsynaptische Verdichtung mikroskopisch sichtbar ist (Nimchinsky et al. 2002). Dendritische Dornen bilden unter anderem durch die Verengung am Dornenhals ein biochemisches und ein elektrisches Kompartiment (Lee et al. 2012; Zecevic 2023). Mit dem biochemischen Kompartiment ist die räumliche Trennung der Signalproteine und -moleküle gemeint. Die elektrische Kompartimentalisierung erlaubt die Modulation von synaptischen Potenzialen in der Ausstülpung (Lee et al. 2012). Man geht davon aus, dass EPSP zunächst im dendritischen Dorn verrechnet werden, bevor sie abgeschwächt an den dendritischen Ast weitergegeben werden. Hierdurch könnte jedes ankommende Signal individuell summiert und modifiziert werden, ohne eine Sättigung des Dendriten herbeizuführen (Cornejo et al. 2022; Yuste 2013). Die Rolle von dendritischen Dornen als elektrisches Kompartiment ist jedoch umstritten (Zecevic 2023).

In Abhängigkeit von ihrer Morphologie können dendritische Dornen in die verschiedenen Gruppen „stubby“ (stummelförmig), „mushroom“ (pilzförmig) und „thin“ (dünn) eingeteilt werden. Außerdem sind noch Filopodien als lange dünne Ausläufer der Membran

beschrieben (Chidambaram et al. 2019; Harris et al. 1992). Filopodien bilden nicht immer Synapsen aus, sie werden jedoch als Vorläufer dendritischer Dornen betrachtet (Wit and Hiesinger 2023). Diese Klassifizierung ist etwas arbiträr und die Verteilung der Morphologie der Dornen entspricht eher einem Kontinuum als klar abgrenzbaren Kategorien (Pchitskaya and Bezprozvanny 2020). Die Anzahl der NMDAR und AMPAR ist proportional zur Größe der postsynaptischen Dichte und zum Volumen des dendritischen Dorns, daher bilden große Dornen tendenziell auch etwas stärkere Synapsen aus (Nimchinsky et al. 2002). Auf pilzförmigen Dornen befinden sie die stärksten und langlebigsten Synapsen, wodurch sich wenig Spielraum für eine weitere Stärkung der Synapsen ergibt. Dünne Dornen beherbergen eher unreife Synapsen. Man geht davon aus, dass dünne Dornen sich nach synaptischer Stärkung in pilzförmige Dornen umwandeln können (Bourne and Harris 2007; Matsuzaki et al. 2004). Stummelförmige Dornen weisen keinen oder einen nur sehr kurzen Hals auf und werden ebenfalls als eher unreife Strukturen betrachtet, da sie in höherer Anzahl im sich entwickelnden Gehirn anzutreffen sind (Berry and Nedivi 2017; Harris et al. 1992).

Inhibitorische Interneurone wurden über lange Zeit als dornenlose Nervenzellen betrachtet. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass SST-Interneurone dendritische Dornen ausbilden, die sich auch NMDAR-abhängig verändern und ähnliche funktionelle und plastische Anpassungen durchlaufen wie dendritische Dornen von PC (Perez-Rando et al. 2017b; Scheuss and Bonhoeffer 2014). Hierbei ist jedoch insbesondere an proximalen Dendriten mit $< 100\mu\text{m}$ Entfernung vom Soma eine geringere Dornendichte als bei PC beschrieben (Takacs et al. 2024). Dendritische Dornen werden häufig als strukturelles Korrelat exzitatorischer Synapsen betrachtet. In der bildgebenden Forschung kann der Umbau von dendritischen Dornen als morphologisches Korrelat einer Anpassung neuronaler Schaltkreise angesehen werden (Berry and Nedivi 2017). Veränderungen der dendritischen Dornen finden stetig statt. Vor allem dünne Dornen sind sehr dynamisch, wohingegen dicke Dornen, wie pilzförmige Dornen, langlebig sind (Holtmaat et al. 2005). Mit welcher Geschwindigkeit dieser strukturelle Umbau stattfindet, variiert in verschiedenen Studien in Abhängigkeit von Alter und Hirnregion (Attardo et al. 2015; Holtmaat et al. 2005; Yang et al. 2009). Im Kortex nimmt die Anzahl persistierender Dornen im Laufe des Lebens zu. Diese zunehmende Stabilisierung der Dornenumsatzrate zeigt eine Stabilisierung der synaptischen Schaltkreise mit zunehmenden Alter (Holtmaat et al. 2005). Die Umsatzrate variiert auch zwischen den Regionen des Kortex (z.B. dem visuellen und dem somatosensorischen Kortex), was auf eine unterschiedliche Anpassungsfähigkeit synaptischer Schaltkreise in verschiedenen Hirnregionen hinweist (Holtmaat et al. 2005). Im Kortex sind auch über das gesamte Leben bleibende Dornen beobachtet worden, möglicherweise als strukturelle Basis lebenslanger Erinnerungen (Yang et al. 2009). Lernen und sensorische Reize führen in kortikalen Arealen zu einem höheren Dornenumsatz (Yang et al. 2009). Bei einer Abnahme der sensiblen Reize (Whisker Trimmen) über eine längere Zeit kommt es einer Stabilisierung der Dornen, also zu einer Reduktion des Dornenumsatz im Kortex (Zuo et al. 2005). Zu dem gleichen Effekt kommt es bei einer chronischen chemischen Blockade des NMDAR mittels MK-801 (Zuo et al. 2005).

Im Hippokampus sind Studien aufgrund der schwer zugänglichen Position deutlich erschwert und die in verschiedenen Studiendaten ermittelten Umsatzraten divers (Pfeiffer et al. 2018). Eine frühere Studie im Hippokampus wies einen kompletten Umbau der Dornen von PC im StrO in wenigen Wochen nach (Attardo et al. 2015). Eine andere Arbeit zeigte hingegen im StrR, dass fast alle Dornen (ungefähr 96%) über 16 Tage hinweg persistieren (Gu et al. 2014). Eine neuere Studie berichtet ebenfalls eine hohe Dornenumsatzrate mit ungefähr 40% Umsatz in vier Tagen im StrO, allerdings in Abhängigkeit der Dornengröße, wobei sich größere Dornen als stabiler erwiesen (Pfeiffer et al. 2018).

1.2.8 Zwei-Photonen Mikroskopie

Für die Untersuchung neuronaler Strukturen und Schaltkreise im intakten Gewebe *in vivo* ist eine Darstellungstiefe von mehreren Hundert μm notwendig. Durch herkömmliche Mikroskope lässt sich diese Tiefe aufgrund von Streuungseffekten, Phototoxizität und Ausbleichung in der Regel nicht erreichen. Zwei-Photonenmikroskopie ist eine bildgebende Methodik, die die Visualisierung tieferliegender Strukturen ermöglicht (Helmchen and Denk 2005; Xu et al. 2024).

In der Zwei-Photonen Mikroskopie werden speziell gepulste Hochleistungslaser mit einer hohen Spitzenleistung eingesetzt. Durch diese ergibt sich statistisch der Zwei-Photonen-Effekt, bei dem zwei Photonen gleichzeitig ein Fluorophor anregen. Hierdurch kann für die Anregung längerwelliges Licht verwendet werden, welches durch geringere Streuung eine tiefere Eindringtiefe erreicht (Denk et al. 1990; Helmchen and Denk 2005). Nachdem durch diese Methodik nur Moleküle innerhalb des Fokuspunktes fluoreszieren, ist das Ausbleichen der Farbstoffe und die Phototoxizität auf ein sehr kleines Volumen beschränkt. Dementsprechend kann durch die Zwei-Photonen Mikroskopie eine höhere Eindringtiefe in das Gewebe und eine geringere Phototoxizität erreicht werden (Denk et al. 1990; Helmchen and Denk 2005).

Diese Form der Mikroskopie ermöglicht durch die bessere Eindringtiefe und hohe Auflösung die detaillierte Darstellung neuronaler Strukturen im intakten Hirngewebe. Mittlerweile ist es mithilfe der Implantation eines hippokampalen Fensters möglich, dendritische Dornen der CA1 Region im Hippokampus über mehrere Wochen im lebenden Tier zu visualisieren (Attardo et al. 2015; Gu et al. 2014). Dies ermöglicht die Untersuchung der strukturellen Plastizität dendritischer Dornen und damit die Erforschung des neuronalen und synaptischen Remodellings bei Lern- und Gedächtnisprozessen (Gu et al. 2014; Xu et al. 2024).

1.3 Die Auswirkung einer NMDAR Dysfunktion auf neuronale Schaltkreise

1.3.1 NMDAR Hypofunktion- Was wissen wir aus anderen Erkrankungen?

Bisher fokussierte sich die Forschung im Bereich NMDAR AE auf die Beeinträchtigung der PC. Hierbei wurde vor allem eine Reduktion der Exzitabilität von PC und eine verminderte

Frequenz ihrer Aktionspotentiale festgestellt, was zu einer Hypoaktivität des Netzwerks führt (Ceanga et al. 2023; Koch et al. 2019). Zudem gibt es jedoch zahlreiche Hinweise, dass auch die Dysfunktion inhibitorischer Interneurone für die Pathogenese der Erkrankung ausschlaggebend sein könnte (Hunter et al. 2021). Grundsätzlich ist dabei die Überlegung wichtig, inwiefern die komplexen neurologischen und psychiatrischen Manifestationen der Erkrankung auf neuronaler Schaltkreisebene erklärbar sind. Hierbei ist der Wissensstand der Auswirkungen einer NMDAR Dysfunktion in anderen Erkrankungen des ZNS hilfreich. Bei der NMDAR AE kommt es durch die Antikörperbindung und Internalisierung der Rezeptoren zu einer NMDAR Hypofunktion (Hughes et al. 2010). Die NMDAR Hypofunktion ist eine weit verbreitete Hypothese für die Entstehung psychotischer Symptome (Nakazawa and Sapkota 2020). Die Idee basiert auf der Beobachtung, dass NMDAR Antagonisten wie Phencyclidin oder Ketamin schizophrenietypische Symptome wie beispielsweise Depersonalisation, desorganisiertes Denken oder Sprachauffälligkeiten wie Echolalien oder Neologismen bei gesunden Probanden auslösen können (Luby et al. 1959). Wird die Droge in höheren Dosierungen konsumiert, können auch akustische Halluzinationen, Feindseligkeit und Wahn auftreten (Allen and Young 1978). Eine rein klinische Unterscheidung einer Intoxikation mit Phencyclidin und einer akuten Schizophrenie ist aufgrund dieser sehr ähnlichen Symptomatik schwierig (Erard et al. 1980). Auch PatientInnen mit NMDAR AE stellen sich häufig mit psychotischen Symptomen vor, die denen einer Schizophrenie oder denen durch Konsum von NMDAR Antagonisten ausgelösten Auffälligkeiten sehr ähneln (Dalmau et al. 2011). Nicht selten erhalten die Erkrankten initial die Diagnose einer akuten Psychose oder Schizophrenie (Al-Diwani et al. 2019). Umgekehrt findet man auch bei PatientInnen mit Schizophrenie teilweise Antikörper gegen den NMDAR (Steiner et al. 2013). Diese unterscheiden sich jedoch häufig durch einen anderen Subtyp und eine andere Bindungsstelle von den bei NMDAR AE nachgewiesenen Antikörpern (Pollak et al. 2014; Steiner et al. 2013).

Diese klinische Beobachtung konnte mittlerweile durch verschiedene Entdeckungen gestützt werden. So wurden beispielsweise verschiedene Risikogene für Schizophrenie beschrieben, die direkt oder indirekt den Signalweg des NMDAR beeinflussen (Harrison and Owen 2003; Timms et al. 2013; Weickert et al. 2013). Außerdem entwickelten Mäuse mit genetischen Veränderungen der Funktionalität des Rezeptors oder der verbundenen Signalwege ebenfalls Schizophrenie-typische Verhaltensauffälligkeiten (Belforte et al. 2010; Born et al. 2015). In diesen Modellen scheint die Hypofunktion des NMDAR synchronisierte Aktivitätsmuster, wie γ -Oszillationen, zu stören, welche bei vielen kognitiven Prozessen wie Lernen und Gedächtnis eine Rolle spielen (Buzsaki and Wang 2012; Uhlhaas and Singer 2010).

Inwiefern diese Hypofunktion des NMDAR zu psychotischen Episoden führt, ist Gegenstand intensiver Forschung. Man geht davon aus, dass bei PatientInnen mit Schizophrenie bestimmte inhibitorische Schaltkreise pathologisch verändert sind (Lewis 2014). Aus post-mortem Studien weiß man, dass Schizophrenie mit Defiziten der Gabaergen synaptischen Transmission assoziiert ist (Lewis et al. 2005). Eine der am besten replizierbaren Entdeckungen als Hinweis auf eine veränderte Funktion inhibitorischer Interneurone ist die reduzierte Expression von in inhibitorischen Interneuronen vorkommenden GAD67

(Gonzalez-Burgos et al. 2010). Im Kortex wurde beobachtet, dass eine pharmakologische Inhibition der NMDAR durch MK801 die Aktivität inhibitorischer Interneurone senkt. Zeitverzögert kommt es zu einer verstärkten Aktivität der PC (Homayoun and Moghaddam 2007). Eine NMDAR Hypofunktion scheint also die inhibitorische Kontrolle zu stören. Durch diese Disinhibition kommt es dann zu einer kortikalen Überaktivität mit desorganisiertem Feuern der Nervenzellen und weniger kontrollierter und synchronisierter Aktivität in Form von „burst firing“ (Homayoun and Moghaddam 2007; Jackson et al. 2004). Auch eine selektive Unterdrückung NMDAR abhängiger LTP im Hippokampus führt zu einer Disinhibition und einer Dysorganisation neuronaler Aktivität (Grunze et al. 1996). Bisher stand vor allem die Dysfunktion PV positiver Interneurone im Fokus der Forschung (Gonzalez-Burgos et al. 2010; Lewis 2014; Van Derveer et al. 2021). Eine alleinige Veränderung PV-positiver Interneurone kann die entstehenden Symptome jedoch nicht ausreichend erklären (Lewis 2009). Es gibt Hinweise, dass auch SST-positive Interneurone eine wichtige Rolle spielen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass bei Schizophrenie die Transkription von SST im Kortex reduziert ist (Hashimoto et al. 2008). Ebenso sind Hirnströme bei Aktivität des Arbeitsgedächtnisses, die mit der Regulation durch SST positive Interneurone in Zusammenhang gebracht werden, bei dieser Erkrankung reduziert (Beierlein et al. 2000; Schmiedt et al. 2005). Auch bei Alzheimer PatientInnen konnte eine Reduktion der Anzahl der SST Interneurone im Kortex beobachtet werden (Waller et al. 2020). Kognitive Defizite korrelieren mit einer abnehmenden Anzahl an SST-Interneuronen im Hippokampus (Koh et al. 2014). Eine partielle genetische Ablation dieses Interneuronentyps in Mäusen kann Lern- und Gedächtnisdefizite sogar auslösen (Koh et al. 2014; Nagarajan et al. 2024). Ebenso kann eine optogenetische Inhibition GABAerger Interneurone im Hippokampus den Abruf von Erinnerungen stören (Andrews-Zwilling et al. 2012). Diese Studien weisen daher gemeinsam auf die wichtige Rolle von Interneuronen in neuronalen Schaltkreisen und kognitiven Prozessen hin.

1.3.2 NMDAR auf inhibitorischen Interneuronen – Eine andere Beeinflussung durch andere Rezeptoreigenschaften?

Ein anderer wichtiger Unterschied zu PC ist die unterschiedliche Dichte und Zusammensetzung von NMDAR auf inhibitorischen Interneuronen. Aus immunhistochemischen Färbungen der im NMDAR obligat vorkommenden GluN1 Untereinheit weiß man, dass NMDAR auf den verschiedenen Zelltypen des Hippokampus unterschiedlich dicht exprimiert werden (Nyiri et al. 2003). Dabei haben PC eine sehr hohe Dichte an GluN1 und damit NMDAR, während vor allem PV-exprimierende Interneurone eine geringere Dichte an NMDAR aufweisen (Nyiri et al. 2003). Auf SST-exprimierenden Interneuronen konnten GluN1 in Soma-Nähe nachgewiesen werden. Die AutorInnen postulierten, dass die Dichte mit zunehmenden Abstand vom Soma sogar weiter zunimmt (Nyiri et al. 2003). Insgesamt sind auf inhibitorischen Interneuronen im Verhältnis zu anderen Glutamaterezeptoren weniger NMDAR als auf PC zu finden (Matta et al. 2013). Dies könnte zu einer anderen Beeinflussung der Funktionalität inhibitorischer Interneurone durch NMDAR AK führen.

Insbesondere die geringere Dichte an NMDAR bei starker Abhängigkeit der Zellen von der Funktion des NMDAR könnte eine schnellere Ausschöpfung der vorrätigen NMDAR auf Interneuronen bedingen (Hunter et al. 2021). Tatsächlich zeigte sich nach Gabe des NMDAR Blockers MK-801 eine Abnahme der Dichte und Dynamik dendritischer Dornen inhibitorischer Interneurone im Hippokampus als Hinweis auf eine starke NMDAR abhängige Regulation dieser Zellen (Perez-Rando et al. 2017b).

Des Weiteren unterscheidet sich die Verteilung der NMDAR Untereinheiten in verschiedenen Zelltypen. Sowohl PC, als auch inhibitorische Interneurone, bilden GluN2A und GluN2B Untereinheiten aus. Die GluN2A-Expression ist auf hippocampalen Interneuronen geringer als auf PC (Akgul and McBain 2016; Matta et al. 2013). Über die Expression von GluN2C und GluN2D ist bisher wenig bekannt. GluN2D ist jedoch im Gegensatz zu Pyramidenzellen auf verschiedenen Interneurontypen stark exprimiert (Standaert et al. 1996).

Die Expression der langsamer reagierenden GluN2B und GluN2D enthaltenden NMDAR könnte für ein längeres zeitliches Fenster für synaptische Verarbeitung sorgen, während ein Wechsel zu dem schnelleren GluN2A eine genauere und schnellere synaptische Reaktion ermöglicht (Akgul and McBain 2016; Vicini et al. 1998). Die vermehrte Expression von GluN2B auf Interneuronen ist wichtig für die Reifung der Synapsen auf hippocampalen inhibitorischen Interneuronen (Kelsch et al. 2014). Eine Deletion von GluN2B in inhibitorischen Interneuronen bedingt eine verminderte Anregung inhibitorische Netzwerke, die dann durch eine Disinhibition eine Hyperaktivität bis hin zu epileptischer Aktivität hervorruft (Kelsch et al. 2014). Die Expression von GluN2D wird auch mit dem bei inhibitorischen Interneuronen auftretenden tonisch aktiven NMDAR in Zusammenhang gebracht (Riebe et al. 2016). Des Weiteren geht man davon aus, dass an offene Kanäle bindende NMDAR Antagonisten vor allem an diesen tonisch aktiven NMDAR binden und inhibitorische Interneurone deshalb vulnerabler für diese NMDAR Antagonisten sind (Riebe et al. 2016). Auch NMDAR AK binden vor allem an offene NMDAR (Gleichman et al. 2012), wodurch eine selektive Vulnerabilität von Interneuronen entstehen könnte.

1.3.3 Beeinflussung inhibitorischer Interneurone durch NMDAR Autoantikörper

Bisher konnte bereits gezeigt werden, dass bei der NMDAR AE die antikörperabhängige Bindung und Internalisierung der Rezeptoren tatsächlich nicht nur exzitatorische Nervenzellen, sondern auch inhibitorische Zellen betrifft (Moscato et al. 2014). Es gibt Anzeichen für eine kompensatorische Verminderung der synaptischen Verbindungen inhibitorischer Neurone mit exzitatorischen Nervenzellen bei einer NMDAR Hypofunktion in der NMDAR AE (Moscato et al. 2014). In *in vitro* Studien zur Auswirkung von NMDAR AK auf kortikale Zellen zeigte sich eine Hyperaktivität des Netzwerks durch eine verminderte Inhibition (Andrzejak et al. 2022). Interessanterweise scheinen die Antikörper im Kortex vor allem die Funktion inhibitorischer Interneurone zu stören und im Gegensatz zum Hippokampus eine geringere Wirkung auf exzitatorische Zellen zu haben (Andrzejak et al. 2022). Symonds et al. kamen allerdings mithilfe von biophysiological Berechnungsmodellen der EEG (Elektroenzephalogramm) Untersuchungen von NMDAR AE PatientInnen zu dem

Schluss, dass sich das NMDAR Defizit im frontoparietalen Kortex vor allem auf exzitatorische und weniger auf inhibitorische Interneurone bezieht (Symmonds et al. 2018). Es ist dementsprechend naheliegend, dass es durch die Hypofunktion des NMDAR auch im Hippokampus zu einer Dysbalance zwischen Erregung und Inhibition kommt. Wie genau sich eine solche Dysregulation im Schaltkreis äußern würde ist weiterhin unklar. Der zeitliche Verlauf der Erkrankung mit der diversen Symptomatik ist auf zellulärer Schaltkreisebene bisher nicht erklärbar. Inwiefern sich Veränderungen der Funktionalität des NMDAR auf die lokale Inhibition beziehungsweise Disinhibition und damit die Regulation von Informationsprozessierung auswirkt, ist auch für das Verständnis neuronaler Netzwerke und der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen relevant (Booker and Wyllie 2021). SST-Interneurone sind in verschiedenen Schaltkreisen involviert und integrieren somit eine Vielzahl an ankommenden Informationen. Obwohl sie bisher weniger im Fokus der Forschung standen als PV-exprimierende Nervenzellen, wird ihnen eine zentrale Rolle in Lern- und Gedächtnisprozessen zugeschrieben. Da sie zudem dendritische Dornen ausbilden, eignen sie sich für die Untersuchung neuronaler Plastizität durch bildgebende Methoden (Scheyltjens and Arckens 2016). Sie exprimieren die GluN1 Untereinheit des NMDAR (Nyiri et al. 2003), werden durch NMDAR AK gebunden und bilden dendritische Dornen aus, die sich NMDAR-abhängig modulieren lassen (Moscatto et al. 2014; Perez-Rando et al. 2017b), weshalb sie ideale Kandidaten für eine bildgebende Studie der strukturellen Plastizität inhibitorischer Interneurone im Hippokampus bei NMDAR AE sind.

1.3.4 Mikroglia

Die synaptische Plastizität wird auch durch einen anderen Zelltyp im Gehirn stark beeinflusst: Mikroglia. Mikroglia sind die 'Fresszellen' des Gehirns. Des Weiteren sind die an der Entwicklung des ZNS beteiligt und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation vieler physiologischer und pathologischer Vorgänge (Raghuraman et al. 2019). Morphologisch zeichnen sie sich durch einen kleinen Zellkörper und lange, verästelte Ausläufer aus (Nayak et al. 2014; Raghuraman et al. 2019). Diese Fortsätze sind ständig in Bewegung. Sie werden ausgestreckt und zurückgezogen, um so weitläufige Areale zu durchsuchen (Colonna and Butovsky 2017). Bei Schädigungen bewegen sich die Fortsätze zur Verletzungsstelle und phagozytieren das betroffene Gewebe (Colonna and Butovsky 2017). Bei größeren Verletzungen wechseln sie in einen aktivierten Status. Innerhalb von wenigen Minuten vergrößern sich ihre Zellkörper, ihre Fortsätze ziehen sich zurück und verdicken sich. Es bilden sich kleine, schnell bewegliche Protrusionen und zum Teil kann die gesamte Zelle in Richtung des geschädigten Gewebes migrieren. Diese Aktivierung geht ebenfalls mit vielen transkriptionellen Veränderungen einher (Colonna and Butovsky 2017; Stence et al. 2001).

Mikroglia regulieren auch die Funktion von synaptischen Kontakten im Gehirn (Ball et al. 2022). Dies beginnt bereits in den frühen Phasen aktivitätsabhängiger Plastizität. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Stabilisierung von frühen LTPs (Raghuraman et al. 2019). Des Weiteren beeinflussen sie die synaptische Plastizität durch die Freisetzung

inflammatorischer und anti-inflammatorischer Moleküle (Golia et al. 2019). Dabei haben verschiedene proinflammatorische Moleküle sehr unterschiedliche Effekte: Der Tumornekrosefaktor α (TNF α) bewirkt eine Zunahme von LTP und damit eine Übererregbarkeit der Nervenzellen (Pettigrew et al. 2016). Interleukin (IL) 1 β hingegen behindert die Formierung von LTPs (Hoshino et al. 2017). Die Inhibierung der Aktivierung von Mikroglia und somit der Freisetzung proinflammatorischer Moleküle scheint die synaptische Plastizität, die dendritische Dornendichte und damit in verschiedenen Modellen kognitive Funktionen oder Heilprozesse insgesamt zu stärken (Feng et al. 2019; Sun et al. 2020). Auch nach der Bildung von zellulären Kontakten kontrollieren und interagieren Mikroglia mit Synapsen. Während der Entwicklung umschlingen sie Synapsen und eliminieren sie. Ist dieser Prozess gestört, kommt es zu einem Überschuss unreifer synaptischer Strukturen (Paolicelli et al. 2011). Im entwickelten Gehirn sind ebenfalls Interaktionen mit Synapsen beschrieben, die zur Elimination von synaptischen Elementen führen (Tremblay et al. 2010; Wake et al. 2009). Hier scheinen die Fortsätze der Fresszellen lediglich Fragmente von Präsynapsen in sich aufzunehmen, was auch als partielle Phagozytose oder Trogozytose (griech. „Nagen“) bezeichnet wird. An den Postsynapsen kommt es nach dem Kontakt mit Mikroglia häufig zur Bildung von Filopodien (Weinhard et al. 2018). Inwiefern postsynaptische Elemente auch durch Mikroglia eliminiert werden, wird weiterhin diskutiert. Einige Studien zeigen auch postsynaptische Fragmente in Mikroglia (Paolicelli et al. 2011; Schafer et al. 2012), während andere selektiv die Elimination präsynaptischer Elemente nachweisen (Weinhard et al. 2018). Die Regulation von Synapsen durch Mikroglia ist abhängig von neuronaler Aktivität, dementsprechend werden vor allem inaktive Synapsen markiert und von Mikroglia erkannt und eliminiert (Györfy et al. 2018). Es werden verschiedene Signalwege für diese synaptische Verschlingung diskutiert, unter anderem das neuronale Fraktalkin (CX3CL1) und der komplementabhängige C1q-Weg (Gunner et al. 2019; Györfy et al. 2018). Beispielsweise bei der Alzheimer Erkrankung kommt es aufgrund einer überschießenden komplementabhängigen Synapsenentfernung durch Mikroglia zu einem Synapsenverlust (Hong et al. 2016). Ähnliche Pathomechanismen werden auch für andere Erkrankungen des ZNS, wie beispielsweise dem West-Nil-Virus, der Schizophrenie oder Nervenschädigungen diskutiert (Norris et al. 2018; Vasek et al. 2016; Yilmaz et al. 2021).

Andere extrazelluläre Markierungen, wie SIRP α schützen die synaptischen Elemente vor einem Abbau durch Mikroglia (Sato-Hashimoto et al. 2019). Durch Modifikation exzitatorischer und inhibitorischer synaptischer Verbindungen regulieren Mikroglia die Konnektivität und die Aktivität innerhalb neuronaler Schaltkreise (Liu et al. 2021). Nervenzellen schütten bei Aktivierung Adenosintriphosphat aus, welches Mikroglia Fortsätze anzieht (Haynes et al. 2006; Pankratov et al. 2006). Mikroglia wandeln Adenosintriphosphat enzymatisch zu Adenosin um (Badimon et al. 2020). Adenosin bindet an einen Rezeptor auf den Nervenzellen und verhindert eine Hyperaktivierung der Zelle. Dieser negative Feedback Mechanismus verhindert eine Überaktivierung, die ansonsten beispielsweise zu epileptischen Anfällen führen könnte (Badimon et al. 2020).

Mikroglia haben somit eine sehr komplexe, aber entscheidende Rolle in der Regulation synaptischer Plastizität, neuronaler Verbindungen und kognitiven Funktionen (Ball et al.

2022). Bei Störungen dieses Gleichgewichts und abnormaler Aktivierung von Mikroglia kann es zu Dysregulationen neuronaler Schaltkreise kommen. Es ist daher nicht überraschend, dass Dysfunktionen dieser Prozesse bei verschiedenen kognitiven Defiziten und Erkrankungen eine kausale Rolle spielen (Cornell et al. 2022). Es gibt bereits Hinweise, dass Mikroglia aktiv an der Pathophysiologie autoimmuner Enzephalitiden, unter anderem der NMDAR AE beteiligt sind (Rahman et al. 2023). In humanen post-mortem Studien lässt sich eine massive Aktivierung von Mikrogliazellen mit Betonung im Hippokampus nachweisen (Tuzun et al. 2009). Die Folgen dieser Mikrogliaaktivierung sind bisher kaum weitergehend untersucht.

1.4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die strukturelle Plastizität von dendritischen Dornen auf SST-Interneuronen des Hippokampus in einem Tiermodell der NMDAR AE zu untersuchen. Des Weiteren soll die Aktivierung von Mikroglia im Hippokampus in diesem Tiermodell überprüft und die Interaktion der aktivierten Mikroglia mit dendritischen Dornen angesehen werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die strukturelle Plastizität SST-positiver Interneurone im Hippokampus untersucht. Hierfür wird eine Reportermauslinie (FVB(GadGFP) 45704 Swm/J, Jackson Laboratory) verwendet, die ein grün fluoreszierendes Protein in SST-Interneuronen exprimiert (Tamamaki et al. 2003). Als Antikörper der gegen die GluN1 Untereinheit des NMDAR verwenden wir rekombinante Antikörper, welche durch Isolierung und Sequenzierung der Immunglobulinketten von B-Gedächtniszellen aus dem Liquor von NMDAR AE PatientInnen gewonnen wurden (Kreye et al. 2016). Diese AK werden über einen Zeitraum von 18 Tagen in das Ventrikelsystem infundiert, um so ein Mausmodell für NMDAR AE zu erstellen (Planaguma et al. 2015). Hierdurch kann die Anzahl und Morphologie der dendritischen Dornen *ex vivo* an fixierten Hirnschnitten beurteilt werden. Anschließend können durch Zwei-Photonen Mikroskopie dendritischen Dornen longitudinal über mehrere Wochen *in vivo* am intakten Hirn beobachtet werden, wodurch die Dichte und Dynamik dieser synaptischen Strukturen im Verlauf der Krankheit erforscht werden kann.

Im Hinblick auf die zuvor erläuterte NMDAR Zusammensetzung, Verteilung und die Bindungseigenschaften des NMDAR AK ist eine starke Beeinflussung inhibitorischer Interneurone durch NMDAR AK naheliegend (Gleichman et al. 2012; Lynch et al. 2018; Matta et al. 2013; Riebe et al. 2016). Hier stellt sich nun die Frage ob und welche Veränderungen diese Beeinflussung auf struktureller Ebene nach sich zieht. Sehen wir, wie nach pharmakologischer Blockade des NMDAR eine verminderte Dornendichte (Perez-Rando et al. 2017b) oder ganz im Gegenteil eine Zunahme der Dornendichte? Zeigen sich vermehrte dynamische Filopodien und dünne Dornen als Hinweis auf Lernvorgänge (Chidambaram et al. 2019; Trachtenberg et al. 2002)? Oder gibt es mit größeren Dornenköpfen und mehr pilzförmigen Dornen Anzeichen einer Verstärkung bestehender Verbindungen (Bourne and Harris 2007; Chidambaram et al. 2019)?

Aus hippocampalen Zellkulturexperimenten wissen wir, dass es nach NMDAR Exposition auch bei inhibitorischen Interneuronen zu einer Verringerung der oberflächlichen NMDAR Dichte kommt (Moscato et al. 2014). In hippocampalen *in vitro* Untersuchungen zeigte sich eine verminderte Frequenz von Aktionspotentialen der PC und eine verminderte Netzwerkaktivität nach NMDAR AK Exposition (Ceanga et al. 2023; Koch et al. 2019). Der Großteil des exzitatorischen Inputs von SST-Interneuronen stammt jedoch von der Aktivierung durch PC (Takacs et al. 2024). Die zentrale Hypothese ist daher, dass es aufgrund von verminderten exzitatorischen Signalen zu strukturellen Anpassungen an der Postsynapse inhibitorischer Interneurone kommen könnte.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll die Rolle von Mikroglia in dieser Erkrankung untersucht werden. Zunächst wird an Hirnschnitten des Mausmodells durch Immunfluoreszenzfärbungen die Aktivierung von Mikroglia angesehen. In einem zweiten Schritt soll durch Immunfluoreszenzfärbung der Mikroglia und synaptischer Proteine eine Interaktion von Mikroglia mit exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen erforscht werden.

Hier stellt sich zunächst die Frage, ob wir eine Mikrogliaaktivierung im Mausmodell der NMDAR AE sehen. Nachdem es in humanen Autopsien zu einer massiven Mikrogliaaktivierung im Hippokampus kommt (Tuzun et al. 2009), vermuten wir diese auch im Tiermodell. Des Weiteren sind die Auswirkungen von Mikroglia auf synaptische Strukturen und damit auf neuronale Schaltkreise interessant. Mikroglia umschlingen und eliminieren synaptische Strukturen wenig aktiver Nervenzellen (Schafer et al. 2012; Tremblay et al. 2010). Diese Elimination synaptischer Strukturen kann durch immunhistochemische Färbungen der Lokalisation exzitatorischer und inhibitorischer präsynaptischer Markerproteine in Lysosomen von Mikroglia untersucht werden. Kommt es aufgrund der pathologischen Netzwerkaktivität zu einer vermehrten oder verminderten Elimination synaptischer Elemente? Nachdem es bei der NMDAR AE zu einer Hypoaktivität von PC kommt (Koch et al. 2019; Manto et al. 2010), würden wir eine vermehrte synaptische Umschlingung und Elimination exzitatorischer präsynaptischer Elemente durch Mikroglia erwarten. Da die inhibitorischen postsynaptischen Ströme unverändert und damit die Hemmung von PC durch inhibitorische Interneurone intakt zu sein scheint (Moscato et al. 2014), vermuten wir keine Veränderung der Elimination inhibitorischer präsynaptischer Fragmente.

2 Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Humane monoklonale Antikörper

Es wurden rekombinante, monoklonale humane IgG1 Antikörper gegen die GluN1 (bzw. NR1) Untereinheit des NMDAR (Klon #003-102) verwendet (Kreye et al. 2016). Als Kontrolle diente ein nichtreaktiver menschlicher Antikörper(#mGo53) des gleichen Isotyps (Jurek et al. 2019; Kreye et al. 2016).

2.1.2 Mauslinie und Tierhaltung

Es wurden homozygote Gad67-GFP Mäuse verwendet (FVB(GadGFP)45704Swn/J, Jackson Laboratory), die grün fluoreszierendes Protein (*green fluorescent protein*, GFP) in GABAergen, SST-positiven Interneuronen exprimieren (Tamamaki et al. 2003). Die Versuchstiere wurden in pathogenfreier Umgebung gehalten. Pro Käfig waren zwei bis fünf Mäuse des gleichen Geschlechts untergebracht. Ein zwölf Stunden Tag/Nacht Rhythmus wurde simuliert. Die Tiere hatten Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*. Die für die *in vivo* Versuche notwendige Implantation der Katheter und hippokampalen Fenster fand im Alter von sieben bis zwölf Wochen statt. Die *in vivo* Mikroskopie startete drei Wochen später. Die Implantation der Katheter für *in vivo* Versuche wurde nach den ersten beiden Mikroskopieuntersuchungen, entsprechend im Alter von elf bis siebzehn Wochen, durchgeführt. Insgesamt wurden dreizehn Tiere für *ex vivo* Versuche (sechs NMDAR AE (5♂, 1♀) und sieben Kontrolltiere (4♂, 3♀) und zehn Tiere (fünf NMDAR AE (2♂, 3♀) und fünf Kontrolltiere (3♂, 2♀)) für *in vivo* Versuche verwendet. Die Experimente wurden gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes (Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland, TierSchG) und der Regierung Oberbayern durchgeführt.

2.1.3 Operation

2.1.3.1 Vorbereitung der miniosmotischen Pumpen

Die miniosmotischen Pumpen (Alzet, 100µl, #1002, Abb.3) wurden 24 Stunden vor der Implantation in steriler Umgebung befüllt. Zunächst wurden die Antikörper auf eine Konzentration von 200 µg/ml (für *in vivo* Versuche) bzw. 100 µg/ml (für *ex vivo* Versuche) in 0,9 %iger Natrium-Chlorid Lösung verdünnt und in eine Spritze gefüllt. Für die *ex vivo* Versuchsreihe wurden in vier Versuchstieren (zwei NMDAR AE und zwei Kontrolltiere) lediglich eine Pumpe mit doppelter Antikörperkonzentration verwendet. Vor der Füllung der Pumpe wurde diese zunächst gewogen. Anschließend wurde die Pumpe in eine senkrechte Position gebracht und die Spitze der Antikörperspritze bis zum Boden der Pumpe bewegt. Die Lösung wurde in die Pumpe gefüllt bis die ersten Tropfen Flüssigkeit am Einstichsloch austraten. Das Fassungsvermögen der Pumpe betrug 100 µl. Die Pumpe wurde zur Bestätigung der vollständigen Füllung erneut gewogen. Die Abdeckkappe wurde auf den Strömungsmoderator geschoben. Dabei wurden 2-3 mm des Metallrohrs über dem

Kappenrand stehen gelassen, um den Schlauch zu befestigen. Hierdurch konnte der Schlauch über den hinausstehenden Strömungsmoderator geschoben werden. Das hintere Ende des Strömungsmoderators wurde in die Pumpe geschoben (Abb. 3). Die frisch befüllten Pumpen wurden in ein mit 0,9%iger Natrium-Chlorid Lösung gefülltes Röhrchen gelegt. Es wurde darauf geachtet, dass die Schlauchenden nicht flüssigkeitsbedeckt waren. So konnte einer Verdünnung der Antikörperlösung mit Natrium-Chlorid Lösung vorgebeugt werden. Das Röhrchen wurde über Nacht bei 37°C im Inkubator gelassen. Hierdurch konnten die Pumpen bereits Flüssigkeit aufsaugen, um direkt nach der Implantation zu funktionieren. Nach Befüllung der Pumpen wurde die Versuchsgruppe verschlüsselt, um eine zufällige Versuchsgruppeneinteilung und eine Verblindung für den restlichen Versuchsaufbau zu ermöglichen.

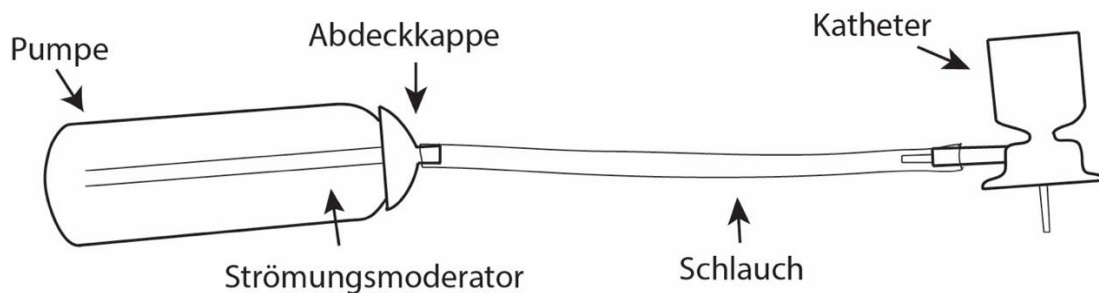


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer miniosmotischen Pumpe mit Schlauchsystem und Katheter.

2.1.3.2 Implantation der intraventrikulären Katheter und des hippokampalen Fenster

Die Mäuse wurden 30 Minuten vor Operationsbeginn mit Metacam (Meloxicam 1mg/kg Körpergewicht) und Midazolam (Metamizol-Natrium 200mg/kg Körpergewicht) analgisiert. Die Anästhesie erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion mit Fentanyl (0,05 mg/kg), Midazolam (5,0 mg/kg) und Medetomidin (0,5 mg/kg). Die Kopf- und Nackenhaare wurden rasiert. Die Mäuse wurden in ein sterotaktisches Gerät eingespannt und auf eine Heizmatte gelegt. Die Augen der Tiere wurden mit Bepantensalbe vor Austrocknung geschützt. Zur Kontrolle der ausreichenden Tiefe der Anästhesie wurden die Schmerzreflexe im Abstand von 15-20 Minuten getestet.

Die Kopfhaut wurde mit Povidon-Iod desinfiziert. Nach kurzer Einwirkzeit wurde mithilfe einer Klinge eine ca. zwei Zentimeter lange Öffnung in die Haut über dem Schädel geschnitten. Die Wundränder wurden mit Gewebekleber seitlich am Schädel fixiert. Das schmerzempfindliche Periost wurde mit Xylocain (Lidocainhydrochlorid 20mg/1g) lokal anästhesiert. Nach einigen Minuten Einwirkzeit wurde das Periost entfernt und der Schädel mittels einer Kanülenspitze aufgeraut.

Die Katheter wurden in der Halterung eingespannt. Überstehendes Plastik wurde mit einem Bohrer abgeschliffen. Die Positionen der Katheter und Fenster wurden mit Filzstift markiert (*ex vivo* Versuche: Injektionsstellen 1mm/-1mm lateral von Bregma und - 0,2 mm posterior von Bregma (Abb. 4a); *in vivo* Versuche: Injektionsstelle links: -0,2 mm posterior und 1 mm lateral von Bregma; Injektionsstelle rechts: -2,5 mm posterior und

3,5 mm lateral von Bregma; Fenster: 1,5 mm lateral und 1,5 mm posterior von Bregma (Abb. 4b). Der Schädel wurde an den entsprechenden Stellen durchbohrt.

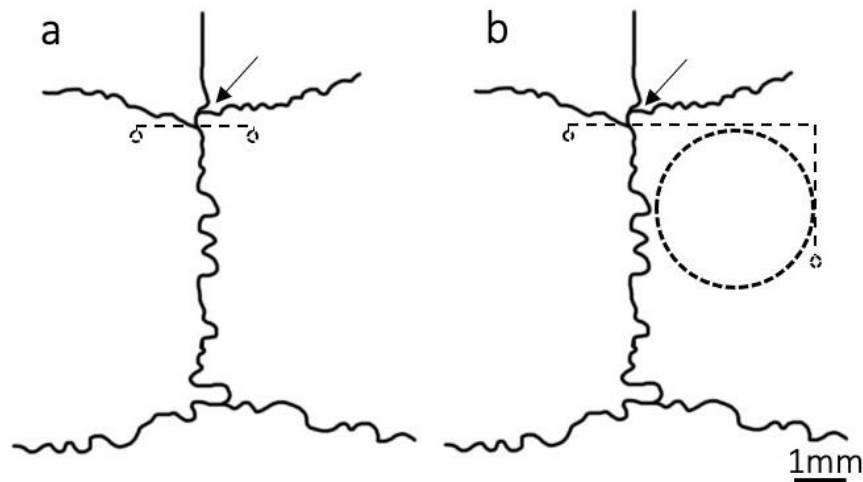


Abbildung 4: Position der Katheter und des hippocampalen Fensters. a) Bregma (Pfeil) und Injektionsstellen der Katheter für ex vivo Versuche (gestrichelte Kreise; 1mm seitlich und 0,2mm posterior von Bregma) b) Position von Fenster und Katheter der in vivo Versuche (Injektionsstelle links: -0,2 mm posterior und 1 mm lateral von Bregma; Injektionsstelle rechts: -2,5 mm posterior und 3,5 mm lateral von Bregma; Fenster: 1,5 mm lateral und 1,5 mm posterior von Bregma).

Bei den Tieren der *in vivo* Versuche wurde an der kreisförmig gebohrten Öffnung zunächst der Knochen entfernt. Die darunterliegende Hirnhaut (Abb.5a) wurde mithilfe einer Vakuumpumpe oder einer Pinzette entfernt. Das frei liegende Gehirn (Abb.5b) wurde konstant mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült.

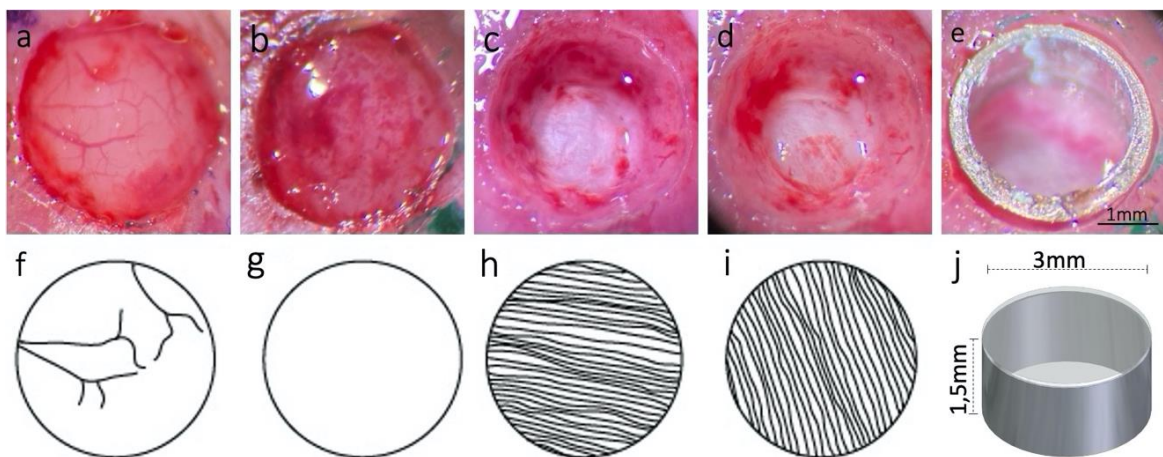


Abbildung 5: Implantation eines hippocampalen Fensters mit Schemazeichnungen. a) Hirnhaut mit Gefäßen nach Entfernung des Schädelknochens. b) Kortex nach Absaugen der Hirnhaut. c) Horizontale Fasern des Corpus callosum. d) Schräg verlaufende Fasern des Alveus des Hippokampus. e) Eingesetztes hippocampales Fenster. f) Schema der freigelegten Hirnhaut mit Gefäßen. g) Schema des Kortex. h) Schema der horizontal verlaufenden Fasern des Corpus callosum. i) Schema der schräg verlaufenden Fasern des Alveus. j) Technische Zeichnung des als hippocampales Fenster verwendeten Metallrohrs mit Plexiglasscheibe.

Der Kortex oberhalb des Hippokampus (kreisförmiges Areal mit dem Mittelpunkt 1,5mm lateral und 1,5mm posterior von Bregma) wurde vorsichtig abgesaugt, bis die horizontal liegenden Fasern des Corpus Callosums (Abb.5c) sichtbar waren und einen zirkulären Zugang zum Hippokampus ermöglichten. Diese oberen Schichten des Corpus Callosums wurden vorsichtig entfernt (Abb.5d). Zur Vorbereitung des hippokampalen Fensters wurde eine kleine Glasscheibe (Durchmesser 3 mm, Warner Instruments) mit Sekundenkleber auf ein kleines Metallrohr (Durchmesser 3 mm, Höhe 1,5 mm) geklebt. Das so entstandene Fenster wurde auf Dichtigkeit geprüft und anschließend mittels Ethanol desinfiziert. Vor dem Einsetzen wurde das Fenster (Abb.5e) kurz mit PBS gereinigt. Anschließend wurde es durch Gewebekleber (Histoacryl, Braun Surgical) fixiert.

Für die Implantation eines Katheters wurde dieser in eine spezielle Katheterhalterung eingespannt und mit einem Schlauch verbunden. Der Schlauch wurde mit 0,9% Natriumchlorid Lösung angespült. Für die *ex vivo* Versuche wurde eine vorbereitete Pumpe am Schlauch befestigt (Abb.6a). Für die *in vivo* Versuche wurde ein ca. zwei Zentimeter langer Schlauch ohne angeschlossene Pumpe implantiert. Das offene Ende des Schlauches wurde mittels Zahnzement (Paladur powder, Kulzer GmbH) versiegelt. Die Spitze des Katheters wurde zur Einstichstelle bewegt (Abb.6b). Unter Sichtkontrolle wurde die Spitze auf die Höhe des Kortex gebracht. Um dem Gehirn ausreichend Anpassungszeit zu geben wurde der Katheter in 0,5 mm Schritten über mehrere Minuten bis zu der gewünschten Tiefe herabgesenkt (Abb.6c). Anschließend wurde der umliegende Schädel getrocknet und der Katheter mit Zahnzement (Super Bond C&B, Sun Medical) befestigt (Abb.6d).

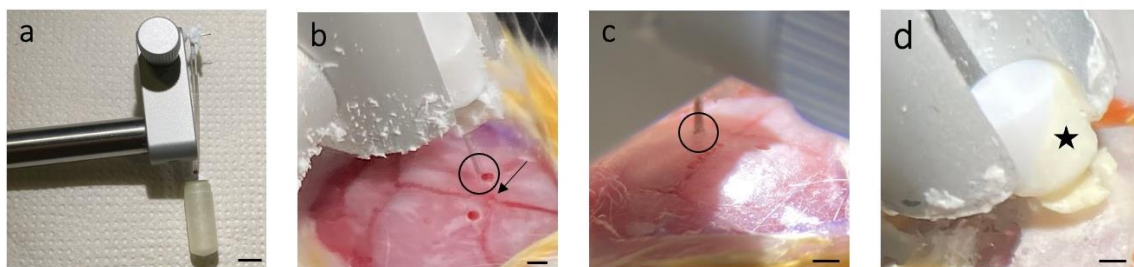


Abbildung 6: Implantation der intraventrikulären Katheter. a) Pumpe mit Schlauch und Katheter in Halterung. Maßseinheit 5mm. b) Katheterspitze (Kreis) über gebohrter Öffnung. c) Langsames Herabsetzen des Katheters. d) Fixierung des Katheters (Stern) mit Zement. Maßseinheit 1mm.

Nach dem Trocknen wurde die Halterung entfernt. Überstehendes Plastik wurde mithilfe eines Bohrers geglättet. Falls die Metallrohre des Katheters exponiert waren, wurden sie durch eine dünne Schicht Zement wieder versiegelt, um Infektionen vorzubeugen. Für die *in vivo* Versuche wurde eine Kopfhalterung angebracht. Diese wurde zunächst mithilfe von Knete in die richtige Position gebracht. Sie wurde möglichst weit kaudal positioniert, um beim Mikroskopieren optimalen Zugang zum hippokampalen Fenster zu erlangen. Außerdem wurde sie so nach vorne und auf die Seite gekippt, dass sie in beiden Freiheitsgraden auf einer Ebene mit dem Fenster lag. Die Kopfhalterung und das nur vorläufig fixierte Fenster wurden mit Zahnzement (Paladur powder, Kulzer GmbH) befestigt.

Überreste des Zements und Plastik wurden weggespült. Zur Platzierung der Pumpen bzw. Schläuche wurden durch eine stumpfe Pinzette zwei subkutane Taschen am Rücken geschaffen. Die Pumpen bzw. Schläuche wurden möglichst spannungsfrei in diese Taschen platziert. Bei den *ex vivo* Versuchen wurde der Schnitt mit 7-10 Einzelnahtstichen (Ethilon Polyamid 6 Monofilament, Ethicon LLC) genäht. Für die *in vivo* Versuche wurde die Haut um den Zement auf dem Schädel nach hinten gezogen und über den Schläuchen genäht. Der letzte Stich wurde mit Gewebekleber (Histoacryl, Braun Surgical) am Zement der Kopfklemme befestigt.

Anschließend wurde die Anästhesie durch intraperitoneale Gabe von Naloxon (1,2 mg/kg), Flumazenil (0,5 mg/kg) und Atipamezol (2,5 mg/kg) beendet und die Mäuse wurden bis zum vollständigen Erwachen auf einer Heizmatte gehalten. Die operierten Mäuse der *ex vivo* Versuche erhielten 12h, 24h, 48h und 72h nach der Operation Meloxicam (1mg/kg Körpergewicht) als Schmerzmittel. Die Mäuse der *in vivo* Versuche wurden durch Paracetamol im Trinkwasser (Konzentration: Tag 1 postOP: 3,5 mg/ml; Tag 2 postOP: 1,7 mg/ml; Tag 3 postOP: 1,3 mg/ml) mit einer Zieldosis von 200mg/kg analgesiert (Fleischmann et al. 2017). Zusätzlich wurden sie die ersten sieben Tage täglich und anschließend im Abstand von zwei Tagen nach Verhalten, Ess- und Trinkgewohnheiten und Nestbau beurteilt und gewogen. Falls Auffälligkeiten bestanden oder die Maus über 15% ihres Körpergewichts verloren hatte, wurde das Experiment abgebrochen. Die Mäuse der *ex vivo* Untersuchung wurden nach der Operation aufgrund der exponierten Katheterschläuche einzeln gehalten. Die Mäuse der *in vivo* Studie konnten weiterhin in gleichgeschlechtlichen Gruppen gehalten werden.

2.1.3.3 Implantation der miniosmotischen Pumpe

Die Pumpe wurden wie in 2.1.3.1 beschrieben vorbereitet. Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Fentanyl (0,05 mg/kg), Midazolam (5,0 mg/kg) und Medetomidin (0,5 mg/kg) anästhesiert. Nach Testung der Schmerzreflexe wurden die Mäuse am Rücken rasiert, mit Braunol desinfiziert und auf eine Heizmatte gelegt. Die Haut am Rücken der Maus wurde aufgeschnitten. Die mit Zement verschlossenen Katheterschläuche wurden aufgefunden. Die Schläuche wurden oberhalb des Zements abgeschnitten. Die Schlauchenden wurden über die Öffnung der Pumpen gestülpt. Mit einer stumpfen Pinzette wurden auf beiden Seiten des Rückens subkutane Taschen geschaffen, in die die Pumpen gelegt wurden. Die Haut wurde mit Einzelstichnähten (Ethilon Polyamid 6 Monofilament, Ethicon LLC) verschlossen. Die Anästhesie wurde mit Naloxon (1,2 mg/kg), Flumazenil (0,5 mg/kg) und Atipamezol (2,5 mg/kg) beendet. Die Mäuse wurden fünf bis zehn Minuten auf einer Heizmatte gehalten. Die Analgesie mit Paracetamol und die regelmäßige Beurteilung des klinischen Status der Versuchstiere erfolgte wie in 2.1.3.2 beschrieben.

2.1.4 Zwei-Photonen Mikroskopie

Nach einer Erholungszeit von drei Wochen wurden die ersten Aufnahmen angefertigt. Die Tiere wurden mit 3 Vol% Isofluran (in reinem Sauerstoff verdampft) voranästhesiert. Anschließend wurden sie durch die Kopfklammer an der Halterung des Mikroskops fixiert. Die Anästhesie wurde mit ungefähr 1-2 % Isofluran (in Sauerstoff verdampft) über einen Plastikschauch am Mikroskop fortgesetzt. Die Maus lag auf einer Heizplatte. Die Augen wurden mit Bepanthensalbe vor Austrocknung geschützt. Die Atemfrequenz wurde durch ein physiologisches Monitoring System (HPMS, Harvard Apparatus) überwacht. Das Fenster wurde vorsichtig mit destilliertem Wasser gereinigt. Anschließend wurde Ultraschallgel 1:1 in Wasser verdünnt blasenfrei in und auf das Fenster gegeben. Das Objektiv (16x, 0,8 NA, Nikon Europe B.V.) wurde eingesetzt und vorsichtig in die Nähe des Fensters herabgesetzt.

Ein Titan:Saphir Laser (Mai Tai; Spectra Physics, Santa Clara) sendete Laserpulse in einer Frequenz von 80-MHz bei einer Wellenlänge von 950 nm aus. Das emittierte Licht wurde durch einen dichroitischen Strahlenteiler (dichroic beamsplitter, ThorLabs) aufgeteilt und der grüne Anteil durch einen Bandpassfilter (525nm) mittels einem GaASP Avalanche Photodetektor (PMT, Hamamatsu) gemessen. Als Mikroskop diente ein Resonanz-Scanner Zweiphotonenmikroskop (HyperScope Scientifica).

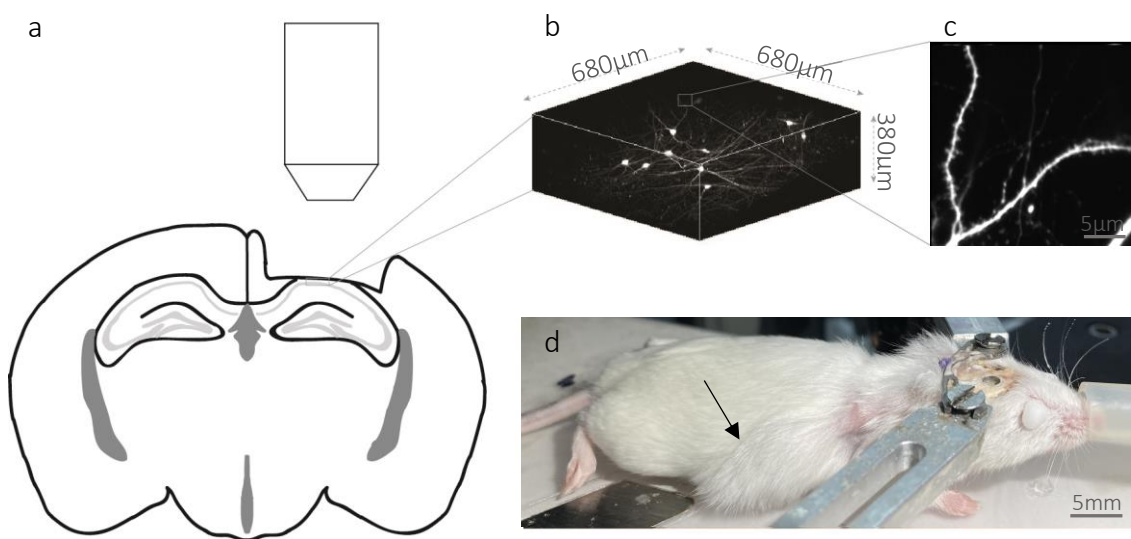


Abbildung 6: Zwei Photonen Mikroskopie. a) Schemazeichnung der untersuchten Hirnregion: Objektiv über CA1-Region des Hippokampus. b) Dreidimensionale Übersichtsaufnahme einer markanten Neuronengruppe (680 x 680 µm in X- und Y- Richtung; 2 µm – Z-Auflösung). c) Hochauflösende Aufnahme einer dendritischen Astgabelung (57 x 57 µm in X—und Y- Richtung; 1 µm in Z- Auflösung). d) Versuchstier in Mikrophalterung: Fixierung mittels einer Kopfhalterung. Anästhesie über Plastikschauch an der Schnauze. Implantierte subkutane Pumpe (Pfeil) erkennbar.

Es wurde eine Neuronengruppe als Orientierungspunkt definiert (Abb.6a, b), anhand welcher später Positionen im Programm (SciScan, Scientifica) gespeichert werden konnten. Anschließend wurde eine Übersichtsaufnahme (680 x 680 µm in X, Y; 5 µm in Z) der

Zellkörper angefertigt (Abb.6b). Später konnte so der Abstand der analysierten dendritischen Abschnitte zum Soma gemessen werden. Außerdem konnte diese Aufnahme verwendet werden, um geeignete dendritische Abschnitte zur genaueren Analyse aufzufinden. Es wurden Abschnitte mit gut analysierbaren dendritischen Dornen gewählt, die eindeutig einer Zelle zugeordnet werden konnten (Abb.6c). Diese wurden hochauflösend aufgenommen (57 x 57 μm in X, Y; 1 μm in Z; 12x Zoom, 512 x 512 Pixels, 30Hz Bildrate). Es wurden 100 Bilder pro Bildebene aufgenommen, welche posthoc für Bewegungsartefakte korrigiert und dann gemittelt wurden. Die genaue Position wurde mittels einer Skizze notiert. Pro Versuchstier (fünf NMDAR AE- (2♂, 3♀) und fünf Kontrolltiere (3♂, 2♀)) wurden fünf dendritische Äste aufgenommen. Es wurden zwei Tage vor und am Tag der Pumpenimplantation Aufnahmen angefertigt. Danach wurden die Tiere 5, 7, 16 und 18 Tage nach der Pumpenimplantation mikroskopiert.

2.1.5 Kardiale Perfusion

Die Tiere wurden mit Ketamin (130 mg/kg) und Xylazin (10mg/kg) anästhesiert. Sobald keine Schmerzreflexe mehr auslösbar waren, wurden die Mäuse an allen vier Extremitäten auf einer Styroporplatte befestigt. Die Bauchhaut und das Peritoneum wurden aufgeschnitten, anschließend wurde der Thorax eröffnet. Mithilfe einer Butterfly- Nadel wurde der linke Herzventrikel punktiert. Danach wurde PBS mit Heparin (2mg/kg) durch den Kreislauf gepumpt. Sobald das Blut fertig ausgespült war, wurde 4% Paraformaldehyd durch den Kreislauf gepumpt, bis eine gute Fixierung des Gewebes erreicht war. Das Gehirn wurde entfernt und weitere 24 h in Paraformaldehyd postfixiert. Nach diesen 24h wurde die Lösung zu PBS mit Natriumazid (0,05% NaN₃) gewechselt.

2.1.6 Anfertigung von Gehirn-Schnitten

Die Gehirne wurden mit einem Vibratom (Leica VT100 S, Deutschland) oder einem Kryostat (Leica CM1520, Deutschland) geschnitten. Für das Schneiden der Hirne am Vibratom (alle Hirne der *in vivo* Studie, drei NMDAR AE und fünf Kontrollproben der *ex vivo* Versuchsreihe) wurden die Maushirne in 3 %-Agarose eingebettet. Der Agaroseblock wurde mit Sekundenkleber auf der Halterung befestigt. Die Pufferwanne wurde mit PBS (0,05% NaN₃) gefüllt. Es wurden 100 μm dicke Koronarschnitte angefertigt und in mit PBS (0,05% NaN₃) gefüllten 48 Well Platten gelagert. Für das Schneiden am Kryostat (drei NMDAR und zwei Kontrollproben der *ex vivo* Versuchsreihe) wurden die Maushirne nach der 24h langen Nachfixierung (s. 2.1.5) zur Entwässerung 30% Sucrose-Lösung gelagert bis sie zum Boden sanken. Die Hirne wurden durch Lagerung auf Trockeneis gefroren und anschließend in 60 μm dicke koronare Schichten geschnitten und in PBS mit Natriumazid (0,05% NaN₃) gelagert.

2.1.7 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbungen zur Verifikation der Antikörperbindung und für die morphologische Analyse der Mikrogliazellen wurden die Hirnschnitte in Multiwell Platten mit entsprechender Antikörperlösung inkubiert. Hierfür wurden die Schnitte zunächst 3x 5-10 Minuten in PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden anschließend 45-60 Minuten mit einem Puffer (0,5% Triton X-100 (TX100), 1% Bovines Serumalbumin (BSA), 10% Normalziegenserum (NZS) für die Antikörperverifikation bzw. 0,1% TX100, 1% BSA, 2% NZS für Mikrogliaanalyse in PBS) geblockt. Für die Antikörperverifikation wurde ein sekundärer Antikörper gegen die Fc Region humaner Antikörper verwendet (goat anti-human, A 21091). Dieser wurde im Verhältnis 1: 500 in einer Pufferlösung (0,5% TX100, 1% BSA, 5% NZS in PBS) bei 4°C über Nacht auf einem Plattformschüttler inkubiert. Für die morphologische Mikrogliaanalyse wurde zunächst ein primärer Anti-Iba-1 Antikörper (rabbit anti-mouse, #019-19741) ebenfalls im Verhältnis 1:500 in einer Pufferlösung (0,5% TX100, 1 % BSA in PBS) bei 4°C über Nacht inkubiert. Der hier notwendige sekundäre Antikörper mit dem gekoppelten Fluorophor Alexa647 (goat anti- rabbit, Fluorophor 647nm, A232733) wurde anschließend im Verhältnis 1:500 in Pufferlösung (0,5% TX100, 1 % BSA in PBS) zugegeben und zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach beiden Färbungen wurden die Zellkerne durch Inkubation mit DAPI (1:500) über fünf Minuten gefärbt, wonach erneut gewaschen wurde. Die Schnitte wurden auf Objektträger platziert und getrocknet, bevor sie mit ungefähr 100 µl Mounting Medium (Mounting Medium, Vectashield) pro Objektträger eingedeckt wurden.

Die Färbungen für die Untersuchung der Trogozytose von Synapsen durch Mikrogliazellen erfolgten auf den Objektträgern. Die Hirnschnitte wurden mit einem Skalpell in ihre beiden Hemisphären geteilt. Je eine Hemisphäre wurde für die Anfärbung des inhibitorischen präsynaptischen Proteins vGAT verwendet, die andere zur Darstellung des exzitatorischen präsynaptischen vesikulären Glutamattransporters 1 (vGlut1).

Beide Gruppen wurden zu Beginn und zwischen den Färbeschritten 3x 10 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur geblockt (10% NGS, 0,5% TX100 in PBS). Die primären Antikörper (Anti-Iba-1-Antikörper, rabbit anti-mouse, #019-19741; Anti-vGAT- Antikörper, guinea pig anti-mouse, SySy #131 308; Anti-vGlut1-Antikörper, chicken anti-mouse, SySy #135 316, Anti-CD68 Antikörper, rat anti-mouse, ab53444) wurden über Nacht bei 4°C (0,5% TX100, 5% NGS in PBS) inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die sekundären Antikörper (donkey anti- rabbit, Fluorophor 405nm ab175651; donkey anti-guinea pig, Fluorophor Cy3A, #706165148, donkey anti-chicken, Fluorophor 647nm, #703605155; donkey anti-rat, Fluorophor 594nm, A21209) zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (0,5% TX100, 5% NGS in PBS). In beiden Gruppen wurde für die Darstellung der Mikroglia ein Anti-Iba-1 Antikörper (rabbit anti-mouse, #019-19741) in einer Konzentration von 1:500 gewählt und mit einem sekundären Antikörper mit gekoppelten 405nm Fluorophor sichtbar gemacht. Für die Anfärbung des inhibitorischen präsynaptischen Proteins wurden Anti-vGAT- Antikörper (guinea pig anti-mouse, SySy #131 308) und Anti-CD68 Antikörper (rat anti-mouse, #ab53444) in Konzentrationen von 1:500 und 1:300 verwendet. Als sekundäre Antikörper

wurden ein Anti-Meerschweinchen- Antikörper mit dem Fluorophor AlexaCy3A (donkey anti-guinea pig, Fluorophor Cy3A, #706165148) und ein Anti-Ratte-Antikörper (donkey anti-rat, Fluorophor 594nm, A21209) verwendet. In der zweiten Gruppe wurden Antikörper gegen ein exzitatorisches präsynaptisches Protein, Anti-vGlut1- Antikörper (chicken anti-mouse, #SySy 135 316) und ebenfalls Antikörper gegen CD68 (rat anti-mouse, #ab53444) im Verhältnis von 1:500 und 1:300 zur Pufferlösung angewendet. Als sekundäre Antikörper wurden Anti-Huhn- Antikörper mit dem Fluorophor Alexa647nm (donkey anti-chicken, Fluorophor 647nm, #703605155) und Anti- Ratten- Antikörper mit dem Fluorophor 594nm (donkey anti-rat, Fluorophor 594nm, A21209) gewählt. Die Schnitte wurden erneut gewaschen, luftgetrocknet und mit Mounting Medium (Mounting Medium, Vectashield) bedeckt.

2.1.8 Konfokale Mikroskopie

Um die Bindung der NMDAR AK zu verifizieren wurden Übersichtsaufnahmen (1024 x 1024, Voxeldimensionen 0,75 μm in X,Y – Richtung und 1 μm in Z-Richtung) im Bereich des Ammonshorns (CA1-CA3) und Gyrus dentatus (DG) angefertigt (Abb. 8a,b), da in diesen Regionen des Hippokampus das spezifische Bindungsmuster des Antikörpers gut erkennbar ist. Die Schnitte wurden an einem konfokalen Mikroskop (Leica SP8WLL, Deutschland) aufgenommen. Es wurde ein 20x/0.75 Öl Objektiv verwendet. Die Exzitation betrug 633 nm und die emittierten Photonen wurden in einem Wellenlängenbereich zwischen 643 und 700 nm gemessen.

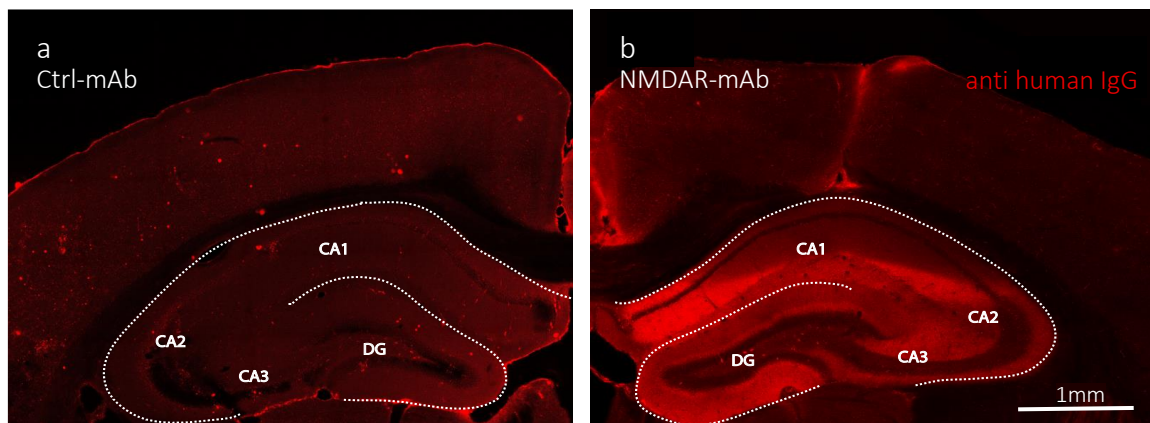


Abbildung 8: Bindungsmuster des NMDAR Autoantikörpers. a) Bindungsmuster nach Infusion mit Kontrollantikörper. b) Bindungsmuster nach Infusion mit NMDAR AK mit starkem Signal in NMDAR exprimierenden Regionen im Hippocampus mit Cornu ammonis (CA) und Gyrus dentatus (DG).

Für die Aufnahmen der morphologischen *ex vivo* Analyse der GAD67 positiven Interneurone wurde ein Konfokal-Mikroskop (Leica SP8WLL, Deutschland) verwendet. Die konfokalen Aufnahmen wurden durch ein 63x/1.40 Öl (HC PL APO 40x/1.30 Oil CS2, Leica) Objektiv angefertigt. Die Fluorophore wurden mit einem White Light Laser der Wellenlänge 488 nm angeregt. Die Emission wurde in einem Wellenlängenbereich von 498 bis 555 nm gemessen. Die Aperaturblende wurde auf 0,7 AU eingestellt, um Licht außerhalb des Fokuspunktes auszublenden. Es wurden zwölf Versuchstiere (davon fünf NMDAR AE (5 σ ,

1♀) und sieben Kontrolltiere (4♂, 3♀) verwendet. Pro Versuchstier wurden durchschnittlich sechs Aufnahmen in den hippocampalen CA1- und CA2 Regionen angefertigt. Zunächst wurden Übersichtsbilder aufgenommen (Abb. 9a, b). In diesen wurden die Zellkörper mit dendritischen Verzweigungen abgebildet. Anschließend wurden kurze Abschnitte dieser Verzweigungen hochauflösend aufgenommen (Voxelgröße 50 x 50 x 150 nm in X-, Y- und Z- Richtung; Abb. 9 c, d).

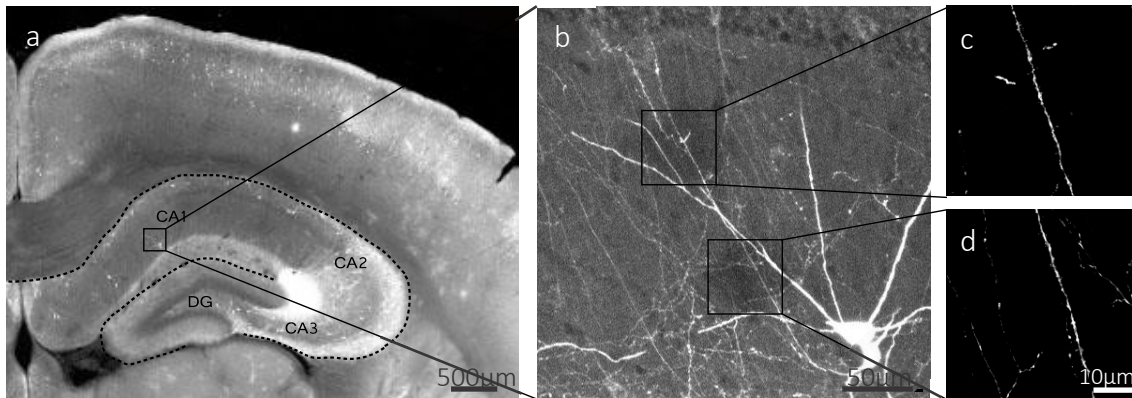


Abbildung 9: Analyse SST-exprimierender Interneurone im Hippokampus. a) Konfokale Übersichtsaufnahme des Hippokampus. b) Übersichtsbild eines inhibitorischen Interneurons. c) und d) Hochauflösende Aufnahmen dendritischer Abschnitte.

Die Aufnahmen für die morphologische Analyse der Mikrogliazellen wurden an einem konfokalen Mikroskop (Leica TCS SP8, Deutschland) mit einem Helium-Neon Laser angefertigt. Es wurde ein 40x/1.30 Ölobjektiv (40x/1.30 Oil, Leica) verwendet. Die Fluorophore wurden mit Wellenlängen von 405nm und 633 nm angeregt. Es wurden Wellenlängen zwischen 415 und 470 nm, sowie zwischen 643 und 700 nm detektiert. Insgesamt wurden acht Versuchstiere untersucht (vier NMDAR AE Tiere (4♂) und vier Kontrolltiere (2♂, 2♀). Dabei wurden pro Hemisphäre sechs Aufnahmen (1024 x 1024 Pixel in X- und Y Dimension, 0,2 µm in X- und Y- Auflösung, 0,4 µm in Z-Auflösung, gesamte Aufnahme ca. 40 - 70µm in Z) angefertigt. Die gescannten Areale waren gleichmäßig über die Schichten der hippocampalen CA1 und CA2 Regionen verteilt. Gefäßreiche Hirnschichten wurden gemieden.

Für die Darstellung der Phagozytose von Synapsen durch Mikrogliazellen wurden Aufnahmen von zwölf Versuchstieren (fünf NMDAR AE (5♂, 1♀) und sieben Kontrolltiere (4♂, 3♀) mit einem Weißlicht-Laser Konfokal-Mikroskop (Leica SP8WLL, Deutschland) erstellt. Es wurde ein 63x/1.30 Glycerin Objektiv verwendet. Die 175 x 175 x 8 µm in X-, Y- und Z-Richtung großen Scans (Pixelgröße: 0,086 µm in X und Y- Richtung und 0,3 µm in Z- Richtung) wurden mit einer Geschwindigkeit von 600 Hz bidirektional angefertigt. Für die Darstellung der Mikroglia wurde mit einer Wellenlänge von 405 nm angeregt und emittiertes Licht der Wellenlängen zwischen 413 und 441 nm mit einer Verstärkung von 65% gemessen. Für die Detektion der verschiedenen präsynaptischen Proteine wurden verschiedene weitere Kanäle verwendet: Für die mittels Anti- vGAT- Antikörper markierten

inhibitorischen Präsynapsen wurde ein zweiter Kanal mit 545nm Anregung und 553 - 572 nm Emissionsbereich aufgenommen. Um in einer dritten Sequenz das lysosomale Protein CD68 sichtbar zu machen wurde eine Emissionswellenlänge von 620 nm verwendet und im Bereich zwischen 627 und 642 nm registriert.

Für die Untersuchung von der durch Anti-vGLUT1- Antikörper dargestellten exzitatorischen Präsynapsen wurden ebenfalls insgesamt drei verschiedene Kanäle benötigt, wobei im Ersten die Mikroglia Zellen detektiert wurden (s.o.). In einem zweiten Kanal wurden die markierten vGlut1 Proteine mit Anregung von 652 nm und einem Detektionsspektrum von 660 - 690 nm aufgenommen. Das lysosomale Protein CD68 wurde in einem dritten Kanal mit einer Wellenlänge von 598 nm angeregt und in einem Bereich zwischen 607 - 626 nm registriert.

2.1.9 Bildprozessierung

Die konfokalen Aufnahmen der Dendriten und dendritischen Dornen wurden mit dem Dekonvolutionsprogramm Huygens Essential Version 16.05 (Scientific Volume Imaging B.V., Niederlande) unter Verwendung des CMLE-Algorithmus prozessiert. Das Verhältnis zwischen Signal und Hintergrundrauschen (Signal- To- Noise-Ratio) betrug 20 und die maximalen Wiederholungen des Prozessionsvorgangs wurden auf 40 begrenzt. Durch die bessere optische Trennung der Strukturen können morphologische Merkmale besser erkannt und gemessen werden, was die nachfolgende Analyse mit dem Programm Neuronstudio erleichtert (Neuronstudio Documentation, Mount Sinai School of Medicine).

2.1.10 Analyse der Bilddateien

Dichte und Klassifizierung dendritischer Dornen

Die Analyse aller Bilddateien erfolgte verblindet. Die konfokalen Aufnahmen der GAD67-positiven Interneurone wurden mit dem Programm Neuronstudio (NeuronStudio, Mount Sinai School of Medicine) analysiert. Dieses Programm ermöglicht die Rekonstruktion und automatisierte Analyse der Morphologie synaptischer Strukturen in Bilddateien. Die Dendriten wurden manuell markiert. Mit dieser Information ist Neuronstudio in der Lage, dendritische Dornen entlang des dendritischen Abschnitts zu erkennen. Es sortiert die Dornen in die drei Gruppen „dünn“, „stummelförmig“ und „pilzförmig“ (Abb. 10). Hierfür werden die Voxel eines Dorns gruppiert.

Die Zuordnung der drei Typen erfolgt anhand bestimmter Kriterien: Dem Verhältnis zwischen Kopf- und Halsdurchmesser, dem Verhältnis zwischen der Länge und dem Kopfdurchmesser und als drittes Kriterium dem Kopfdurchmesser. Dabei sind pilzförmige Dornen durch ein hohes Kopf- zu Halsdurchmesserverhältnis ($> 1,1$) und einem hohen Kopfdurchmesser ($> 3,5 \mu\text{m}$) charakterisiert. Dünne Dornen haben ein hohes Verhältnis zwischen Länge und Kopfdurchmesser ($> 2,5$). Stumpfe Dornen besitzen ein geringeres Kopf- zu Halsdurchmesserverhältnis ($< 3,5$) und ein niedrigeres Verhältnis von Länge zu Kopfdurchmesser ($< 2,5$) (Rodriguez et al. 2008). Die automatische Analyse wurde für

jeden Dendriten überprüft und bei inkorrektter Erkennung von Dornen manuell korrigiert. Außerdem wurde der Abstand des analysierten Abschnittes zum Zellkörper gemessen. Dies erfolgt mithilfe des Programms Image J (Wayne Rasband, USA). Diese Information wurde manuell in den durch Neuronstudio generierten Datensätzen ergänzt.

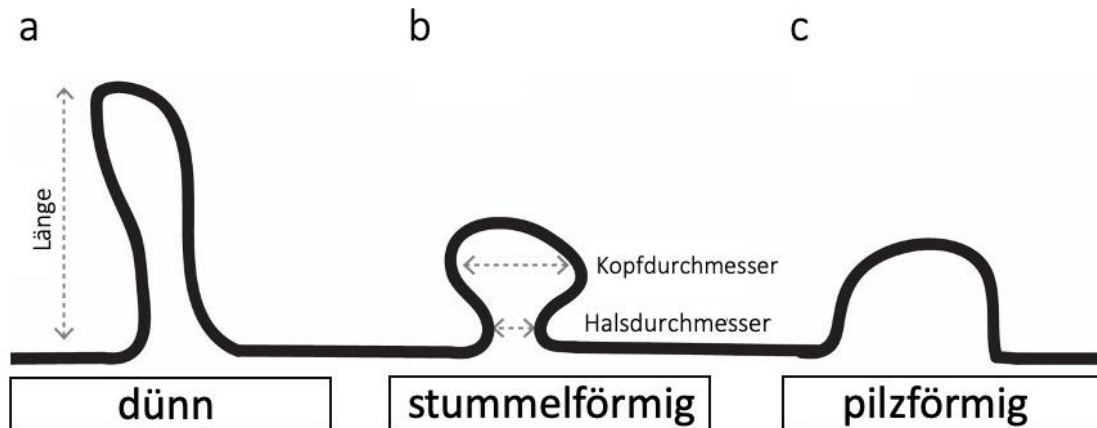


Abbildung 10: Typen dendritischer Dornen. a) Dünner Dorn mit schmalen Kopf und länglicher Form. b) Pilzförmiger Dorn mit großem Kopf und schmalen Hals. c) Stummelförmiger Dorn ohne Hals.

Mikroglia morphologie

Die morphologische Analyse von Mikroglia erfolgte automatisiert durch einen Algorithmus (Heindl et al. 2018) in MATLAB (R2018b, The MathWorks, Vereinigte Staaten). Die automatisierte Analyse involvierte vier Schritte. Zunächst wurden Bilderstapel hinsichtlich ihrer Qualität beurteilt. Hierfür wurden die einzelnen Bildebenen auf ihre Ähnlichkeit hin verglichen. Die jeweils obere und untere Bildebene wurde entfernt. Aufgrund des sehr geringen Abstands einzelner Bildebenen ($0,4\mu\text{m}$ in Z) wird eine hohe Ähnlichkeit erwartet und stärkere Abweichungen wurden als Qualitätsminderung interpretiert und diese Aufnahmen aus der Analyse ausgeschlossen. Anschließend wurden die einzelnen Zellen erkannt und in Zellkern, -körper und Fortsätze segmentiert. Es wurde ein Zellskelett zur Strukturbeurteilung rekonstruiert, aus dem schließlich verschiedene morphologische Eigenschaften errechnet werden konnten (Heindl et al. 2018). Ich untersuchte hier die Sphärizität und Zirkularität der Zellen, welche als Maß für die Kompaktheit der Zelle dienen. Die Sphärizität misst dabei die Kompaktheit eines dreidimensionalen Objektes in Abhängigkeit des Volumens und der Oberfläche. Die Zirkularität misst die zweidimensionale Kompaktheit in Abhängigkeit der Fläche und des Umfangs. Ein Kreis hätte dabei als kompaktestes zweidimensionales Objekt einen Wert von 1. Des Weiteren analysierte ich die Länge der Hauptäste, Anzahl der Dendriten und Anzahl der Dendritenabschnitte pro Hauptast, um die Ramifizierung zu beurteilen. Auch die Anzahl der gesamten Verzweigungspunkte und die Verflechtung der Verzweigungspunkte sah ich mir an. Die Länge der Zweige ist als längster möglicher Pfad der Kanten und Knoten zwischen dem ersten Knoten außerhalb des Zellkörpers und dem Endknoten definiert und wird als 75.tes Perzentil dargestellt. Hauptäste sind Verzweigungspunkte und -kanten innerhalb des zuvor definierten Zellfortsatzbereiches. Als Dendritenabschnitte wurden Verzweigungssegmente

bezeichnet, bei denen zwei Knoten durch eine Anzahl von Kanten ungleich zwei verbunden sind (Heindl et al. 2018).

Mikrogliale synaptische Phagozytose

Die Analyse der synaptischen Phagozytose durch Mikroglia erfolgte automatisiert mittels der Analysesoftware Imaris Version 5.5 (Oxford Instruments, Vereinigtes Königreich). Zunächst wurde die Oberfläche der Mikrogliazellen (Zellkörper und größere Fortsätze) modelliert und ihr Volumen bestimmt. Ebenso wurden lysosomale Strukturen innerhalb der Mikroglia anhand von CD68 erkannt. Nachfolgend konnten internalisierte synaptische Fragmente identifiziert werden. Zur Quantifizierung der Daten wurden die internalisierten Fragmente pro Mikroglia-volumen bzw. CD68 Volumen errechnet.

Dichte und Dynamik dendritischer Dornen *in vivo*

Die Zwei-Photonenaufnahmen der *in vivo* Versuche wurden manuell mithilfe der „Cell Counter“ Funktion von Image J (NIH, Bethesda, Vereinigte Staaten) analysiert. Dabei wurden dendritische Dornen gezählt, wenn sie sich mehr als vier Pixel (entsprechen ungefähr 4 μm) von der Oberfläche des benachbarten Dendriten abtanden und in mindestens zwei Bildebenen darstellbar waren. Durch den Vergleich verschiedener Zeitpunkte konnten stabile, abgebaute und neu gebildete Dornen analysiert werden. Diese Information wurde für jeden Dorn durch Dummy Kodierung tabellarisch dargestellt. Zur Bestimmung der Dornendichte wurde die Länge des analysierten Abschnitts in einer zweidimensionalen Projektion gemessen. Außerdem wurde der Abstand zum Zellkörper in der zweidimensional projizierten Übersichtsaufnahme gemessen. Neben der absoluten Dornendichte konnte die auf den Zeitpunkt 0 normalisierte Dornendichte ermittelt werden. Außerdem wurden die Raten an neugebildeten und verlorenen Dornen bestimmt. Hieraus konnten die Dornenüberlebensrate in Prozent (engl. survival fraction (SF); $\text{SF} = \text{Anzahl der Dornen zum Zeitpunkt } -2 / \text{Anzahl der Dornen zum Zeitpunkt } X$) und die Dornenumsatzrate (engl. turnover rate (TOR) = $(\text{neugebildete Dornen} + \text{abgebaute Dornen}) / (2 \text{ Dornen insgesamt})$) errechnet werden.

2.1.11 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der Datensätze erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 7.01 (Graphpad, Vereinigte Staaten). Alle Datensätze wurden zunächst durch einen Shapiro-Wilk-Test (Untersuchung struktureller Plastizität von SST- Interneuronen, Phagozytose von synaptischen Elementen durch Mikroglia) oder einen D'Agostino & Pearson Test (Mikrogliamorphologie) auf Normalverteilung getestet. Anschließend wurden Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen durch parametrische Tests geprüft. Bei Normalverteilung wurden die Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen anhand eines Welch-Test (vGlut1/Mikroglia-volumen) untersucht. Falls keine Normalverteilung vorlag, wurde ein Mann-Whitney- Test (Mikrogliamorphologie, *ex vivo* Untersuchung struktureller Plastizität von SST- Interneuronen, vGlut1 in CD68/Mikroglia-volumen, vGAT/Mikroglia-volumen, vGAT in CD68/Mikroglia-volumen) durchgeführt. Der p-Wert für statistische

Signifikanz wurde auf 0,05 festgelegt. Bei der Untersuchung der strukturellen Plastizität von SST-Interneuronen *in vivo* und *ex vivo* erfolgte eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung.

2.2 Material

2.2.1 Mikroskope

Bezeichnung	Hersteller	Ort
MaiTai	Spectra-Physics	Santa Clara, USA
Hyperscope	Scientifica	Uckfield, Großbritannien
SC10 Optical Beam Shutter Controller	ThorLabs	New Jersey, USA
Model 302RM Driver	Conoptics Inc.	Danbury, USA
Vaporizer for Isoflurane	Kent Scientific Corporation	Torington, USA
Dichroischer Strahlenteiler	ThorLabs	New Jersey, USA
Photomultiplier tube module	Hamamatsu	Hamamatsu, Japan

Tabelle 1: Zwei-Photonen Mikroskop

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Leica SP8WLL	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Leica TCS SP8	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland

Tabelle 2: Konfokale Mikroskope

Bezeichnung	Hersteller	Ort
HC PL APO 40x/1.30 Oil CS2	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
HC PL APO 63x/1.40 OIL CS2	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
40x/1.30 Oil CS2	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
CFI75 LWD 16X	Nikon Europe B.V.	Tokyo, Japan

Tabelle 3: Objektive

2.2.2 Operationszubehör

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Zoom-Stereomikroskop SMZ-171	Motic	Barcelona, Spanien
Temperature Controller	RWD Life Science Co.	Shenzhen, China
Portable Stereotaxic Instrument for Mouse	RWD Life Science Co.	Shenzhen, China
Schego Pumpe Optimal	Schego Schemel & Goetz GmbH & Co KG	Offenbach, Deutschland
Zahnarztbohrer	NSK Europe GmbH	Eschborn, Deutschland
Digital Thermostat Thermo 2	BioGreen	Bischoffen, Deutschland

Tabelle 4: Operationsgeräte

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Brain Infusion Kit 3	Alzet Osmotic Pumps	Cupertino, USA
Microosmotic Pump Model 1002	Alzet Osmotic Pumps	Cupertino, USA
3mm Coverslip glasses	Warner Instruments	Holliston, USA
Gelfoam 12-7 mm	Pfizer	New York City, USA
Histoacryl	Braun Surgical	Melsungen, Deutschland
Paladur powder	Kulzer GmbH	Wasserburg, Deutschland
Super- Bond C&B Kit	Sun Medical	Moriyama-shi, Japan
Syringe Needles	Warner Instruments	Holliston, USA
Sugi Saugtupfer	Questalpha GmbH & Co. KG	Eschenburg, Deutschland
Ethilon Polyamid 6 Monofilament	Ethicon LLC	Bridgewater, Vereinigte Staaten

Tabelle 5: Operationszubehör

2.2.3 Arzneistoffe

Arzneimittel	Wirkstoff	Konzentration	Hersteller	Ort
Xylocain Gel 2%	Lidocain	2mg/g	AstraZeneca GmbH	London, Großbritannien
Bepanthen	Dexpanthenol	50 mg/g	Bayer	Leverkusen, Deutschland
Paracetamol Lösung	Paracetamol	40 mg/ml	Ratiopharm GmbH	Ulm, Deutschland
Meloxidyl	Meloxicam	Oral: 1,5 mg/ml Intraperitoneal: 5 mg/ml	Ceva Tiergesundheit GmbH	Düsseldorf, Deutschland
Fentadon	Fentanyl	50 µg/ml	Dechra	Aulendorf, Deutschland
Dormicum	Midazolam	5 mg/ml	Roche	Basel, Schweiz
Dormilan	Medetomidin	1 mg/ml	Alfavet Tierarzneimittel GmbH	Neumünster, Deutschland
Naloxonratiopharm	Naloxon	0,4 mg/ml	Ratiopharm GmbH	Ulm, Deutschland
Flumazenil-hameln	Flumazenil	0,1 mg/ml	Hameln Pharma GmbH	Hameln, Deutschland
Atipamezol	Atipamezol	5 mg/ml	Providet Pharmaceuticals	Athen, Griechenland
WDT Ketamin	Ketamin	100 mg/ml	WDT	Garbsen, Deutschland
WDT Xylazin	Xylazin	20 mg/ml	WDT	Garbsen, Deutschland

Tabelle 6: Verwendete Arzneimittel

2.2.4 Antikörper

Antigen	Spezies	ID	Hersteller	Ort
Anti-Iba-1-Anti-körper	rabbit anti-mouse	#019-19741	Wako	Neuss, Deutschland
Anti-vGAT- Anti-körper	guinea pig anti-mouse	SySy #131 308	Synaptic Systems GmbH	Göttingen, Deutschland
Anti-vGlut1- Anti-körper	chicken anti-mouse	SySy #135 316,	Synaptic Systems GmbH	Göttingen, Deutschland
Anti-CD68 Anti-körper	rat anti-mouse	ab53444	Abcam Ltd	Cambridge, Großbritannien

Tabelle 7: Primäre Antikörper

Konjugat	Spezies	ID	Hersteller	Ort
Fluorophor Alexa633nm	goat anti-human	A 21091	ThermoFisher	Waltham, USA
Fluorophor Alexa647nm	goat anti-rabbit	A232733	ThermoFisher	Waltham, USA
Fluorophor Alexa405nm	donkey anti-rabbit	ab175651	Abcam Ltd	Cambridge, Großbritannien
Fluorophor AlexaCy3A	donkey anti-guinea pig	#706165148	Jackson ImmunoResearch	Ely, Großbritannien
Fluorophor Alexa647nm,	donkey anti-chicken	#703605155	Jackson ImmunoResearch	Ely, Großbritannien
Fluorophor Alexa 594nm	donkey anti-rat	A2120	ThermoFisher	Waltham, USA

Tabelle 8: Sekundäre Antikörper

2.2.5 Programme

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Adobe Illustrator CS6	Adobe Systems	San José, USA
Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems	San José, USA
GraphPad Prism 7	Graphpad Software	San Diego, USA
Image J	Wayne Rasband, National Institutes of Health	Bethesda, USA
MatLab R2018b	MathWorks	Massachusetts, USA
Microsoft Excel	Microsoft	Redmond, USA
LAS X	Leica Microsystems	Wetzlar, Deutschland
Huygens Essential	Scientific Volume Imaging	Hilversum, Niederlande
SciScan	Scientifica	Uckfield, Großbritannien

FlyCapture 2	Point Grey	Richmond, Kanada
Imaris	Oxford Industries	Abingdon, Vereinigtes Königreich
Neuronstudio	Mount Sinai School of Medicine	New York City, USA

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Programme.

3 Ergebnisse

3.1 Mausmodell der NMDAR AE

Um ein Mausmodell der NMDAR AE zu erstellen, wurden von isolierten Plasmazellen der NMDAR AE PatientInnen generierte rekombinante monoklonale Antikörper gegen die GluN1 (NR1) Untereinheit des NMDAR verwendet (Kreye et al. 2016; Planaguma et al. 2015). Dieser oder ein Kontrollantikörper wurden durch miniosmotische Pumpen über einen Zeitraum von 14 Tagen in das Ventrikelsystem infundiert. In den folgenden Tagen diffundieren weiterhin Antikörper aus dem Ventrikelsystem in das Hirngewebe. Nach Erreichen der maximalen Antikörperbindung an Tag 18 wurden die Mäuse perfundiert und die Gehirne geschnitten. Die Verifizierung der Antikörperbindung erfolgte mittels einer immunhistochemischen Färbung gegen humane IgG Antikörper. Nach erfolgreicher Infusion mit NMDAR AK zeigte sich ein typisches Bindungsmuster, welches bei Kontrolltieren fehlte (Planaguma et al. 2015). Nachdem die stärkste Antikörperbindung im Hippokampus zu finden ist, fokussierte sich diese Studie auf die Untersuchung von Veränderungen im Hippokampus.

3.2 Zunahme der Dornendichte und Dichte der stummelförmigen Dornen auf SST-Interneuronen nach NMDAR AK Infusion

In dieser Arbeit wurde die strukturelle Plastizität von SST-Interneurone in den CA1 und CA2 Regionen des Hippokampus untersucht. Als erster Schritt wurde die Dichte und Morphologie dendritischer Dornen *ex vivo* an fixierten Hirnschnitten beurteilt (Abb.11a-j). Es zeigte sich eine hohe Variabilität der Dornendichte. Nachdem sich die meisten dendritischen Dornen an peripheren Dendritenabschnitten der Zellen befinden, beschränkte sich diese Arbeit auf die Analyse der > 100µm bis maximal 320µm vom Soma entfernten dendritischen Äste (Durchschnittsentfernung der dendritischen Abschnitte 137µm in der Kontroll- und 130 µm in der NMDAR AK Gruppe).

Die Analyse der Dornenstruktur ergibt eine signifikante Abnahme des Durchmessers der Dornenköpfe (Abb.11k) und eine signifikante Abnahme der Dornenlänge (Abb.11l) in der NMDAR AK Gruppe. Die Analyse der Gesamtdornendichte zeigt einen signifikanten Anstieg der Dichte in der NMDAR AE Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb.11m). Dabei liegt die mittlere Dornendichte bei 0,3 Dornen/µm in der Kontroll- und 0,35 Dornen/µm in der NMDAR AE Gruppe. Bei der Untersuchung der verschiedenen morphologischen Dornengruppen fällt eine signifikante Zunahme der stummelförmigen Dornen in der NMDAR AE Gruppe (Abb.11n) auf. Die dünnen und pilzförmigen Dornen zeigen keine signifikante Veränderung in ihrer Dichte (Abb. 11o, p). Diese Ergebnisse zeigen, dass NMDAR AK zu einer Steigerung der Dichte dendritischer Dornen auf SST-Interneuronen führt, welche vor allem auf eine Zunahme von stummelförmigen Dornen zurückzuführen ist.

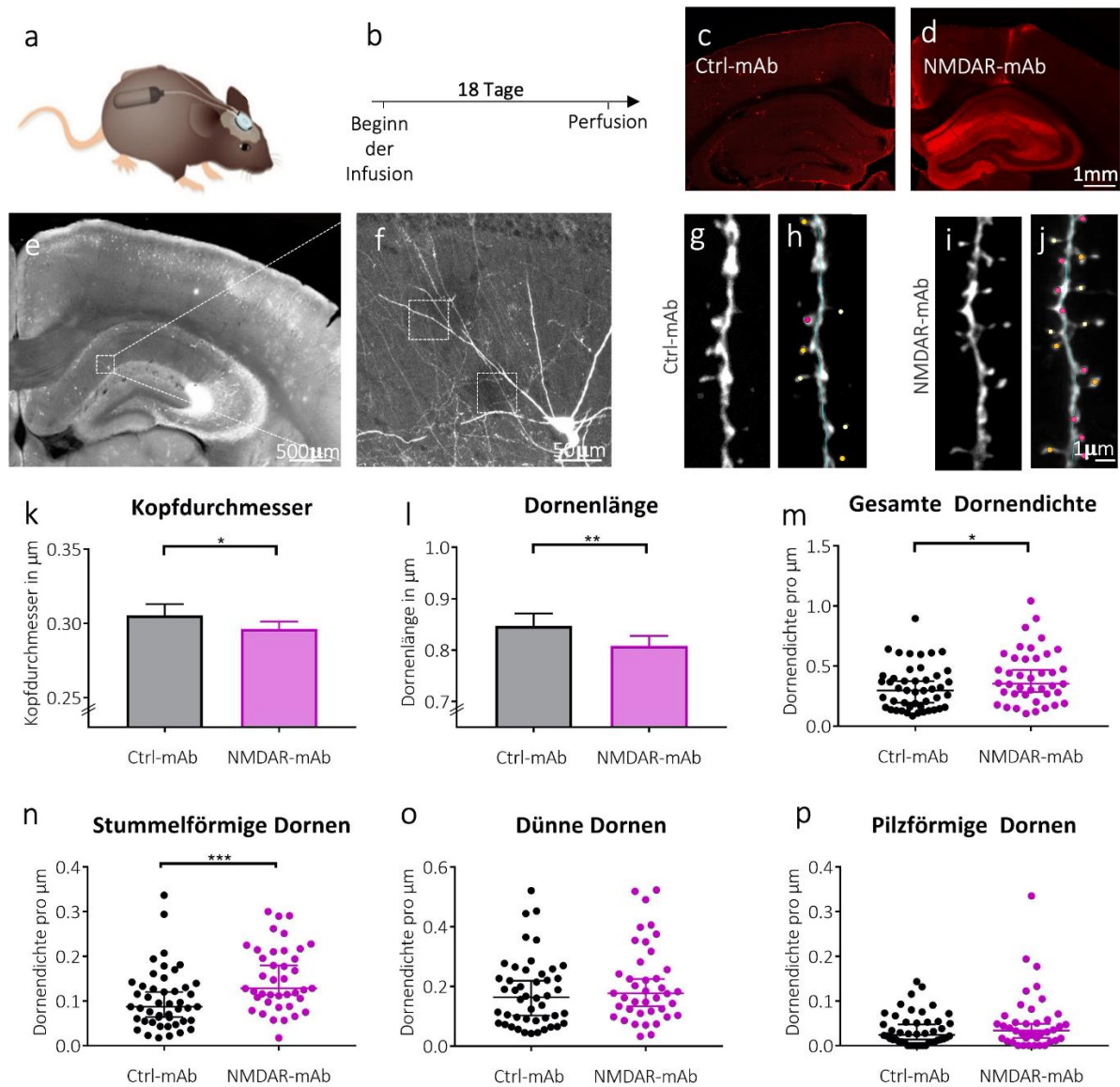


Abbildung 11: Zunahme der Dornendichte und der Dichte der stummelförmigen Dornen auf Somatostatin-positiven inhibitorischen Interneuronen in den CA1 und CA2 Regionen des Hippokampus im Mausmodell der NMDAR Autoimmunenenzephalitis. a) Schematische Darstellung des Mausmodells mit miniosmotischen Pumpen. b) Versuchsaufbau mit intraventrikulärer Antikörperinfusion über 18 Tage. c) Immunhistochemische Färbung gegen humanes IgG der Kontroll- und d) NMDAR-mAb Gruppe. e) Übersichtsaufnahme des Hippokampus. f) Inhibitorisches Interneuron mit dendritischen Ästen (gestrichelte Quadrate). g) Hochauflösende Aufnahme eines Dendriten und h) Analyse mittels Neuronstudio nach Infusion mit Kontroll- bzw. i-j) NMDAR-mAb (stummelförmige Dornen in rot, dünne Dornen in gelb und pilzförmige Dornen in orange). k) Vergleich des Kopfdurchmessers in µm ($p = 0,0153$). l) Vergleich der Dornenlänge in µm ($p = 0,0005$). m) Dichte der gesamten Dornen ($p = 0,0446$). n) Dichte der stummelförmigen Dornen ($p = 0,0009$). o) Dichte der dünnen Dornen. p) Dichte der pilzförmigen Dornen. Darstellung der Daten als Median mit 95% Konfidenzintervall, $n_{\text{(Kontrolle)}} = 1.305$ in 46 Dendriten von 7 Tieren, Dornen $n_{\text{(NMDAR)}} = 1.422$ Dornen in 40 Dendriten von 6 Tieren, alle Vergleiche Mann-Whitney Tests, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.3 Unveränderte Dornendichte und Dynamik dendritischer Dornen SST-exprimierender Interneurone *in vivo*

Um den zeitlichen Verlauf und die Dynamik der dendritischen Dornen besser beurteilen zu können erfolgte eine *in vivo* Studie mittels hippokampaler Zwei-Photonen Mikroskopie der CA1 Region des Hippokampus (Abb. 12a,b). Hierfür wurden wie für die *ex vivo* Analysen (3.2) eine GFP in inhibitorischen (SST-)Interneuronen exprimierende Reportermauslinie verwendet.

In einer ersten Operation erfolgte die Implantation eines hippokampalen Fensters und zunächst blind verschlossener Katheter. Dies ermöglichte die Anfertigung von zwei Baseline-Aufnahmen, bevor die subkutanen Pumpen angeschlossen wurden. An Tag 5, 7, 16 und 18 nach Beginn der Antikörperinfusion wurden weitere Aufnahmen der Dendritenabschnitte angefertigt. Dabei wurden analog zu den der *ex vivo* Studie dendritischer Dornen von SST-positiven Interneuronen dendritische Abschnitte mit einem Abstand vom Soma von ungefähr 100 bis 300 μm gewählt (Durchschnittsentfernung der Astabschnitte 176 μm in der Kontroll- und 163 μm in der NMDAR AE Gruppe). Die Dornendichte an Tag 18 der Infusion ist mit einer mittleren Dornendichte von 0,6 Dornen/ μm in der Kontrollgruppe und 0,56 Dornen/ μm in der NMDAR AE Gruppe insgesamt etwas höher als nach 18 Tagen intraventrikulärer AK Infusion in der *ex vivo* Studie. Die Analyse der Dornendichte der *in vivo* Studie zeigt jedoch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikante Veränderungen zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 12c, d). Zur Untersuchung der Stabilität existierender Dornen, bestimmte ich die Dornenüberlebensrate (Abb. 12e). Im Schnitt beträgt die Überlebensrate bis zu Tag 18 0,65 (NMDAR-mAb) bzw. 0,63 (Ctrl-mAb), es ist jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festzustellen. Bereits existierende dendritische Dornen SST-positiver Interneurone scheinen also nicht betroffen zu sein. Inwiefern ein Dornenumbau besteht, kann durch die Dornenumsatzrate untersucht werden. Diese setzt sich aus neugebildeten und verlorenen Dornen zusammen. Die Rate an neugebildeten Dornen variiert zwischen im Schnitt 0,07 bis 0,18 neugebildeter Dornen, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen feststellbar ist (Abb. 12f). Die mittlere Rate an verlorenen Dornen variiert ebenfalls zwischen 0,08 und 0,18 (Abb. 12g). Auch hier ist kein signifikanter Unterschied nach Kontroll- oder NMDAR AK Infusion nachweisbar. Die Dornenumsatzrate bewegt sich zwischen mittleren Werten von 0,08 bis maximal 0,17 und ist zwischen den beiden Versuchsgruppen nicht signifikant verändert (Abb. 12h). Ihr Maximum liegt in beiden Gruppen mit einem Mittelwert von 0,17 (NMDAR-mAb) bzw. 0,16 (Ctrl-mAb) am 16. Tag nach Pumpenimplantation. Dieser Mikroskopiezeitpunkt umspannt mit 9 Tagen zur letzten Untersuchung an Tag 9 auch die längste Zeitspanne. In *in vivo* Zwei-Photonen mikroskopischen Untersuchungen sehen wir somit keinen Unterschied im Vergleich zwischen den mit Kontroll- bzw. NMDAR AK infundierten Versuchsgruppen.

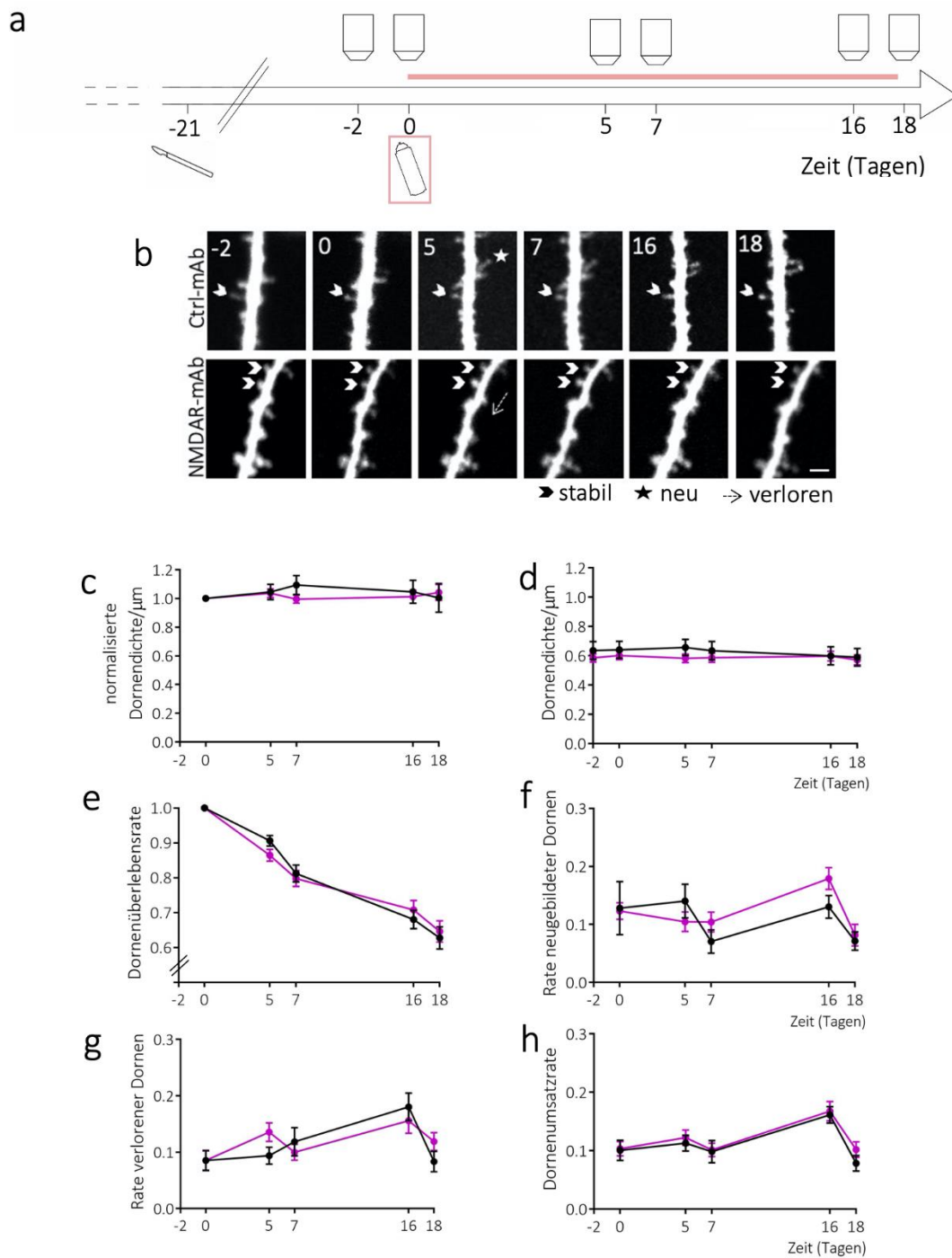


Abbildung 12: Unveränderte Dichte und Dynamik dendritischer Dornen Somatostatin-exprimierender Interneurone in vivo. a) Versuchsaufbau mit Implantation eines hippocampalen Fensters (Skalpelli), Pumpenimplantation (Pumpe), Zwei-Photonen Mikroskopie (Objektiv) und Antikörperinfusion (Dauer als rote Linie). b) Repräsentative Beispiele von Dendriten und dendritischen Dornen Somatostatin-exprimierender Interneurone mit stabilen (Pfeilspitze), neuen (Stern) und abgebauten (gestrichelter Pfeil) dendritischen Dornen. Maßstab 1µm. c) Normalisierte Dornendichte pro μm ($p_{\text{Interaktion}}=0,59$, $F_{\text{Interaktion}(5,160)}=0,75$; $p_{\text{Gruppeneffekt}}=0,83$, $F_{\text{Gruppeneffekt}(1,32)}=0,05$). d) Absolute Dornendichte pro μm ($p_{\text{Interaktion}}=0,15$, $F_{\text{Interaktion}(5,215)}=1,65$; $p_{\text{Gruppeneffekt}}=0,51$, $F_{\text{Gruppeneffekt}(1,43)}=0,44$). e) Dornenüberlebensrate ($p_{\text{Interaktion}}=0,21$, $F_{\text{Interaktion}(4,172)}=1,48$; $p_{\text{Gruppeneffekt}}=0,94$, $F_{\text{Gruppeneffekt}(1,43)}=0,01$). f) Rate neugebildeter Dornen ($p_{\text{Interaktion}}=0,21$, $F_{\text{Interaktion}(4,172)}=1,48$; $p_{\text{Gruppeneffekt}}=0,6$, $F_{\text{Gruppeneffekt}(1,43)}=0,28$). g) Rate verlorener Dornen ($p=0,20$, $F_{\text{Interaktion}(4,172)}=1,51$; $p_{\text{Gruppeneffekt}}=0,68$, $F_{\text{Gruppeneffekt}(1,43)}=0,18$). h) Dornenumsatzrate ($p_{\text{Interaktion}}=0,9$, $F_{\text{Interaktion}(4,215)}=0,27$; $p_{\text{Gruppeneffekt}}=0,56$, $F_{\text{Gruppeneffekt}(1,43)}=0,36$). Darstellung der Daten als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts. n= 17 Dendriten (5 Tiere) Kontrollgruppe; n=28 Dendriten (5 Tiere) NMDAR-Gruppe. Alle Vergleiche mittels RM Two way ANOVA ermittelt.

3.4 Aktivierung von Mikrogliazellen im Mausmodell der NMDAR AE

Die pathophysiologischen Prozesse der NMDAR AE führen nicht nur zu einer verminderten NMDAR Funktion, sondern bedingen auch inflammatorische Prozesse im Gehirn. Dieser Zusammenhang wurde durch immunhistochemische Färbungen der Mikrogliazellen mit dem Marker Iba-1 in *ex vivo* fixierten Hirnschnitten untersucht (Abb. 13a, b). Hierfür wurden die Zirkularität und Sphärizität der Zellen, welche als zwei- bzw. dreidimensionales Maß für die Kompaktheit der Zelle dienen, bestimmt. Sowohl die Sphärizität (Abb. 13c) als auch die Zirkularität (Abb. 13d) sind in der NMDAR AE Gruppe signifikant erhöht, was auf einen Übergang in die amöboide Form hinweist. Ebenso lassen die signifikant kürzere Länge der Hauptäste (Abb. 13e) reduzierte Anzahl der Dendriten (Abb. 13f) und die reduzierte Anzahl der Dendritenabschnitte pro Hauptast (Abb. 13g) auf eine verminderte Ramifizierung und Komplexität der Mikroglia schließen. Auch die Anzahl der gesamten Verzweigungspunkte (Abb. 13h) und die Verflechtung der Verzweigungspunkte (Abb. 13i) sind signifikant vermindert. Insgesamt weisen diese morphologischen Veränderungen auf eine starke Aktivierung von Mikrogliazellen nach intraventrikulärer Infusion von NMDAR AK hin.

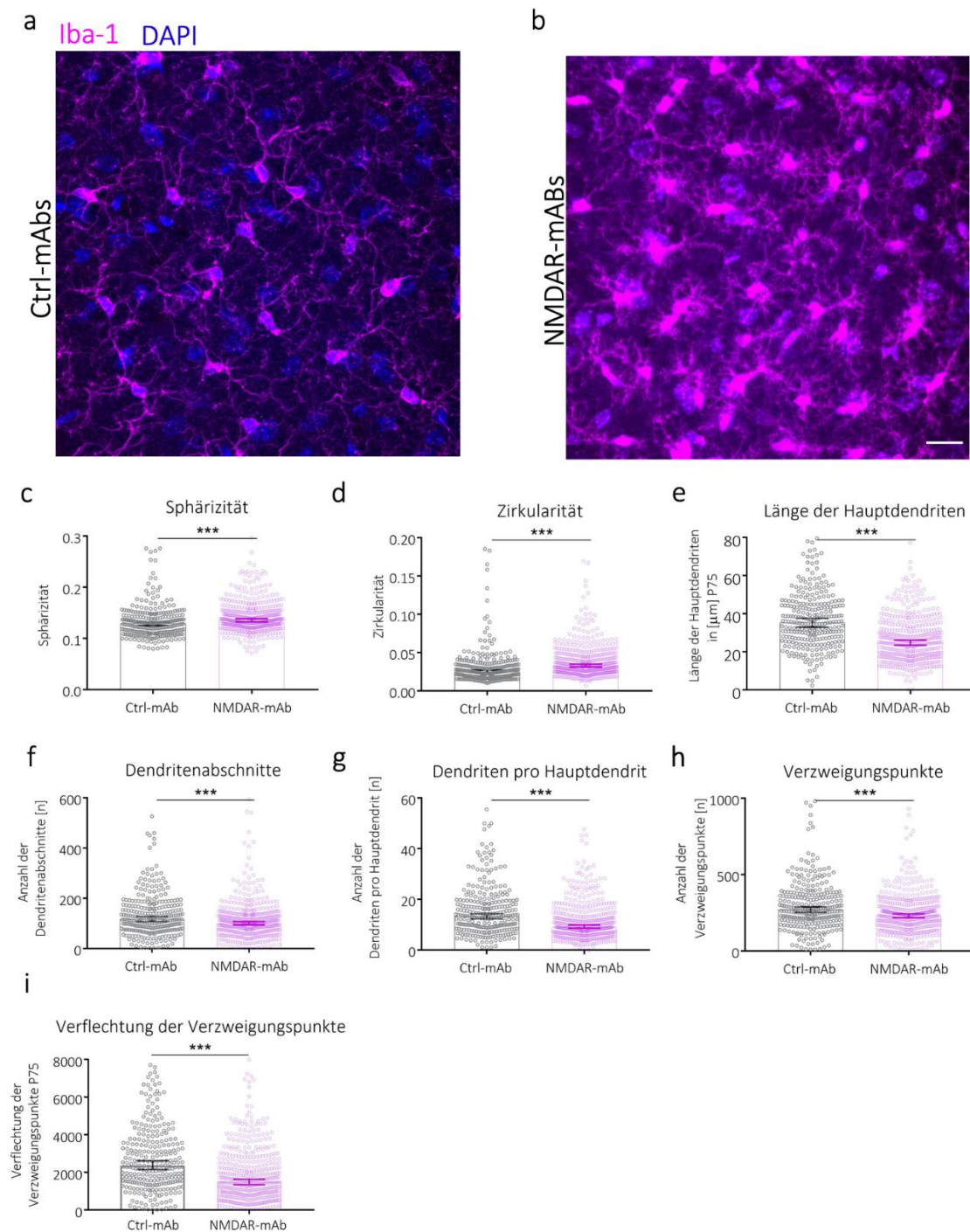


Abbildung 13: Mikrogliaaktivierung im Mausmodell der NMDAR Autoimmunenkephalitis. a) Projektion einer konfokalen Aufnahme mit Mikrogliazellen nach Infusion des Kontrollantikörpers oder b) NMDAR-Antikörpers nach immunhistochemischer Färbung (Iba-1 (magenta), DAPI (blau)). c) Sphärizität ($p < 0,0001$). d) Zirkularität ($p < 0,0001$). e) Länge der Hauptdendriten, 75te Perzentile ($p < 0,0001$). f) Dendritenabschnitte ($p = 0,0004$). g) Anzahl der Dendriten pro Hauptdendrit ($p < 0,0001$). h) Anzahl der Verzweigungspunkte ($p < 0,0001$). i) Verflechtung der Verzweigungspunkte, 75te Perzentile ($p < 0,0001$). Die Daten werden als Median mit 95% Konfidenzintervall dargestellt. $n_{\text{(Kontrolle)}} = 280$ Mikroglia (23 Aufnahmen von 4 Tieren), $n_{\text{(NMDAR)}} = 452$ (40 Aufnahmen von 5 Tieren). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $< 0,001$. Maßstab $20 \mu\text{m}$.

3.5 Abnahme der Internalisierung exzitatorischer präsynaptischer Fragmente durch Mikrogliazellen nach NMDAR AK Exposition

Als nächster Schritt sollten die Auswirkungen dieser Aktivierung von Mikroglia auf die pathophysiologischen Prozesse der NMDAR AE untersucht werden. Inwiefern es nach wie in 3.1 beschriebener intraventrikulärer Antikörperinfusion über 18 Tage zu einer Phagozytose präsynaptischen Materials durch Mikroglia kommt, untersuchten wir ebenfalls durch immunhistochemische Ansätze (Abb. 14a-f). Im Modell der NMDAR AE zeigt sich eine signifikante Reduktion der vGLUT1 positiven Sphären in Mikroglia im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 14g), was auf eine reduzierte Aufnahme exzitatorischer präsynaptischer Elemente hinweist. Die vGlut1 Sphären in CD68 Strukturen pro Mikroglia Volumen weisen diese Veränderung nicht auf (Abb. 14h).

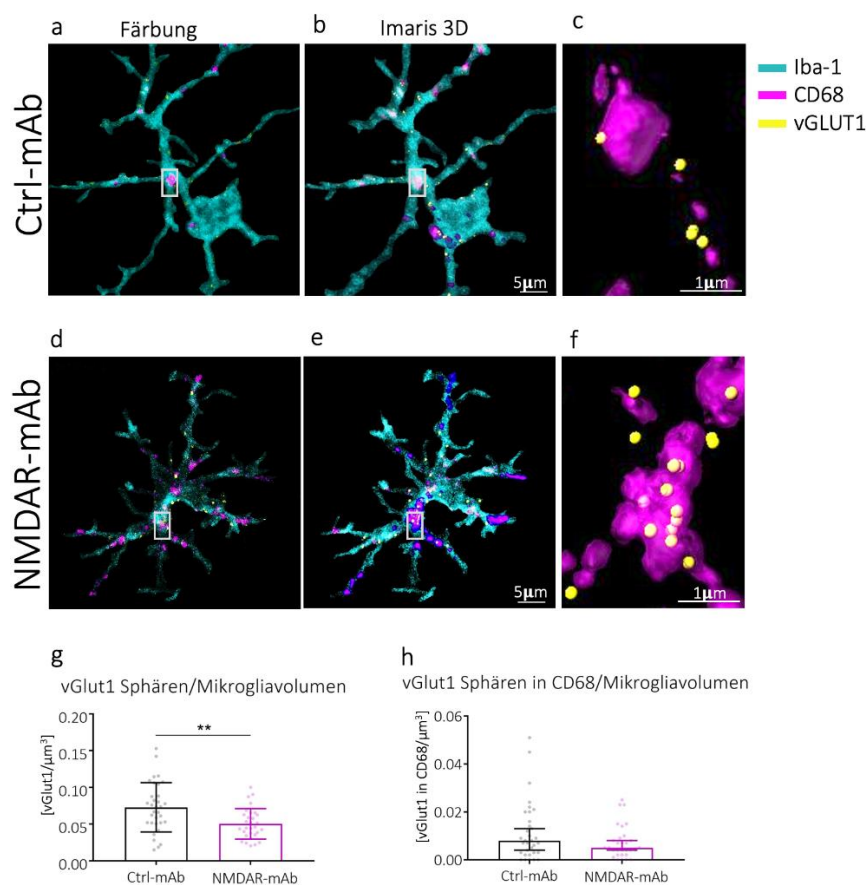


Abbildung 14: Abnahme der Internalisierung präsynaptischer exzitatorischer Fragmente durch Mikrogliazellen. a) Immunhistochemische Färbung mit Iba-1 (Cyan), CD68 (magenta), vGLUT1 (gelb) nach Kontrollantikörperinfusion. b) Oberflächenmodellierung der internalisierten CD68 positiven Zusammenschlüsse (Lysosomen) und vGLUT1 Fragmente nach Kontrollantikörperinfusion im Programm Imaris. c) Vergrößerter Bildausschnitt mit CD68 und vGLUT1 Sphären nach Kontrollantikörperinfusion. d) Immunhistochemische Färbung nach NMDAR-Antikörperinfusion (siehe a). e) Oberflächenmodellierung der internalisierten CD68 Zusammenschlüsse und vGLUT1 Fragmente nach NMDAR – Antikörperinfusion. f) Vergrößerter Bildausschnitt mit CD68 und vGLUT1 Sphären nach NMDAR-Antikörperinfusion. g) vGlut1 Punkte pro Mikroglia Volumen (Mittelwert mit Standardabweichung, $p=0,002$). h) vGlut1 Punkte in CD68 Strukturen pro Mikroglia Volumen (Median +/- 95% Konfidenzintervall). $n_{(vGlut1-Kontrolle)}=33$ Mikroglia (14 Regionen aus 7 Tieren), $n_{(vGlut1-NMDAR)}=30$ Mikroglia (12 Regionen aus 6 Tieren). ** $p<0,01$

Analog dazu wurden diese Untersuchung auch mit Markierung des präsynaptischen inhibitorischen Transportproteins vGAT angefertigt (Abb. 15a-f). Hier zeigt sich jedoch kein signifikanter Effekt auf die Anzahl vGAT positiver Punkte in Mikroglia (Abb. 15g) oder auch auf vGAT in CD68 Lysosomen in Mikroglia (Abb. 15h). Dies weist darauf hin, dass die durch NMDAR AK hervorgerufene Aktivierung nicht zu einer veränderten Trogozytose inhibitorischer präsynaptischer Fragmente führt.

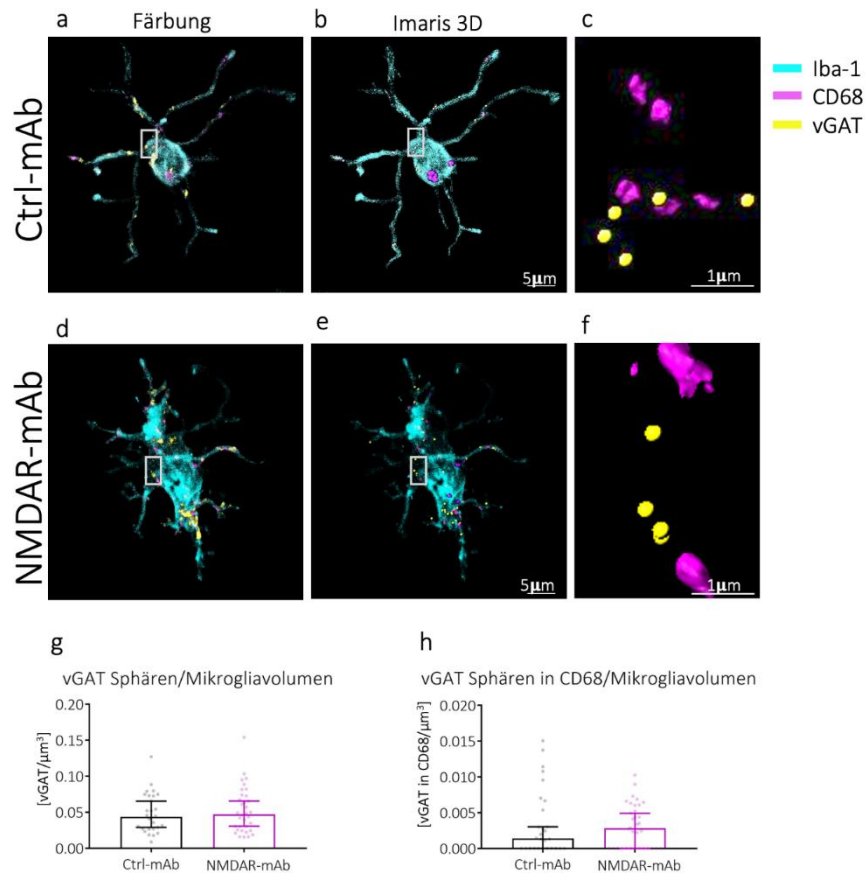


Abbildung 15: Unveränderte Trogozytose inhibitorischer präsynaptischer Fragmente durch Mikroglia.

a) Immunhistochemische Färbung mit Iba-1 (Cyan), CD68 (magenta), vGAT (gelb) nach Kontrollantikörperinfusion. b) Oberflächenmodellierung der internalisierten CD68 Zusammenschlüsse und vGAT Fragmente nach Kontrollantikörperinfusion im Programm Imaris. c) Vergrößerter Bildausschnitt mit CD68 und vGAT Sphären nach Kontrollantikörperinfusion. d) Immunhistochemische Färbung nach NMDAR-mAb-Infusion (siehe a). e) Oberflächenmodellierung der internalisierten CD68 Zusammenschlüsse und vGAT Fragmente nach NMDAR-mAb-Infusion. f) Vergrößerter Bildausschnitt mit CD68 und vGAT Sphären nach NMDAR-mAb-Infusion. g) vGAT positive Punkte pro Mikroglivolumen. h) vGAT positive Punkte in CD68 Strukturen pro Mikroglivolumen. $n_{\text{vGAT-Kontrolle}} = 28$ Mikroglia (14 Regionen aus 7 Tieren), $n_{\text{vGAT-NMDAR}} = 34$ Mikroglia (12 Regionen aus 6 Tieren). Daten entsprechen Median $\pm$ 95% Konfidenzintervall.

4 Diskussion

In dieser Arbeit untersuchte ich den Einfluss von GluN1 Autoantikörpern auf die strukturelle Plastizität SST-positiver Interneurone im Hippokampus in einem Mausmodell der NMDAR AE *ex vivo* mittels konfokaler Mikroskopie und *in vivo* durch eine chronische Zwei-Photonen mikroskopische Studie. Die wesentlichen Ergebnisse sind erstens eine Zunahme der gesamten Dornendichte, insbesondere der Dichte der stummelförmigen Dornen, sowie zweitens eine Abnahme der Dornenlänge und der Größe des Dornenkopfes nach intraventrikulärer NMDAR AK Infusion. In der *in vivo* Studie ließen sich keine Veränderungen der Dornendichte oder des Dornenumsatzes nachweisen. Des Weiteren untersuchte ich die Mikrogliamorphologie und die Phagozytose präsynaptischer Fragmente durch Mikroglia im Mausmodell der NMDAR AE. Die zentralen Erkenntnisse dieser Untersuchungen sind erstens, dass es zu starken morphologischen Veränderungen der Mikrogliazellen im Sinne einer Mikrogliaaktivierung nach NMDAR AK Infusion kommt. Zweitens kommt es zu einer reduzierten Internalisierung exzitatorischer präsynaptischer Fragmente und drittens tritt keine vermehrte Trogozytose inhibitorischer präsynaptischer Fragmente durch Mikroglia im Mausmodell der NMDAR AE auf.

4.1 Zunahme der Dornendichte und der Dichte der stummelförmigen Dornen auf SST-Interneuronen nach NMDAR AK Exposition

Die strukturelle *ex vivo* Analyse der dendritischen Dornen inhibitorischer SST-exprimierender Interneurone zeigt eine Zunahme der gesamten Dornendichte nach NMDAR AK Infusion. Bei der Untersuchung der verschiedenen morphologischen Dornengruppen fällt eine hochsignifikante Zunahme der Dichte der stummelförmigen Dornen in der NMDAR AK Gruppe auf, während die dünnen und pilzförmigen Dornen keine signifikanten Veränderungen zeigen. Insgesamt zeigen sich signifikant kürzere Dornen mit kleineren Dornenköpfchen in der NMDAR AK Gruppe.

Wir sehen eine Zunahme der Dornendichte auf SST-Interneuronen nach intraventrikulärer Infusion von NMDAR AK. In unserer Studie zeigen sich außerdem kürzere Dornen mit kleineren Dornenköpfchen. Die Größe des Dornenkopfes steht zumindest bei PC in positiven Zusammenhang mit der Dichte und Komplexität der 'postsynaptic density (PSD)'- der Dichte postsynaptischer Strukturen (Arellano et al. 2007), welche unter anderem mehr AMPAR beherbergt, die eine stärkere synaptische Verbindung ermöglichen (Bourne and Harris 2007; Ganeshina et al. 2004). Dementsprechend wären bei kürzeren Dornen mit kürzeren Dornenköpfchen schwächere Synapsen zu erwarten. Weiterhin zeigen wir eine signifikante Dichtezunahme der stummelförmigen Dornen. Grundsätzlich geht man davon aus, dass die größeren und stabileren pilzförmigen Dornen eher als „Gedächtnis Dornen“ anzusehen sind, während die langen, dynamischen, dünnen Dornen für Lernprozesse wichtig sind (Chidambaram et al. 2019; Trachtenberg et al. 2002). Stummelförmige Dornen verschwinden in vielen Hirnregionen im Laufe der Entwicklung und werden

deshalb häufig als unreife Strukturen betrachtet (Berry and Nedivi 2017; Harris et al. 1992; Helm et al. 2021). Das Proteom stummelförmiger Dornen weist ebenfalls auf schwächere synaptische Verbindungen hin (Helm et al. 2021). Eine Dichtezunahme stummelförmiger Dornen im erwachsenen Gehirn ist beispielsweise nach Blockade der synaptischen Transmission beschrieben (Petrak et al. 2005). Ebenso möglich wäre, dass es bei NMDAR AE zu einer Umstrukturierung neuronaler Netzwerke ähnlich wie während der Gehirnentwicklung kommt, wo ebenfalls mehr stummelförmige Dornen anzutreffen sind (Harris et al. 1992). Insgesamt sehen wir nach intraventrikulärer NMDAR AK Infusion also am ehesten eine Zunahme unreifer dendritischer Dornen mit schwächeren Synapsen. Diese Zunahme könnte als homöostatischer Mechanismus auf eine veränderte Netzwerkaktivität erfolgen oder auch kompensatorisch aufgrund einer kompromitierten Signalaufnahme von SST-Interneuronen, nachdem die glutamaterge Signalaufnahme durch NMDAR Abs eingeschränkt sein könnte.

Aktuell gibt es nur sehr wenige Studien, die die Veränderungen der dendritischen Dornen im Rahmen der NMDAR AE untersuchen. Bisherige Arbeiten untersuchen vor allen die strukturelle Plastizität von PC (Ceanga et al. 2023; Garcia-Serra et al. 2021). Die Folgen einer Hypofunktion des NMDAR können auch durch eine pharmakologische Blockade des Rezeptors untersucht werden, wobei es auch hier nur wenige Daten zu Veränderungen inhibitorischer Interneurone gibt. Perez-Rando et al. zeigten 2017, dass strukturelle Veränderungen hippocampaler SST-exprimierender Neurone NMDAR abhängig sind (Perez-Rando et al. 2017a; Perez-Rando et al. 2017b). 24 Stunden nach Gabe eines NMDAR Agonisten (NMDA) kommt es zu einer erhöhten Dornendichte und einer erhöhten Erscheinungsrate dendritischer Dornen (Perez-Rando et al. 2017a). Nach Gabe des NMDAR Antagonisten MK 801 kommt es zu dem gegenteiligen Effekt, also einer verminderten Dornendichte und einer verminderten Erscheinungsrate dendritischer Dornen. Bei *in vivo* Injektion des Antagonisten zeigten sich zwar Verhaltensauffälligkeiten, jedoch keine Veränderung der Dornendichte (Perez-Rando et al. 2017b). Perez-Rando et al. zeigen daher nach pharmakologischer NMDAR Blockade im Vergleich zu unserer NMDAR AK Infusion einen gegenteiligen Effekt auf die Dornendichte. Dies könnte auf unterschiedliche Auswirkungen bei einmaliger und chronischer Applikation zurückzuführen sein, da diese Dornendichteveränderungen nach pharmakologischer NMDAR Blockade bei chronischer *in vivo* Applikation nicht nachweisbar waren (Perez-Rando et al. 2017b). So ist beispielsweise im Mausmodell nach chronischer NMDAR Blockade durch intraperitoneale Injektionen von MK 801 über 14 Tage im Hippokampus eine Netzwerkhyperaktivität beschrieben. In den ersten Versuchstagen kam es zu einer Zunahme des exzitatorischen Proteins vGlut1, welche sich im Verlauf wieder normalisierte und von einer Abnahme des inhibitorischen Proteins vGAT abgelöst wurde. Die Autoren postulierten, dass es sich hierbei um einen initialen hyperaktiven Zustand durch eine Disinhibition der Pyramidenzellen handeln könnte, nachdem NMDAR auf Interneuronen sensitiver auf eine Blockade reagieren als auf PC (Grunze et al. 1996; Ma et al. 2020). Verschiedene Auswirkungen auf inhibitorische Schaltkreise im Verlauf der Erkrankung sind auch im Falle der NMDAR AE

denkbar und könnten die komplexen klinischen Manifestationen und vielschichtigen strukturellen Veränderungen SST Interneurone erklären.

SST-exprimierende Interneurone sorgen für eine Feedback-Inhibition im Gehirn (Chamberland et al. 2024). Sie steuern hierdurch die Funktion der nachgeschalteten PC: Sie regulieren die Integration ankommender synaptischer Signale von PC, beeinflussen die Input-Output Transformation und kontrollieren die Aktionspotentialraten der hippocampalen PC (Lovett-Barron et al. 2012; Pelkey et al. 2017; Royer et al. 2012). Eine verminderte Funktion SST-exprimierender Interneurone kann zu Lern- und Gedächtnisdefiziten führen und wird in verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen wie der Schizophrenie, bipolaren Störungen, Depression, der Alzheimer- und Parkinsonerkrankung beobachtet (Hashimoto et al. 2008; Lin and Sibille 2013; Lyu et al. 2023; Nagarajan et al. 2024). Viele der klinischen Manifestationen dieser Erkrankungen (z.B. Psychosen, Wahn, kognitive Defizite) treten auch in der NMDAR AE auf (Dalmau et al. 2008; Lyketsos et al. 2011; McCutcheon et al. 2020; Smarr and Keefer 2020). Bei der Alzheimer Erkrankung und der Schizophrenie kommt es außerdem zu einer NMDAR Hypofunktion, weshalb ein enger Zusammenhang der Hypofunktion des NMDAR und einer Beeinträchtigung der Inhibition diskutiert wird (Coyle et al. 2003; Grunze et al. 1996; Homayoun and Moghaddam 2007; Lane et al. 2023; Liu et al. 2019).

Interessanterweise scheinen SST-Interneurone in verschiedenen Erkrankungen auch kompensatorische Mechanismen zur Aufrechterhaltung des inhibitorisch-exzitatorischen Gleichgewichts bei einer Überaktivität oder Hyperexzitabilität des Netzwerkes aufzuweisen. So steigern SST exprimierende Interneurone im Neokortex beispielsweise ihren funktionellen Output als mögliche Reaktion auf ein inhibitorisches Defizit von PV-Zellen bei mildem Schädel-Hirn-Trauma (Harris et al. 2022). In humanen Autopsien von PatientInnen mit Temporallappenepilepsie konnten vermehrte axonale Aussprossungen SST-exprimierender Interneurone beobachtet werden, welche vermutlich eine ausreichende dendritische Inhibition bei einem übererregbaren Netzwerk gewährleisten sollen (Liu et al. 2014; Mathern et al. 1995). Ebenso konnte in einem Mausmodell der Alzheimererkrankung ein Anstieg der Netzwerkerregbarkeit mit kompensatorisch verstärkter Inhibition und vermehrten axonalen Aussprossungen inhibitorischer SST- Interneurone im Hippokampus beobachtet werden. In diesem Mausmodell kommt es zu verminderten NMDAR Konzentrationen und einer Beeinträchtigung der glutamatergen synaptischen Übertragung bei einer übererregbaren Netzwerksituation (Palop et al. 2007). Auch bei NMDAR AE sind die oberflächlichen NMDAR und die exzitatorischen postsynaptischen Signale reduziert und auch hier sehen wir eine Hyperexzitabilität (Wright et al. 2021), weswegen ein ähnlicher kompensatorischer Gegenregulationsversuch inhibitorischer SST-Zellen bei NMDAR AE möglich wäre. Eine erhöhte Dornendichte auf SST-Interneuronen könnte somit eine verstärkte Signalaufnahme der Netzwerkaktivität ermöglichen. Interessant wäre es somit auch die axonalen Verbindungen der SST-Interneurone zu untersuchen um eine eventuelle Ausbreitung der inhibitorischen Kontakte nachzuweisen.

Für eine optimale neuronale Netzwerkfunktion ist nicht nur die Funktion einzelner Zelltypen wichtig, sondern eine Balance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Strömen unverzichtbar. Die komplexen inhibitorischen Verbindungen haben enormen Einfluss auf die Modulation und Regulierung der hippocampalen Schaltkreise (Zhou and Yu 2018). Die Beeinflussung dieser inhibitorischen Verschaltungen durch NMDAR AK ist kaum untersucht. Wir wissen bisher, dass es in kortikalen Neuronen durch NMDAR AK zu einer Hyperaktivierung kommt (Andrzejak et al. 2022). Interessanterweise scheinen NMDAR AK im Kortex NMDAR abhängige Ströme und synaptische Übertragung inhibitorischer Interneurone zu reduzieren, ohne dabei den gleichen Effekt auf exzitatorische Nervenzellen zu haben. Hierdurch kommt es zu einer Disinhibition der exzitatorischen Neurone (Andrzejak et al. 2022). Auch nach NMDAR Blockade im Präfrontalkortex kommt es zu einer Disinhibition der kortikalen PC (Homayoun and Moghaddam 2007). Hierbei ist zu beachten, dass diese Studien nicht zwischen den verschiedenen Interneuronentypen unterscheiden (Andrzejak et al. 2022; Homayoun and Moghaddam 2007). Nachdem PV-Zellen den größten Anteil der Interneurone im Kortex ausmachen (Lim et al. 2018), handelt es sich bei den untersuchten Neuronen wahrscheinlich auch hauptsächlich um PV-Zellen. Im Hippokampus sehen wir den gegenteiligen Effekt: Es kommt nicht zu einer Hyperaktivierung des Netzwerks, sondern eher zu einer verminderten Frequenz von Aktionspotentialen der PC (Koch et al. 2019), wobei trotzdem eine erhöhte Sensibilität und Übererregbarkeit besteht (Wright et al. 2021).

In hippocampalen exzitatorischen Zellen kommt es zu einer Antikörper-abhängigen Reduktion oberflächlicher NMDAR und einer entsprechenden Reduktion der rezeptorvermittelten Ströme (Andrzejak et al. 2022; Hughes et al. 2010). In *ex vivo* elektrophysiologischen Studien nach Antikörperinfusion zeigten sich die EPSPs in Amplitude, Zerfallszeitkonstante und Ladungsübertragung vermindert und es kommt zu einer reduzierten Frequenz von Aktionspotentialen (Ceanga et al. 2023; Wright et al. 2021). Im Hippokampus konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass es durch die NMDAR AK induzierte verminderte exzitatorische Übertragung zu einer erhöhten Fluktuationssensibilität und einer Hyperexzitabilität des Netzwerks kommt (Wright et al. 2021).

Inwieweit inhibitorische Interneurone im Hippokampus strukturelle und funktionelle Veränderungen unterlaufen, ist nicht abschließend geklärt. In Zellkulturen führt die Gabe von Patientenliquor im Hippokampus zu einer verminderten Dichte inhibitorischer Synapsen auf exzitatorische Nervenzellen (Moscato et al. 2014). In KEGG Proteom Analysen nach Antikörperinfusion zeigten sich reduzierte Level von Gria1, Gria2 und Gabra2 als Zeichen einer verminderten GABA_A Rezeptor Expression (Ceanga et al. 2023). GABA_A Rezeptoren befinden sich vor allem an den Dendriten der PC, werden durch dendritische Interneurone aktiviert und kontrollieren mit ihrer eher langsamen postsynaptischen Inhibition die Integration ankommender Signale und Aktionspotentialbildung (Schulz et al. 2018). Passend dazu zeigen Ceanga et al. in elektrophysiologischen Untersuchungen einen schnelleren Abfall postsynaptischer inhibitorischer Ströme. Die langsame dendritische Inhibition, beispielsweise durch O-LM Zellen, scheint eine entscheidende Rolle in der pathologischen Dysregulation der inhibitorischen Schaltkreise zu spielen. Durch eine Disinhibition durch O-LM Zellen kommt es zu einer Zunahme fehlerhafter y Oszillationen. Die Autoren

postulierten, dass die O-LM abhängige Steigerung der γ -Oszillationen ein kompensatorischer Mechanismus zur Stabilisierung des Netzwerks und Reduktion anderer aberranter Aktivitätsmuster sein könnte (Ceanga et al. 2023). Hier sollte darauf hingewiesen werden, dass SST-exprimierende Interneurone eine sehr heterogene Gruppe sind und O-LM Zellen nur eine ihrer Untergruppen darstellen (Bezaire and Soltesz 2013; Takacs et al. 2024). Es ist möglich, dass es zu verschiedenen Effekten bei unterschiedlichen SST-exprimierenden Interneuronen kommt.

Die von uns festgestellten strukturellen postsynaptischen Veränderungen der SST-Interneurone erweitern die Vermutungen von Ceanga et al. in einigen Aspekten. Obwohl hippocampale PC nach NMDAR AK Exposition eine geringere Aktionspotentialfrequenz und eine verminderte exzitatorische Transmission aufweisen, sind sie übererregbar (Ceanga et al. 2023; Wright et al. 2021). Wir vermuten, dass die Dichtezunahme dendritischer Dornen SST exprimierender Interneurone ein kompensatorischer Mechanismus zur Aufrechterhaltung des inhibitorisch- exzitatorischen Gleichgewichts bei veränderten Netzwerksaktivität ist. Es könnte sich um einen homöostatischen Prozess handeln, durch die Bildung von mehr Dornen eine ausreichende Inhibition bei einem instabilen, übererregbaren Netzwerk zu gewährleisten. Die Veränderungen der Dornenmorphologie – stummelförmige Dornen, eine Verkürzung der Dornen, kleinere Dornenköpfe - weisen auf schwächere Synapsen hin (Bourne and Harris 2007; Ganeshina et al. 2004; Helm et al. 2021). Bei funktionell weniger starken Synapsen wäre eine verminderte Aktivität SST-exprimierender Interneurone, wie sie Ceanga et al. im Sinne einer Disinhibition der γ -Oszillationen vermuten, trotz erhöhter Dornendichte denkbar (Ceanga et al. 2023). Die funktionellen Auswirkungen dieser zusätzlichen, unreif imponierenden dendritischen Dornen auf die ankommenden exzitatorischen postsynaptischen Signale an SST-Interneuronen könnten Gegenstand zukünftiger Studien werden.

Neben der Feedforward Inhibition von PC besitzen einige SST-Interneurone noch eine weitere wichtige Funktion: Sie disinhibieren schnell-feuernde PV-Zellen (Chamberland et al. 2024). Tatsächlich scheinen teilweise einzelne Aktionspotentiale mit konsequenter GABA-Ausschüttung von SST-Interneuronen zu reichen, um das Feuern von PV-Zellen zu unterbrechen (Chamberland et al. 2023). Aufgrund der starken Kontrolle, die PV-Zellen über CA1 PC ausüben (Topolnik and Tamboli 2022), kommt es bei einer Disinhibition zu einer starken Zunahme der PC Aktivität (Chamberland et al. 2023). Grundsätzlich wäre beispielsweise auch denkbar, dass es aufgrund einer Abnahme der SST-Aktivität zu einer verminderten PV-Disinhibition kommt. Auch eine verminderte Inhibition von PV-Zellen könnte zu einer verminderten Aktionspotentialfrequenz führen, wie sie bei NMDAR AE beschrieben wurde (Ceanga et al. 2023; Wright et al. 2021).

Neben der Disinhibition von PV-Zellen durch SST-Interneurone sind mittlerweile noch andere inhibitorische Verbindungen zwischen verschiedenen Interneuronentypen beschrieben (Tzilivaki et al. 2023). SST-Interneurone selbst werden beispielsweise von VIP-exprimierende Zellen inhibiert (Gulyas et al. 1996; Turi et al. 2019). Die Funktion VIP-exprimierender Interneurone ist kaum untersucht, jedoch scheinen sie ebenfalls NMDAR zu exprimieren (Luo et al. 2020). Sie hemmen O-LM Zellen und können durch Steuerung

dendritischer Inhibition eine Disinhibition herbeiführen (Salesse et al. 2011; Tyan et al. 2014). Die an diesen Synapsen hervorgerufenen postsynaptischen Ströme weisen eine kleine Amplitude und eher langsame Kinetik auf, was möglicherweise auf den durch O-LM Zellen exprimierten $\alpha 5$ -UE enthaltenden GABA_A Rezeptor zurückzuführen ist (Salesse et al. 2011; Tyan et al. 2014). Dieser ist nach NMDAR AK Infusion im Hippokampus vermindert exprimiert. In PC zeigt sich passend dazu eine schnellere Dynamik postsynaptischer inhibitorischer Ströme (Ceanga et al. 2023). Eine ähnliche Folge wäre auch bei $\alpha 5$ -UE enthaltenden GABA_A Rezeptor exprimierenden O-LM Zellen denkbar (Salesse et al. 2011; Tyan et al. 2014), wodurch es zu einer verminderten oder inkorrekten Inhibition von O-LM Zellen kommen würde. Die Relevanz von disinhibitorischen Schaltkreisen in hippocampalen Gedächtnis- und Lernprozessen ist bisher noch kaum untersucht (Tzilivaki et al. 2023). Im Kortex gibt es jedoch Hinweise, dass diese VIP-Zellen abhängige Disinhibition eine wichtige Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen spielen könnte (Guet-McCreight et al. 2020). Um die genauen Wechselwirkungen inhibitorischer Schaltkreise verstehen zu können, wäre eine genauere Untersuchung dieser disinhibitorischen Prozesse und Verbindungen sinnvoll.

SST-positive Interneurone exprimieren zwar NMDAR (Nyiri et al. 2003), allerdings unterscheiden sie sich in Verteilung der NMDAR Untereinheiten und deren funktionellen Eigenschaften von PC (Akgul and McBain 2016; Matta et al. 2013). NMDAR AK binden eher an häufig aktive und damit offene NMDAR. Dabei stabilisieren sie zwar akut den geöffneten Zustand, verursachen aber selbst keine Aktivierung des Rezeptors (Gleichman et al. 2012). Nach der Hypothese von Lynch et al. binden die Antikörper deshalb an exzitatorischen Zellen vor allem an offene synaptische (häufig Glu2A enthaltende) NMDAR und an inhibitorischen Interneuronen in erster Linie an offene extrasynaptische, zumeist Glu2B enthaltende NMDAR (Lynch et al. 2018). Hippokampale PC weisen kaum strukturelle Veränderungen nach NMDAR AK Infusion auf (Ceanga et al. 2023). Die fehlende Veränderung der Dornendichte in der CA1 Region juveniler Mäuse nach NMDAR AK Infusion stimmt auch mit den Beobachtungen nach pharmakologischer Blockade durch MK 801 überein. Hier verändert sich die pyramidale Dornendichte ebenfalls nicht, es kommt jedoch zu einer Ausbildung von Filopodien. Außerdem wurde mittels *in vivo* Mikroskopie eine erhöhte Instabilität der Dornen und eine erhöhte Umsatzrate der Dornen beschrieben (Attardo et al. 2015; McKinney et al. 1999). Die Auswirkungen auf die strukturelle Plastizität ist bei inhibitorischen Interneuronen nach NMDAR AK Exposition oder NMDAR Blockade anders als bei exzitatorischen PC (Perez-Rando et al. 2017a; Perez-Rando et al. 2017b). Dies zeigt, dass diese verschiedenen Zelltypen unterschiedlich auf NMDAR AE reagieren und ergänzen damit die Hypothese von Lynch et al. (Lynch et al. 2018). NMDAR werden nicht nur auf SST-Interneuronen, sondern auch auf vielen anderen inhibitorischen Interneurontypen im Hippokampus exprimiert. Dabei scheinen die Rezeptoren verschiedene funktionelle Eigenschaften in den verschiedenen Zelltypen zu haben, deren physiologische und pathophysiologischen Auswirkungen noch unzureichend aufgeklärt sind und für ein besseres Verständnis lokaler Netzwerkfunktionen unabdingbar sind

(Booker and Wyllie 2021). Des Weiteren sind NMDAR auch auf Astrozyten zu finden, wo sie eine entscheidende Rolle in der Regulierung verschiedener intrazellulärer Prozesse und Signalwege spielen, sowie die Interaktion mit Nervenzellen und Blutgefäßen beeinflussen (Kosenkov et al. 2024). Inwiefern verschiedene andere NMDAR exprimierende Zelltypen in Abhängigkeit der exprimierten Rezeptoren von NMDAR AK beeinflusst werden könnte in zukünftigen Studien adressiert werden.

Die im Kortex auftretende Hypererregbarkeit bei NMDAR Hypofunktion könnte ein Erklärungsansatz für die epileptischen Anfälle bei NMDAR AE sein (Dalmau et al. 2008; Hanada 2020). Auch im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass NMDAR AK eine epileptogene Wirkung haben (Wright et al. 2015). Bei der Entstehung von epileptischen Anfällen kommt es zu einer verstärkten Erregbarkeit des neuronalen Netzwerkes (Russo 1981), die durch eine Dysbalance zwischen erregenden und hemmenden Einflüssen entsteht (Fritschy 2008). Im Hippokampus konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass es durch die NMDAR AK induzierte Hyperexzitabilität der PC zu einer erhöhten Fluktuations-sensibilität des Netzwerks und erhöhten Bereitschaft für epileptische Anfälle kommt (Wright et al. 2021). Im Falle der NMDAR AE könnte es durch die Disinhibition glutamaterger exzitatorischer Zellen im Kortex zu einer erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentration und einer vermehrten Erregbarkeit der Nervenzellen kommen (Hanada 2020; Manto et al. 2010). Die Rolle kortikaler dendritischer Interneurone in der Entstehung epileptischer Anfälle bei NMDAR im Kortex könnte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Unsere erhobenen Daten sind methodischen Limiterungen unterworfen. So kann es aufgrund verschiedener Ursachen zu Fehleinschätzungen der Dichte und Morphologie der dendritischen Dornen im Hippokampus kommen. Obwohl die moderne konfokale Mikroskopie die hochauflösende dreidimensionale Visualisierung dendritischer Dornen ermöglicht, ist vor allem die Klassifikation kleiner Dornen in der Z-Ebene weiterhin eine Herausforderung (Pchitskaya and Bezprozvanny 2020). Außerdem erfolgte die Klassifikation semi-automatisiert, weshalb eine Variabilität vorliegen könnte. Die rigide Einteilung in dünne, stummelförmige und pilzförmige Dornen wird in der Literatur ebenfalls kritisiert, da sie in der Realität kontinuierlich ineinander übergehen (Pchitskaya and Bezprozvanny 2020). Vor allem stummelförmige Dornen werden tendenziell überschätzt. Mittels STED Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass pilzförmige Dornen nach wiederkehrender Aktivierung kürzere und breitere dendritische Hälse entwickeln können und damit eventuell mit stummelförmigen Dornen verwechselt werden könnten. Hierbei wären jedoch größere Dornenköpfe zu erwarten, welche wir in unserer Arbeit nicht sehen (Runge et al. 2020; Tonnesen et al. 2014). Des Weiteren wurden in dieser Studie beide Geschlechter ohne Berücksichtigung des weiblichen Zyklus analysiert. Die Geschlechteraufteilung zwischen den beiden Versuchsgruppen ist nicht gleichmäßig. In beiden Gruppen, jedoch besonders in der NMDAR AE Gruppe, wurden mehr Männchen als Weibchen untersucht. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass zumindest die Dornendichte von O-LM Zellen, welche einen Großteil der SST-Interneurone ausmachen, durch weibliche Geschlechtshormone beeinflusst wird (Oliva et al. 2000; Perez-Rando et al. 2022). Die Gabe von

Estradiol führte bei weiblichen Mäusen nach Ovariectomie zu einer reduzierten Dornendichte auf O-LM Interneuronen (Perez-Rando et al. 2022). Außerdem wurden die Mäuse einzeln gehalten. Einzelhaltung führt aufgrund der sozialen Isolation unter anderem zu Verhaltensauffälligkeiten, Lerndefiziten und strukturellen Veränderungen der Nervenzellen. So ist bei PC der CA1 Region nach acht Wochen Einzelhaltung eine verminderte Dornendichte beschrieben (Liu et al. 2020). Hier ist jedoch zu beachten, dass die Versuchstiere in dieser Studie nur für 18 Tage einzeln gehalten wurden.

Die in dieser Studie festgestellte Zunahme unreif imponierender dendritischer Dornen SST-exprimierender Interneurone wirft zahlreiche weitere Fragen auf. Wie ist die Dynamik hinter diesen Veränderungen? Werden diese unreifen Dornen im Krankheitsverlauf ständig auf- und wieder abgebaut? Sehen wir ab Beginn der intraventrikulären Antikörperinfusion eine vermehrte Dornenbildung oder nimmt diese erst ab einem bestimmten Zeitpunkt zu? Gibt es unter Umständen verschiedene strukturelle Veränderungen SST-exprimierender Interneurone im zeitlichen Verlauf? Sehen wir beispielsweise erst einen Verlust dendritischer Dornen und dann darauffolgend eine Neubildung unreifer dendritischer Dornen?

4.2 Keine Veränderung der Dichte und des Dornenumsatzes SST-exprimierender Interneurone nach NMDAR AK Exposition *in vivo*

Zur weiteren Beurteilung des zeitlichen Verlaufs und der Dynamik dieser maßgeblichen strukturellen Veränderungen erfolgte eine chronische *in vivo* Studie mittels Zwei-Photonen Mikroskopie. Hier bestätigen sich die Veränderung der Dornendichte der SST-exprimierenden inhibitorischen Interneurone nicht. Es zeigt sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied der Dornendichte zwischen Kontroll- und NMDAR AK Gruppe. Ebenso wenig sind die Rate an neu gebildeten oder abgebauten Dornen und die Umsatzrate der Dornen verändert.

Nachdem in *der ex vivo* Studie der strukturellen Plastizität SST-exprimierender Interneurone eine Dichtezunahme der dendritischen Dornen aufgetreten ist, hätten wir Veränderungen in der Dynamik der Dornen wie beispielsweise eine Zunahme der Rate neugebildeter Dornen erwartet. Des Weiteren hätten wir *in vivo* insgesamt eine niedrigere Dornendichte unabhängig von der Versuchsgruppe erwartet, da aufgrund der schlechteren Bildqualität der Zwei-Photonen Mikroskopie die Dornendichte *in vivo* eher unterschätzt wird (Attardo et al. 2015). Interessanterweise sehen wir jedoch *in vivo* eine wesentlich höhere mittlere Dornendichte von 0,6 bzw. 0,56 Dornen/ μm in der Kontroll- und NMDAR-AE Gruppe, während die Dichte *ex vivo* mit 0,3 bzw. 0,35 Dornen/ μm in der Kontroll- und NMDAR AE Gruppe niedrigere Werte aufweist. Eine mögliche Erklärung wäre eine abweichende Auswahl dendritischer Abschnitte zur Untersuchung in den beiden Studien.

Erstens variieren die in die Studien eingeschlossenen hippocampalen Regionen und zellulären Schichten. Für die *ex vivo* Studie wurden alle Schichten des Hippokampus der CA1

und CA2 Regionen gleichmäßig miteinbezogen, um so eine ausreichende Probenanzahl zu gewährleisten. *In vivo* nimmt die Bildqualität mit zunehmender Eindringtiefe ab, weshalb bevorzugt Dendriten in den oberflächlichen Schichten der CA1 Region untersucht wurden. Tatsächlich berichten Raven et al. in einer strukturellen *ex vivo* Untersuchung SST-exprimierender Interneurone unter anderem in den CA1 und CA3 Regionen sowie im DG abweichende Dornendichten und unterschiedliche morphologische Veränderungen nach Schlafentzug in verschiedenen Hirnarealen (Raven et al. 2024). In der hippocampalen CA1 Region von Ratten konnte gezeigt werden, dass eine Untergruppe SST-exprimierender Interneurone, welche ins mediale Septum projizieren, sogar in den verschiedenen zellulären Schichten des Hippokampus verschiedene Dornendichten aufwies (Takacs et al. 2008). Des Weiteren unterscheiden sich die verschiedenen Untergruppen SST-Interneurone in ihrer Dornendichte und der Position ihrer dendritischen Dornen. So sind beispielsweise für O-LM Zellen der CA1 Region vor allem in distalen dendritischen Abschnitten ($>100\mu\text{m}$ Entfernung vom Soma) wesentlich höhere Dornendichten von ungefähr 0,2 bis zu 0,7 Dornen/ μm beschrieben als bei SST-Interneuronen, welche ins mediale Septum projizieren und teilweise fast gar keine Dornen aufweisen (Gramuntell et al. 2021; Gulyas et al. 1992; Perez-Rando et al. 2022; Schmid et al. 2016; Takacs et al. 2008). Die Dendriten der O-LM Zellen verzweigen sich im oberflächlich gelegenen StrO (Maccaferri et al. 2000) und machen höchstwahrscheinlich einen Großteil der SST-Zellen der CA1 Region und damit vermutlich auch einen großen Teil der in die *in vivo* Studie eingeschlossenen Zellen aus (Perez-Rando et al. 2017b).

Auch die angewandten Methodiken beeinflussen die Auswahl der analysierten dendritischen Abschnitte. Durch die für die konfokale Mikroskopie notwendige Schnittdicke von $< 100\mu\text{m}$ ist *ex vivo* die Darstellung dendritischer Verästelungen limitiert. Weit projizierende Dendriten und horizontal projizierende Dendriten konnten nicht mehr zum Soma zurückverfolgt werden und wurden nicht in die Studie miteingeschlossen. Hierdurch kommt es zunächst zu einem abweichenden Somaabstand zwischen den Studien, welcher *in vivo* bei $176\mu\text{m}$ in der Kontroll- und bei $163\mu\text{m}$ in der NMDAR AE Gruppe liegt und in der *ex vivo* Studie mit $137\mu\text{m}$ in der Kontroll- und $130\mu\text{m}$ in der NMDAR AE Gruppe wesentlich niedrigere Werte aufweist. Tatsächlich sehen verschiedene Studien tendenziell höhere Dornendichten SST-exprimierender Interneurone in dendritischen Abschnitten mit größerem Somaabstand (Guirado et al. 2014; Perez-Rando et al. 2017b). Der höhere Somaabstand in der *ex vivo* Studie trägt daher höchstwahrscheinlich ebenfalls zu der abweichenden Dornendichte bei. Des Weiteren ist zu beachten, dass sich die dornenreichen O-LM Zellen in erster Linie horizontal verzweigen (Maccaferri et al. 2000). Es wäre denkbar, dass genau diese horizontalen Projektionen bei der koronaren Schnittführung durch den Hippokampus der *ex vivo* Studie nicht mehr zum Soma zurückverfolgbar waren und daher weniger in die Studie miteingeschlossen werden konnten. Interessanterweise zeigten sich in verschiedenen strukturellen Studien SST-exprimierender Interneurone und auch O-LM Zellen in der CA1 Region des Hippokampus durch konfokale Mikroskopie auch bei einem Somaabstand von $>100\mu\text{m}$ eher niedrigere Dornendichten mit Werten zwischen 0,2 und 0,4 Dornen/ μm (Gramuntell et al. 2021; Guirado et al. 2014; Perez-Rando et al. 2017b; Perez-Rando et al. 2022; Raven et al. 2024; Scheuss and Bonhoeffer 2014).

In einer Zwei-Photonen mikroskopischen *in vivo* Untersuchung der strukturellen Plastizität hippocampaler O-LM Zellen zeigten sich mit Dornendichten von über 0,7 Dornen/ μm (Schmid et al. 2016) hingegen wesentlich höhere Werte. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Dornendichten verschiedener Publikationen aufgrund von abweichenden Versuchsbedingungen und Methodiken untereinander schwer vergleichbar sind. Trotzdem weist die in dieser Studie ebenfalls sehr hohe Dornendichte SST-exprimierender Interneurone in einer Zwei-Photonen mikroskopischen Studie auf eine Beeinflussung der Dornendichte durch die Methodik, beispielsweise durch die bessere Darstellung dornenreicher horizontaler Projektionen von O-LM Zellen, hin.

Drittens könnte es zu einer Beeinflussung der Dornendichte durch die untersucherabhängige Auswahl der dendritischen Abschnitte für die Analyse gekommen sein. Nachdem SST-Interneurone im Gegensatz zu PC eher niedrige Dornendichten und teilweise sogar nur vereinzelt Dornen aufweisen (Gulyas et al. 1992; Scheuss and Bonhoeffer 2014), sollten in beiden Studien eher dornenreichere dendritische Abschnitte mit einem Somaabstand von $> 100\mu\text{m}$ analysiert werden. Möglicherweise konnten in der *in vivo* Studie dornenreiche dendritische Abschnitte besser gefunden und rückverfolgt werden und wurden deshalb vermehrt in die Studie eingeschlossen. Eine andere Erklärung ist, dass in der Zwei-Photonen mikroskopischen Rohdatei kleinere Dornen nicht erkennbar waren und der entsprechende dendritische Abschnitt zunächst dornenärmer imponierte. Durch eine hierdurch entstandene Verzerrung der Probenauswahl könnte es zu der höheren Dornendichte *in vivo* gekommen sein.

Die Analyse unterschiedlicher dendritischer Abschnitte SST-exprimierender Interneurone in den beiden Studien könnte auch der Grund die *ex vivo* auftretende Dichtezunahme dendritischer Dornen bei *in vivo* unveränderter Dornendichte und Dynamik sein. So zeigen beispielsweise Raven et al. in ihrer bereits zuvor erwähnten strukturellen Analyse SST-exprimierender Interneurone im Hippokampus mittels konfokaler Mikroskopie verschiedene morphologische Dornenanpassungen und Veränderungen der dendritischen Dornendichte in den Subregionen CA1 und CA3 nach Schlafentzug. Während es in CA1 zu einer Zunahme der gesamten Dornendichte, insbesondere der dünnen Dornen und einer Abnahme von Dornenvolumen und -oberfläche kam, zeigte sich in der CA3 Region eine Zunahme der Dichte pilzförmiger Dornen, sowie einer Zunahme von Dornenvolumen und -oberfläche (Raven et al. 2024). Ähnlich treten in Mausmodellen für Schlafmangel bei hippocampalen PC nur in bestimmten dendritischen Abständen abhängig von der Verzweigung und dem Abstand zum Soma morphologische Veränderungen dendritischer Dornen auf (Havekes et al. 2016; Raven et al. 2019). Im visuellen Kortex der Maus wurde mittels Zwei-Photonen Mikroskopie von PC sogar beobachtet, dass bei einer geringeren Dornendichte eine höhere Fraktion transienter dendritischer Dornen auftritt (Holtmaat et al. 2005). Auch im Mausmodell der NMDAR AE beobachteten Ceanga et al. mittels konfokaler Mikroskopie in den verschiedenen hippocampalen Schichten unterschiedliche morphologische Anpassungen der dendritischen Dornen von PC. Dabei trat im StrL-m eine Zunahme dünner Dornen auf, während im StrR eine Abnahme stummelförmiger Dornen vorlag (Ceanga et al. 2023). Diese Studien verdeutlichen, dass Parameter der analysierten dendritischen Abschnitte wie der Somaabstand, die Verzweigung, die Position in den

hippokampalen Schichten und Subregionen einen wichtigen Einfluss auf die Dichte, Morphologie und Dynamik dendritischer Dornen haben können. Die ungleiche Auswahl dendritischer Abschnitte kann daher möglicherweise die Dichteveränderungen der *ex vivo* Studie bei gleichbleibender Dornendichte *in vivo* begründen. Hierbei ist jedoch wichtig zu betonen, die Analysen beiden Studien verblindet durchgeführt wurden. Es wurden in den Studien in beiden Versuchsgruppen jeweils ähnliche Zellen und Dendritenabschnitte untersucht.

In zukünftigen Studien wäre eine genauere Untersuchung der strukturellen Veränderungen in Abhängigkeit genau dieser Parameter interessant. Wie bereits erwähnt zeigten Ceanga et al. verschiedene morphologische Veränderungen dendritischer Dornen in verschiedenen Schichten des Hippocampus: Im StrR, wo hauptsächlich glutamaterge Axone von CA3 PC zu finden sind (Somogyi and Klausberger 2005; Zhang et al. 2012), kommt es zu einer Zunahme dünner Dornen (Ceanga et al. 2023). Im Strl-m, wo exzitatorische Fasern aus dem EC verzweigen (Deller et al. 1996; Takacs et al. 2012), ist eine Abnahme der stummelförmigen Dornen zu beobachten, was auf eine mögliche Input abhängige strukturelle Anpassung hinweist (Ceanga et al. 2023). Tatsächlich wissen wir auch, dass es beispielsweise bei PV-Interneuronen in verschiedenen Schaltkreisen zu verschiedenen NMDAR abhängigen postsynaptischen Signalen kommt. Die Dendriten der Feedback Schleife im Stratum oriens haben deutlich mehr NMDAR als die Feedforwardschleife im Stratum radiatum und reagieren so unterschiedlich auf neuronale Aktivität (Cornford et al. 2019; Le Roux et al. 2013). Es ist also möglich, dass es nach Applikation von NMDAR AK zu verschiedenen Reaktionen in verschiedenen Schaltkreisen des Hippokampus kommt und auch SST-Interneurone in den verschiedenen Schichten unterschiedlich beeinflusst werden. Beispielsweise sind sie für die Feinjustierung des Informationsfluss ins Strl-m und ins StrR verantwortlich (Leao et al. 2012), wo es laut Ceanga et al. zu abweichenden strukturellen Veränderungen der PC kommt (Ceanga et al. 2023). Auch wäre interessant, ob es beispielsweise im Stratum oriens/alveus, wo inhibitorische Interneurone O-LM Zellen kontaktieren, zu anderen Adaptationen kommt (Tyan et al. 2014).

Die strukturelle Plastizität SST-exprimierender Interneurone im Hippokampus *in vivo* ist kaum untersucht. Die meisten strukturellen *in vivo* Studien fokussieren sich auf exzitatorische PC. Hier zeigt sich in hippokampalen CA1 PC eine wesentlich höhere Dornenumsatzrate im Vergleich zum Kortex. Auch die pharmakologische NMDAR Blockade (MK 801) führt in der CA1 Region mit einem vermehrten Dornenabbau in PC zu anderen Effekten als im Kortex (Attardo et al. 2015). In einer konfokalen Studie der hippokampalen PC im Mausmodell der NMDAR AE kam es hingegen nicht zu einer Abnahme der gesamten Dornendichte (Ceanga et al. 2023). Interessanterweise kommt es auch in konfokalen Untersuchungen von SST-Interneuronen nach NMDAR Blockade (MK 801) mit einer Dichteabnahme dendritischer Dornen bzw. gleichbleibender Dornendichte nach *in vivo* Applikation im Gegensatz zu der Dichtezunahme nach intraventrikulärer NMDAR AK Infusion zu unterschiedlichen Ergebnissen (Perez-Rando et al. 2017a; Perez-Rando et al. 2017b). Insgesamt deutet dies auf unterschiedliche pathologische Beeinflussungen einer

pharmakologischen NMDAR Blockade und einer NMDAR AK induzierten NMDAR Hypofunktion auf Schaltkreisebene hin.

Unsere Untersuchungen unterliegen abgesehen von den zuvor erläuterten Unterschieden zur *ex vivo* Studie einigen weiteren Limitationen. Zunächst ermöglicht die Auflösung der Zwei Photonen Mikroskopie keine Darstellung der genauen morphologischen Parameter oder weitere Klassifizierung der dendritischen Dornen (Blazquez-Llorca et al. 2015). Kleinere Dornen, insbesondere in der Z-Ebene sind nicht darstellbar (Attardo et al. 2015). Die Regulation inhibitorischer Schaltkreise nach NMDAR Blockade könnte altersabhängig beeinflusst sein (Gramuntell et al. 2021; Ma et al. 2020). Für die Dornendichte SST exprimierender Interneurone sind zwar altersbedingte Unterschiede beschrieben, diese werden jedoch von den Autoren auf eine Veränderung weiblicher Geschlechtshormone zurückgeführt (Gramuntell et al. 2021). In unseren Studien liegt tatsächlich ein Altersunterschied vor: Das Alter der Mäuse lag zu Pumpenimplantation der *in vivo* Studie bei zehn bis fünfzehn Wochen, bei den *ex vivo* Experimenten waren die Tiere mit elf bis siebzehn Wochen bereits ein wenig älter. Auch in dieser Studie wurden beide Geschlechter ohne Berücksichtigung des weiblichen Zyklus analysiert, wobei die Geschlechterverteilung zwischen den beiden Versuchsgruppen gleichmäßig war. Eine weitere Limitation ist die kleine Versuchsgruppengröße, weshalb kleinere Effekte eventuell nicht nachgewiesen werden können. Obwohl die Versuchsgruppengröße mit je 5 Tieren pro Gruppe eher klein ist (Charan and Kantharia 2013), befindet sie sich noch im Rahmen üblicher Versuchsgruppengrößen von Tierversuchen (Charan and Kantharia 2013; Richter et al. 2018).

Die dynamischen Veränderungen und Anpassungen von Synapsen werden auch von den umliegenden Zellen maßgeblich beeinflusst (Jeon and Kim 2023). Insbesondere eine Dysfunktion der Interaktion zwischen Nervenzellen und Mikroglia wird in vielen neuropsychiatrischen Erkrankungen diskutiert (Jeon and Kim 2023). Um eine mögliche Beteiligung von Mikroglia bei NMDAR AE zu untersuchen, adressierte ich zunächst die Frage, ob es zu morphologischen Veränderungen als Hinweis auf eine Mikrogliaaktivierung im Mausmodell der NMDAR AE kommt.

4.3 Aktivierung von Mikrogliazellen im Mausmodell der NMDAR AE

Die Untersuchung der Morphologie der Mikrogliazellen weist typische Veränderungen im Sinne einer Aktivierung auf. Es zeigen sich kürzere Hauptdendriten mit weniger Astabschnitten und Verzweigungspunkten, sowie einer geringeren Verflechtung der Verzweigungspunkte nach NMDAR AK Infusion. Außerdem sind die Sphärizität und die Zirkularität als Maße für die Kompaktheit der Zelle im Mausmodell der NMDAR AE erhöht.

Bei einer Aktivierung von Mikrogliazellen kommt es zu morphologischen Veränderungen und zur Freisetzung proinflammatorischer Moleküle wie TNF- α , IL- β und IL-6 (Glass et al. 2010; Kwon and Koh 2020). Ruhende Mikroglia weisen einen kleinen Zellkörper mit

stark verzweigten Fortsätzen auf. Nach Aktivierung erfolgt eine Formveränderung bis hin zu einer amöboiden Zellform: Die Zellkörper vergrößern sich und die vielen dünnen Fortsätze ziehen sich zurück (Anttila et al. 2017; Colonna and Butovsky 2017). Die in dieser Arbeit festgestellten morphologischen Veränderungen nach NMDAR AK Infusion mit kürzeren Fortsätzen und weniger ausgeprägter Ramifizierung im Sinne von weniger Astabschnitten und weniger Verzweigungspunkten weisen auf einen Übergang in die amöboide Zellform hin. Auch zeigen die erhöhte Zirkularität und Sphärizität eine verminderte Komplexität der Verästelung. Insgesamt zeigt diese Untersuchung, dass es zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen nach intraventrikulärer Infusion von NMDAR AK kommt.

Unsere Daten zeigen damit erstmals durch eine quantifizierte morphologische Analyse eine Aktivierung von Mikrogliazellen im Mausmodell der NMDAR AE. Die Daten sind in Zusammenarbeit mit Ceanga et al. bereits veröffentlicht (Ceanga et al. 2023). Ceanga et al. beobachten in ihren KEGG Analysen eine Anreicherung von entzündlichen Signalwegen, sowie in immunhistochemischen Färbungen ein erhöhtes CD68+/Iba1+- Verhältnis nach intraventrikulärer NMDAR AK Behandlung als Hinweis auf eine vermehrte Mikrogliaaktivierung, was unsere Ergebnisse bestätigt. Dies entspricht den Erkenntnissen aus humanen neuropathologischen Studien, in welchen sich eine Mikrogliaaktivierung mit Betonung im Hippokampus zeigte (Tuzun et al. 2009; Zrzavy et al. 2021). Auch in Liquoruntersuchungen von PatientInnen konnten erhöhte Spiegel der inflammatorischen Marker sTREM2 und CD44 gemessen werden, was auf eine Mikrogliaaktivierung hindeutet (Chang et al. 2023).

Interessanterweise zeigten sich weder in humanen Autopsien, noch in den immunhistochemischen Anfärbungen nach intraventrikulärer Antikörperinfusion vermehrte Infiltrate zytotoxischer T-Zellen (Ceanga et al. 2023; Tuzun et al. 2009; Zrzavy et al. 2021), wie es bei anderen paraneoplastischen Enzephalitiden der Fall ist (Bernal et al. 2002). Bei diesen kommt es zu einem T-Zell vermittelten neuronalen Untergang, welcher bei NMDAR Enzephalitis nicht zu beobachten ist (Bernal et al. 2002; Blumenthal et al. 2006; Tuzun et al. 2009; Zrzavy et al. 2021). Ebenso wenig kommt es zu Komplementsystem assoziierten Nervenschädigungen (Martinez-Hernandez et al. 2011; Tuzun et al. 2009; Zrzavy et al. 2021). Die immunopathologischen Hauptbefunde der NMDAR AE sind stattdessen die starke Aktivierung von Mikrogliazellen und IgG Ablagerungen (Tuzun et al. 2009). Die unter den Antikörper-abhängigen Enzephalitiden immunopathologische Manifestation scheint speziell und erfordert weitere Erforschung (Bien et al. 2012).

Die morphologische Analyse von Mikrogliazellen unterliegt einigen Limitierungen. Zunächst ist das Markerprotein Iba-1 nicht Mikrogliaspezifisch, sondern bindet auch an Makrophagen (Imai et al. 1996; Ohsawa et al. 2004). Dementsprechend können wir in unserer Studie nicht sicher ausschließen, dass es sich bei den Zellen nicht auch zumindest teilweise um eingewanderte Makrophagen handelt (Li and Barres 2018). Des Weiteren könnte die Aktivierung der Zellen auch durch eine inflammatorische Reaktion durch die intraventrikulären Katheter mitbedingt sein. Nachdem jedoch auch in der Kontrollgruppe eine intraventrikuläre Infusion vorliegt und die morphologischen Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe auftreten, sind die morphologischen Veränderungen der

Mikroglia trotzdem höchstwahrscheinlich durch die NMDAR AK bedingt. Andere Limitierungen der morphologischen Mikrogliaanalyse sind die Bildqualität, eine ausreichende Darstellung der dreidimensionalen Verzweigungen und eine voreingenommene Auswahl der zu analysierenden Regionen. Diese Limitierungen werden durch die automatisierte Qualitätskontrolle des Algorithmus vermieden (Heindl et al. 2018).

Die Aktivierung oder Dysfunktion von Mikroglia konnte bereits mit der Pathogenese verschiedener neurologischer und neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Schizophrenie, Autismus und dem fragilen X Syndrom in Verbindung gebracht werden (Comer et al. 2020; Jawaid et al. 2018; Kim et al. 2017; Li et al. 2020). Ich konnte in dieser Arbeit nun zeigen, dass es auch im Mausmodell der NMDAR AE zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen kommt. In Zusammenschau mit der in humanen Autopsien festgestellten Infiltrierung des Gewebes durch Mikrogliazellen ist eine pathophysiologische Beteiligung der Mikroglia in der NMDAR AE denkbar. Inwiefern morphologische Veränderungen von Mikroglia Rückschlüsse auf funktionelle Folgen zulassen, ist bisher nicht abschließend geklärt (Paolicelli et al. 2022). So ging man beispielsweise davon aus, dass amöboide Mikroglia mehr phagozytieren, ist jedoch mittlerweile von dieser Vorstellung abgekommen (Paolicelli et al. 2022). In einem Mausmodell für Temporallappenepilepsie wurde sogar eine geringere Phagozytose bei amöboiden Mikroglia beobachtet (Abiega et al. 2016). Eine viel untersuchte Funktion von Mikroglia ist die Interaktion mit Synapsen, bei der sie schwache und inaktive Synapsen erkennen und eliminieren können (Györffy et al. 2018). Hierbei sind als mögliche Pathomechanismen verschiedener Erkrankungen sowohl eine überschießende Elimination von Synapsen mit Synapsenverlust, als auch eine unzureichende Phagozytose synaptischer Elemente mit Synapsenüberschuss beschrieben (Andoh et al. 2019; Fan et al. 2023; Hong et al. 2016). Hier stellt sich nun die Frage, ob die veränderte Netzwerkhomeostase der NMDAR AE (Ceanga et al. 2023; Wright et al. 2021) mit einer pathologischen Reaktion der Mikroglia einhergeht und in welche Richtung diese verschoben ist. Kommt es zu einer vermehrten Entfernung schwacher Synapsen bei hypoaktivem Netzwerk (Ceanga et al. 2023; Wright et al. 2021)? Könnte es hierdurch ähnlich wie bei der Alzheimererkrankung zu einer durch unangemessen gesteigerte Mikroglia abhängige Synapsenelimination zu einem Synapsenverlust kommen (Hong et al. 2016)? Oder kommt es ähnlich wie bei der Autismus Spektrum Erkrankung zu einer unzureichenden Synapsenentfernung (Andoh et al. 2019; Fan et al. 2023)?

4.4 Reduzierte Lokalisation von vGlut1 in Mikrogliazellen – verminderte Interaktion von Mikroglia mit exzitatorischen präsynaptischen Elementen bei NMDAR AE?

In den Analysen der Trogozytose ließ sich eine verminderte Lokalisation exzitatorischer präsynaptischer Fragmente in Mikroglia nachweisen. Interessanterweise sehen wir keine Veränderung der Aufnahme des exzitatorischer Markers vGlut1 in CD68 markierten Lysosomen, sodass von einer Lysosomen-unabhängigen Internalisierung oder einer

verminderten Ausbildung von Zell-Zell Kontakten auszugehen ist. Bei inhibitorischen präsynaptischen vGAT markierten Fragmenten ist keine veränderte Internalisierung in Mikrogliazellen nachweisbar.

Mikroglia führen unter physiologischen Bedingungen zu einer komplementabhängigen Markierung und Aufnahme schwacher Synapsen (Schafer et al. 2012; Stevens et al. 2007). Im Hippokampus kommt es nach NMDAR AK Infusion zu einer verminderten Netzwerksamkeit mit verminderter Frequenz von Aktionspotentialen von PC (Ceanga et al. 2023; Koch et al. 2019; Wright et al. 2021). Dementsprechend wäre eine vermehrte Aufnahme exzitatorischer präsynaptischer Elemente zu erwarten gewesen. Interessanterweise sehen wir keine vermehrte Aufnahme exzitatorischer Synapsen in Lysosomen.

Ob wohl wir keine Veränderung der Aufnahme von exzitatorischen präsynaptischen Fragmenten in Lysosomen sehen, zeigen sich interessanterweise die intramikroglialen präsynaptischen Fragmente vermindert. Hier stellt sich zunächst die Frage, wie diese Verminderung der intramikroglialen präsynaptischen Fragmente zu deuten ist.

Bei einer verminderten Phagozytose oder Trogozytose hätten wir verminderte vGLUT1 Partikel innerhalb der CD68 markierten lysosomalen Zusammenschlüsse erwartet, welche jedoch unverändert sind (Weinhard et al. 2018). Es wäre möglich, dass diese präsynaptischen Fragmente in Mikroglia durch nicht-phagozytotische Internalisierungsmechanismen verursacht sein könnte (Rogers and Bhattacharya 2013).

Ein anderer Erklärungsansatz wäre, dass es um verminderte Kontaktierung der exzitatorischen Präsynapsen durch Mikroglia handelt. Aufgrund der Auflösungslimitierung der Lichtmikroskopie kommt es leicht zu einer Fehleinschätzung des durch Mikroglia verschlungenen Materials (Schafer et al. 2014). In einer Studie von Weinhard et al. kontrollierten die Autoren die Ergebnisse konfokaler Lichtmikroskopie mit Elektronenmikroskopie und demonstrierten, dass lichtmikroskopisch festgestellte Mikroglia/Dornen Kollaborationen elektronenmikroskopisch eher Annäherungen als Um- bzw. Verschlingungen sind (Weinhard et al. 2018). Dabei ließ sich nur eine von fünf lichtmikroskopisch festgestellten Umschlingungen elektronenmikroskopisch als solche bestätigen, während es sich bei den restlichen um Annäherungen bzw. in einem Fall sogar nicht einmal um eine Kontaktstelle handelte (Weinhard et al. 2018).

Aktivitätsabhängige Kontakte zwischen mikroglialen Fortsätzen und dendritischen Dornen konnten mittlerweile sowohl durch konfokale Mikroskopie, hochauflösende Elektronenmikroskopie und auch *in vivo* mittels Zwei-Photonen Mikroskopie beobachtet werden (Chugh and Ekdahl 2016; Tremblay et al. 2010; Wake et al. 2009). Neben der synaptischen Aufnahme gibt es auch noch andere direkte Interaktionswege zwischen Nerven- und Mikrogliazellen. Direkter Kontakt zwischen mikroglialen Fortsätzen und Synapsen beeinflusst die synaptische Aktivität, die postsynaptischen Strömungen, die neuronale Aktivität und die Synchronisation neuronaler Populationen (Akiyoshi et al. 2018; Pfeiffer et al. 2016). Nach Berührung von Mikroglia kann es auch zur Neuausbildung dendritischer Dornen kommen (Miyamoto et al. 2016). Der Fraktalkin Signalweg scheint auf bisher noch nicht vollständig geklärt Weise ebenfalls einen Effekt auf die synaptische Reifung,

synaptische Plastizität und Transmission zu haben (Basilico et al. 2019; Kim et al. 2020; Wu et al. 2015). Die CD200 Bindung spielt nicht nur eine Rolle in der synaptischen Elimination, sondern wirkt über eine Mikroglia-Inhibition auch neuroprotektiv, verbessert die synaptische Funktion und fördert synaptische Plastizität (Feng et al. 2019; Hernangomez et al. 2012; Sun et al. 2020). Mikroglia kommunizieren auch über Botenstoffe mit Neuronen und können so Prozesse wie neuronale Aktivität, Synaptogenese, Synapsenelimination und synaptische Plastizität steuern (Haidar et al. 2022). Durch die räumliche Nähe von Mikroglia Fortsätzen wäre eine lokalisierte Freisetzung von Botenstoffen zur Modulation bestimmter Synapsen bei Lernvorgängen möglich (Parkhurst et al. 2013). Es gibt also zahlreiche verschiedene nicht-phagozytotische Interaktionen zwischen Synapsen und Mikroglia, die vermindert sein könnten. Somit könnte es sich in der von uns beobachteten Reduktion präsynaptischer Elemente nach NMDAR AK Exposition auch um eine Kontaktreduktion zwischen mikroglialen Fortsätzen und Synapsen handeln.

Eine weitere Ursache für die in unserer Studie beobachtete Veränderung der vGlut1 Sphären in Mikroglia wäre eine veränderte Expression von vGlut1 Proteinen nach Antikörperinfusion. Aufgrund der Ergebnisse einer frühen Zellkulturstudie mit Western-Blot Analysen hippocampaler Neurone nach NMDAR AK Exposition für drei oder sieben Tage wurde zunächst eine spezifische Beeinträchtigung des NMDAR ohne maßgebliche Dysregulation anderer synaptischer Proteine, unter anderem vGLUT1, angenommen (Hughes et al. 2010). In einer neueren Studie konnte in Proteomanalysen mittels Massenspektrometrie in einem Mausmodell der NMDAR AE gezeigt werden, dass es *in vivo* durchaus zu einer Dysregulation synaptischer Proteine und Rezeptoren kommt. Hierbei kommt es unter anderem zu einer verminderten Expression des exzitatorischen Markers vGLUT1 (Ceanga et al. 2023). Diese reduzierte Expression von vGLUT1 könnte die verminderten intramikroglialen vGLUT1 Sphären erklären. Hier wäre jedoch auch eine Reduktion der vGLUT1 Sphären in CD68 pro Mikroglia-volumen zu erwarten, welche wir in unserer Studie nicht sehen.

Der Marker CD68 befindet sich vor allem in späten Endosomen und Lysosomen (Barois et al. 2002; Chistiakov et al. 2017). Möglicherweise befinden sich vGLUT1 Sphären, welche nicht mit CD68 kolokalisieren im unvollendeten Prozess der Phagozytose. Auch Schafer et al. postulierten 2012, dass synaptische Fragmente in Mikrogliazellen, aber außerhalb von CD68 Sphären noch nicht vollständig phagozytiert wurden (Schafer et al. 2012). In zukünftigen Studien könnten andere Markerproteine verwendet werden, welche frühere Stadien der Internalisierung besser abbilden.

Was würde eine verminderte Internalisierung exzitatorischer präsynaptischer Elemente auf Netzwerkebene bedeuten? Bei einer Beeinträchtigung der synaptischen Elimination in der Entwicklung kommt es zu einem Überschuss dendritischer Dornen mit unreifen Synapsen (Paolicelli et al. 2011). So kommt es in Mausmodellen der Autismus Spektrum Erkrankung im Kortex und Hippokampus aufgrund einer Störung der Phagozytose exzitatorischer synaptischer Strukturen zu einer Dichtezunahme dendritischer Dornen (Meng et al. 2022; Roumier et al. 2004). In Mausmodellen für frühkindliche Stresserfahrungen kommt es ebenfalls aufgrund einer Dysfunktion der synaptischen Elimination zu einer

erhöhten Dornendichte hippocampaler PC (Dayananda et al. 2023). Im Falle der NMDAR AE sehen wir mit der verminderten Internalisierung exzitatorischer präsynaptischer Fragmente bei einer Zunahme unreif imponierender dendritischer Dornen SST-exprimierender Interneurone einen ähnlichen Zusammenhang. Obwohl diese Zunahme der Dornendichte aufgrund unzureichender synaptischer Elimination in der Entwicklung zumindest bei hippocampalen PC transient ist (Paolicelli et al. 2011), scheinen diese zahlreichen schwachen synaptischen Verbindungen in der Autismus-Spektrum-Erkrankung eine verminderte funktionale Konnektivität hervorzurufen (Zhan et al. 2014). Diese unzureichende Reifung neuronaler Verbindungen wird bei der Autismus Spektrum Erkrankung und bei frühkindlichen Stresserfahrungen als mögliche Ursache für die bis ins Erwachsenenalter persistierenden Defizite diskutiert (Dayananda et al. 2023; Zhan et al. 2014). Auch in Mausmodellen viraler Enzephalitiden werden Mikroglia als Ursache anhaltender kognitiver Defizite diskutiert. Im Mausmodell der West-Nil Virus Enzephalitis wurde insbesondere bei persistierenden Lerndefiziten eine vermehrte Internalisierung präsynaptischer Fragmente beobachtet (Vasek et al. 2016). Eine andere Studie kam übereinstimmend zu dem Schluss, dass eine anhaltende Mikrogliaaktivierung nach Westnil- oder Zikavirus Infektionen zu langanhaltenden kognitiven Defiziten führen könnte (Garber et al. 2019). Möglicherweise kommt es infolge der NMDAR AK induzierten Netzwerkimbalance zu einer Umstrukturierung neuronaler Verbindungen, welche eventuell aufgrund unzureichender synaptischer Eliminationsmechanismen zu einem Überschuss dendritischer Dornen an SST-Interneuronen führt. Bei dieser Dornenzunahme könnte es sich ebenfalls um ein transientes Phänomen handeln, welches sich im Laufe der Genese zurückbildet. Trotzdem könnten die langanhaltenden kognitiven Defizite bei PatientInnen mit NMDAR AE erklären (Finke et al. 2012) infolge einer unzureichenden Ausreifung neuronaler Schaltkreise bei einer insuffizienten Mikrogliaelimination auftreten.

Inwiefern es bei der NMDAR AE zu einer Mikroglia-abhängigen Interaktion mit synaptischen Elementen kommt, ist bisher kaum untersucht. Rahman et al. zeigten in einer Mikroglia/Neuronen-Zellkultur nach Gabe von NMDAR AK, dass Mikroglia Antikörper-/Rezeptorkomplexe lysosomal in sich aufnehmen (Rahman et al. 2023). In dieser Zellkulturstudie entfernen Mikroglia außerdem auch synaptische Fragmente. Die Ergebnisse aus immunhistochemischen Anfärbungen prä- und postsynaptischer Markerproteine suggerieren, dass eher Postsynapsen phagozytiert werden (Rahman et al. 2023). Es scheint sich jedoch um eine komplementabhängige Entfernung dieser Strukturen zu handeln, was dem in humanen Autopsien festgestellten Fehlen der Komplementaktivierung widerspricht (Rahman et al. 2023; Tuzun et al. 2009). Eine Beteiligung des Komplementsystems in früheren Stadien ist trotz der bisher nicht festgestellten Komplementaktivierung möglich. Es ist des Weiteren darauf hinzuweisen, dass es in den Zellkulturen anders als in dem Mausmodell der NMDAR AE zu keiner eindeutig morphologisch nachweisbaren Mikrogliaaktivierung kam (Rahman et al. 2023). Es ist dementsprechend möglich, dass diese Zellkultur ein anderes Krankheitsstadium abbildet als das Mausmodell und die immunologischen Krankheitsprozesse sich im Verlauf der Erkrankung unterscheiden.

Wir sehen keine veränderte Interaktion oder Trogozytose inhibitorischer präsynaptischer Elemente mit Mikrogliazellen. Die Expression von vGAT zeigte sich in Proteomanalysen mittels Massenspektrometrie im Mausmodell der NMDAR AE nicht verändert (Ceanga et al. 2023). In kortikalen Zellkulturen reduzieren NMDAR AK die Level der präsynaptischen Proteine vGAT und GAD65 bei inhibitorisch-zu-exzitatorischen Synapsen (Andrzejak et al. 2022), wobei mögliche Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* Versuchen und verschiedenen Hirnregionen zu beachten sind. Über die Funktionalität inhibitorischer Synapsen wissen wir außerdem aus elektrophysiologischen Messungen, dass die basale Hemmung von PC weiterhin gewährleistet ist (Ceanga et al. 2023; Wright et al. 2021). Nachdem die Inhibition intakt zu sein scheint, wäre es denkbar, dass die Aktivität der ankommenden Signale auf Interneurone unverändert ist. Dies würde bedeuten, dass es an dieser Stelle nicht zu vermehrten inaktiven Synapsen kommen würde. Nachdem die Regulation von Synapsen durch Mikroglia aktivitätsabhängig ist und nur inaktive Synapsen markiert und angegriffen werden (Gyorffy et al. 2018), unterstützt eine unveränderte Trogozytose inhibitorischer Präsynapsen die Beobachtung einer funktionell intakten Inhibition.

Zu den Limitationen dieser Studie zählen in erster Linie die bereits genannten Problematiken der lichtmikroskopischen Auflösung (Schafer et al. 2014) und der unvollständigen Abbildung des Phagozytoseprozesses durch den Marker CD 68 (Barois et al. 2002; Chistiakov et al. 2017). Des Weiteren ist das Fassungsvermögen für die Phagozytose zumindest bei Makrophagen limitiert (Cannon and Swanson 1992), weshalb gegebenenfalls eine Studie zu einem früheren Krankheitsstadium spannend gewesen wäre. Auch hier können wir nicht ausschließen, dass es sich um Synapsenelimination durch eingewanderte Makrophagen handelt (Shi et al. 2022; Spiteri et al. 2022).

4.5 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass NMDAR AK zu strukturellen Anpassungen SST-exprimierender Interneurone führen. Durch die Dichtezunahme dendritischer Dornen könnten SST-exprimierende Interneurone kompensatorisch auf das empfindliche Gleichgewicht neuronaler Netzwerke einwirken. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es im Mausmodell der NMDAR AE ebenso wie in humanen Autopsien (Tuzun et al. 2009; Zrzavy et al. 2021) zu einer Mikrogliaaktivierung im Hippokampus kommt. Unsere Daten suggerieren, dass es zu einer verminderten Überwachung exzitatorischer synaptischer Strukturen durch Mikrogliazellen gekommen sein könnte, wodurch der ebenso aufgetretene Überschuss unreif imponierender dendritischer Dornen SST-exprimierender Interneurone begründet sein könnte.

Für das Verständnis der funktionellen Auswirkungen der strukturellen Veränderungen SST-exprimierender Interneurone auf Schaltkreisebene und verschiedener Anpassungen SST-exprimierender Interneurone durch die Schichten und Regionen des Hippokampus

sind weiterführende Studien notwendig. Ebenso sollten in zukünftigen Studien der zeitliche Ablauf und die Dynamik, sowie die funktionellen Auswirkungen der Mikrogliaaktivierung auf synaptische Verbindungen und neuronale Schaltkreise adressiert werden.

Wir tragen mit dieser Studie wichtige Erkenntnisse zu pathophysiologischen Veränderungen der bisher wenig untersuchten SST-positiven Interneuronen und Mikroglia bei NMDAR AE bei. Die pathophysiologischen Mechanismen bei NMDAR AK induzierter NMDAR Hypofunktion könnten auf viele weitere NMDAR-assoziierte Erkrankungen übertragbar sein. Es gibt zahlreiche Belege für die Wichtigkeit des NMDARs bei der Vermittlung synaptischer Plastizität (Malenka and Bear 2004; Traynelis et al. 2010; Wang et al. 2022). Aufgrund der zentralen Rolle dieses Rezeptors kann eine Dysfunktion zu vielfältigen Erkrankungen führen, er stellt hierdurch jedoch auch eine mögliche Zielstruktur für therapeutische Ansätze dar. Die Modulation von NMDAR bei affektiven Störungen wie Depressionen und Angststörungen wäre beispielsweise eine vielversprechende Therapieoption (Wang et al. 2022). Des Weiteren profitieren beispielsweise auch Alzheimer PatientInnen von einer Blockade extrasynaptischer NMDAR (Wang and Reddy 2017). Auch bei der Schizophrenie liegt eine NMDAR Dysfunktion vor und eine Modulation des Rezeptors käme als mögliche Therapie infrage (Nasyrova et al. 2022). Eine eingehende Erforschung der NMDAR abhängigen synaptischen Mechanismen und ein besseres Verständnis der bei einer Fehlregulation dieser Mechanismen entstehenden Pathophysiologie könnte die Behandlungserfolge verschiedener psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen deutlich verbessern.

5 Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α - Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Iso- xazolepropionsäurerezeptor
BiC	Bistratified cells
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Cornu ammonis
DG	Gyrus dentatus
EC	Entorhinaler Kortex
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Signal
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
IL	Interleukin
LTD	Long Term Depression
LTP	Long Term Potentiation
NMDAR	N-methyl-D-aspartat-Rezeptoren
NMDAR AK	NMDAR Autoantikörper
NMDAR AE	Anti-NMDA Rezeptor Autoimmunenzephalitis
NZS	Normales Ziegenserum
O-LM	oriens/lacunosum- moleculare Zellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Pyramidenzellen
PV	Parvalbumin
SST	Somatostatin
StrI-m	Stratum lacunosum-moleculare
StrO	Stratum oriens
StrP	Stratum pyramidale
StrR	Stratum radiatum
TNF α	Tumornekrosefaktor α
vGAT	Vesikulärer GABA-Transporter
vGlut1	Vesikulärer Glutamat-Transporter 1
VIP	Vasoaktives Peptid
ZNS	Zentrales Nervensystem
5-HT3aR	5- Hydroxytryptamine Rezeptor -3a

6 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: NMDAR Autoimmunenzephalitis
- Abbildung 2: Der Aufbau, die Schichten und Interneurone des Hippokampus.
- Abbildung 3: Schematische Darstellung einer miniosmotischen Pumpe mit Schlauchsystem und Katheter.
- Abbildung 4: Position der Katheter und des hippokampalen Fensters.
- Abbildung 5: Implantation eines hippokampalen Fensters.
- Abbildung 6: Implantation der intraventrikulären Katheter.
- Abbildung 7: Zwei Photonen Mikroskopie.
- Abbildung 8: Bindungsmuster des NMDAR Autoantikörpers.
- Abbildung 9: Analyse SST-exprimierender Interneurone im Hippokampus.
- Abbildung 10: Typen dendritischer Dornen.
- Abbildung 11: Zunahme der Dornendichte und der Dichte der stummelförmigen Dornen auf Somatostatin-positiven inhibitorischen Interneurone in den CA1 und CA2 Regionen des Hippokampus im Mausmodell der NMDAR Autoimmunenzephalitis.
- Abbildung 12: Unveränderte Dichte und Dynamik dendritischer Dornen Somatostatin-exprimierender Interneurone in vivo.
- Abbildung 13: Mikrogliaaktivierung im Mausmodell der NMDAR Autoimmunenzephalitis.
- Abbildung 14: Abnahme der Internalisierung präsynaptischer exzitatorischer Fragmente durch Mikrogliazellen
- Abbildung 15: Unveränderte Trogozytose inhibitorischer präsynaptischer Fragmente durch Mikroglia

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zwei-Photonen Mikroskop	36
Tabelle 2: Konfokale Mikroskope	36
Tabelle 3: Objektive	36
Tabelle 4: Operationsgeräte	36
Tabelle 5: Operationszubehör	37
Tabelle 6: Verwendete Arzneimittel	37

8 Autorenbeiträge

S. Liebscher konzipierte den Studienaufbau, P. Svehla, S. Ehrt und A. Brauer führten die intraventrikulären Katheterimplantationen und die Gewebeentnahme für die *ex vivo* Analysen durch. A. Brauer führte die konfokalen Aufnahmen, die Datenanalyse und statistische Auswertung der strukturellen *ex vivo* Analyse von SST-Interneuronen durch, P. Svehla half bei der Errechnung der Dornendichten. A. Brauer führte die immunhistochemischen Färbungen, die konfokalen Aufnahmen, die Datenanalyse und statistische Auswertung der Mikroglia studie durch, S. Liebscher half bei der statistischen Auswertung. A. Brauer führte die strukturelle *in vivo* Studie von SST-Interneuronen durch, S. Liebscher half bei der Rohdatenprozessierung und statistischen Auswertung. A. Brauer und J. Fourneau führten die immunhistochemischen Färbungen für die Analyse synaptischer Elimination durch. J. Fourneau führte die konfokalen Aufnahmen, die Datenanalyse und die statistische Auswertung der Studie zur synaptischen Elimination durch.

9 Literaturverzeichnis

- Abboud, H., Probasco, J. C., Irani, S., Ances, B., Benavides, D. R., Bradshaw, M., Christo, P. P., Dale, R. C., Fernandez-Fournier, M., Flanagan, E. P., Gadoth, A., George, P., Grebenciucova, E., Jammoul, A., Lee, S. T., Li, Y., Matiello, M., Morse, A. M., Rae-Grant, A., Rojas, G., Rossman, I., Schmitt, S., Venkatesan, A., Vernino, S., Pittock, S. J., Titulaer, M. J., and Autoimmune Encephalitis Alliance Clinicians, N. (2021). "Autoimmune encephalitis: proposed best practice recommendations for diagnosis and acute management." *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 92(7), 757-768.
- Abiega, O., Beccari, S., Diaz-Aparicio, I., Nadjar, A., Laye, S., Leyrolle, Q., Gomez-Nicola, D., Domercq, M., Perez-Samartin, A., Sanchez-Zafra, V., Paris, I., Valero, J., Savage, J. C., Hui, C. W., Tremblay, M. E., Deudero, J. J., Brewster, A. L., Anderson, A. E., Zaldumbide, L., Galbarriatu, L., Marinas, A., Vivanco, M., Matute, C., Maletic-Savatic, M., Encinas, J. M., and Sierra, A. (2016). "Neuronal Hyperactivity Disturbs ATP Microgradients, Impairs Microglial Motility, and Reduces Phagocytic Receptor Expression Triggering Apoptosis/Microglial Phagocytosis Uncoupling." *PLoS Biol*, 14(5), e1002466.
- Akgul, G., and McBain, C. J. (2016). "Diverse roles for ionotropic glutamate receptors on inhibitory interneurons in developing and adult brain." *J Physiol*, 594(19), 5471-90.
- Akiyoshi, R., Wake, H., Kato, D., Horiuchi, H., Ono, R., Ikegami, A., Haruwaka, K., Omori, T., Tachibana, Y., Moorhouse, A. J., and Nabekura, J. (2018). "Microglia Enhance Synapse Activity to Promote Local Network Synchronization." *eNeuro*, 5(5).
- Al-Diwani, A., Handel, A., Townsend, L., Pollak, T., Leite, M. I., Harrison, P. J., Lennox, B. R., Okai, D., Manohar, S. G., and Irani, S. R. (2019). "The psychopathology of NMDAR-antibody encephalitis in adults: a systematic review and phenotypic analysis of individual patient data." *Lancet Psychiatry*, 6(3), 235-246.
- Allen, R. M., and Young, S. J. (1978). "Phencyclidine-induced psychosis." *Am J Psychiatry*, 135(9), 1081-4.
- Amaral, D. G., Dolorfo, C., and Alvarez-Royo, P. (1991). "Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat." *Hippocampus*, 1(4), 415-35.
- Amaral, D. G., and Witter, M. P. (1989). "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data." *Neuroscience*, 31(3), 571-91.
- Andoh, M., Shibata, K., Okamoto, K., Onodera, J., Morishita, K., Miura, Y., Ikegaya, Y., and Koyama, R. (2019). "Exercise Reverses Behavioral and Synaptic Abnormalities after Maternal Inflammation." *Cell Rep*, 27(10), 2817-2825 e5.
- Andrews-Zwilling, Y., Gillespie, A. K., Kravitz, A. V., Nelson, A. B., Devidze, N., Lo, I., Yoon, S. Y., Bien-Ly, N., Ring, K., Zwilling, D., Potter, G. B., Rubenstein, J. L., Kreitzer, A. C., and Huang, Y. (2012). "Hilar GABAergic interneuron activity controls spatial learning and memory retrieval." *PLoS One*, 7(7), e40555.
- Andrzejak, E., Rabinovitch, E., Kreye, J., Pruss, H., Rosenmund, C., Ziv, N. E., Garner, C. C., and Ackermann, F. (2022). "Patient-Derived Anti-NMDAR Antibody Disinhibits Cortical Neuronal Networks through Dysfunction of Inhibitory Neuron Output." *J Neurosci*, 42(15), 3253-3270.

- Anttila, J. E., Whitaker, K. W., Wires, E. S., Harvey, B. K., and Airavaara, M. (2017). "Role of microglia in ischemic focal stroke and recovery: focus on Toll-like receptors." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 79(Pt A), 3-14.
- Arellano, J. I., Benavides-Piccione, R., Defelipe, J., and Yuste, R. (2007). "Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies." *Front Neurosci*, 1(1), 131-43.
- Armangue, T., Leyboldt, F., Malaga, I., Raspall-Chaure, M., Marti, I., Nichter, C., Pugh, J., Vicente-Rasoamalala, M., Lafuente-Hidalgo, M., Macaya, A., Ke, M., Titulaer, M. J., Hoftberger, R., Sheriff, H., Glaser, C., and Dalmau, J. (2014). "Herpes simplex virus encephalitis is a trigger of brain autoimmunity." *Ann Neurol*, 75(2), 317-23.
- Armstrong, C., Krook-Magnuson, E., and Soltesz, I. (2012). "Neurogliaform and Ivy Cells: A Major Family of nNOS Expressing GABAergic Neurons." *Front Neural Circuits*, 6, 23.
- Armstrong, C., Szabadics, J., Tamas, G., and Soltesz, I. (2011). "Neurogliaform cells in the molecular layer of the dentate gyrus as feed-forward gamma-aminobutyric acidergic modulators of entorhinal-hippocampal interplay." *J Comp Neurol*, 519(8), 1476-91.
- Attardo, A., Fitzgerald, J. E., and Schnitzer, M. J. (2015). "Impermanence of dendritic spines in live adult CA1 hippocampus." *Nature*, 523(7562), 592-6.
- Badimon, A., Strasburger, H. J., Ayata, P., Chen, X., Nair, A., Ikegami, A., Hwang, P., Chan, A. T., Graves, S. M., Uweru, J. O., Ledderose, C., Kutlu, M. G., Wheeler, M. A., Kahan, A., Ishikawa, M., Wang, Y. C., Loh, Y. E., Jiang, J. X., Surmeier, D. J., Robson, S. C., Junger, W. G., Sebra, R., Calipari, E. S., Kenny, P. J., Eyo, U. B., Colonna, M., Quintana, F. J., Wake, H., Gradinaru, V., and Schaefer, A. (2020). "Negative feedback control of neuronal activity by microglia." *Nature*, 586(7829), 417-423.
- Ball, J. B., Green-Fulgham, S. M., and Watkins, L. R. (2022). "Mechanisms of microglia-mediated synapse turnover and synaptogenesis." *Prog Neurobiol*, 218, 102336.
- Baltaci, S. B., Mogulkoc, R., and Baltaci, A. K. (2019). "Molecular Mechanisms of Early and Late LTP." *Neurochem Res*, 44(2), 281-296.
- Barois, N., de Saint-Vis, B., Lebecque, S., Geuze, H. J., and Kleijmeer, M. J. (2002). "MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation." *Traffic*, 3(12), 894-905.
- Basilico, B., Pagani, F., Grimaldi, A., Cortese, B., Di Angelantonio, S., Weinhard, L., Gross, C., Limatola, C., Maggi, L., and Ragozzino, D. (2019). "Microglia shape presynaptic properties at developing glutamatergic synapses." *Glia*, 67(1), 53-67.
- Bear, M. F., and Malenka, R. C. (1994). "Synaptic plasticity: LTP and LTD." *Curr Opin Neurobiol*, 4(3), 389-99.
- Beierlein, M., Gibson, J. R., and Connors, B. W. (2000). "A network of electrically coupled interneurons drives synchronized inhibition in neocortex." *Nat Neurosci*, 3(9), 904-10.
- Belforte, J. E., Zsiros, V., Sklar, E. R., Jiang, Z., Yu, G., Li, Y., Quinlan, E. M., and Nakazawa, K. (2010). "Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes." *Nat Neurosci*, 13(1), 76-83.

- Bernal, F., Graus, F., Pifarre, A., Saiz, A., Benyahia, B., and Ribalta, T. (2002). "Immunohistochemical analysis of anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis." *Acta Neuropathol*, 103(5), 509-15.
- Berry, K. P., and Nedivi, E. (2017). "Spine Dynamics: Are They All the Same?" *Neuron*, 96(1), 43-55.
- Bezaire, M. J., and Soltesz, I. (2013). "Quantitative assessment of CA1 local circuits: knowledge base for interneuron-pyramidal cell connectivity." *Hippocampus*, 23(9), 751-85.
- Bien, C. G., Vincent, A., Barnett, M. H., Becker, A. J., Blumcke, I., Graus, F., Jellinger, K. A., Reuss, D. E., Ribalta, T., Schlegel, J., Sutton, I., Lassmann, H., and Bauer, J. (2012). "Immunopathology of autoantibody-associated encephalitides: clues for pathogenesis." *Brain*, 135(Pt 5), 1622-38.
- Bittner, K. C., Milstein, A. D., Grienberger, C., Romani, S., and Magee, J. C. (2017). "Behavioral time scale synaptic plasticity underlies CA1 place fields." *Science*, 357(6355), 1033-1036.
- Blazquez-Llorca, L., Hummel, E., Zimmerman, H., Zou, C., Burgold, S., Rietdorf, J., and Herms, J. (2015). "Correlation of two-photon in vivo imaging and FIB/SEM microscopy." *J Microsc*, 259(2), 129-136.
- Bliss, T. V., and Collingridge, G. L. (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." *Nature*, 361(6407), 31-9.
- Bliss, T. V., and Lomo, T. (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." *J Physiol*, 232(2), 331-56.
- Blumenthal, D. T., Salzman, K. L., Digre, K. B., Jensen, R. L., Dunson, W. A., and Dalmau, J. (2006). "Early pathologic findings and long-term improvement in anti-Ma2-associated encephalitis." *Neurology*, 67(1), 146-9.
- Booker, S. A., and Vida, I. (2018). "Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons." *Cell Tissue Res*, 373(3), 619-641.
- Booker, S. A., and Wyllie, D. J. A. (2021). "NMDA receptor function in inhibitory neurons." *Neuropharmacology*, 196, 108609.
- Born, G., Grayton, H. M., Langhorst, H., Dudanova, I., Rohlmann, A., Woodward, B. W., Collier, D. A., Fernandes, C., and Missler, M. (2015). "Genetic targeting of NRXN2 in mice unveils role in excitatory cortical synapse function and social behaviors." *Front Synaptic Neurosci*, 7, 3.
- Bourne, J., and Harris, K. M. (2007). "Do thin spines learn to be mushroom spines that remember?" *Curr Opin Neurobiol*, 17(3), 381-6.
- Buhl, E. H., Halasy, K., and Somogyi, P. (1994). "Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites." *Nature*, 368(6474), 823-8.
- Burgess, N., Maguire, E. A., and O'Keefe, J. (2002). "The human hippocampus and spatial and episodic memory." *Neuron*, 35(4), 625-41.
- Buzsaki, G. (1984). "Feed-forward inhibition in the hippocampal formation." *Prog Neurobiol*, 22(2), 131-53.
- Buzsaki, G., and Wang, X. J. (2012). "Mechanisms of gamma oscillations." *Annu Rev Neurosci*, 35, 203-25.
- Cannon, G. J., and Swanson, J. A. (1992). "The macrophage capacity for phagocytosis." *J Cell Sci*, 101 (Pt 4), 907-13.
- Ceanga, M., Rahmati, V., Haselmann, H., Schmidl, L., Hunter, D., Brauer, A. K., Liebscher, S., Kreye, J., Pruss, H., Groc, L., Hallermann, S., Dalmau, J., Ori, A.,

- Heckmann, M., and Geis, C. (2023). "Human NMDAR autoantibodies disrupt excitatory-inhibitory balance, leading to hippocampal network hypersynchrony." *Cell Rep*, 42(10), 113166.
- Chamberland, S., Grant, G., Machold, R., Nebet, E. R., Tian, G., Stich, J., Hanani, M., Kullander, K., and Tsien, R. W. (2024). "Functional specialization of hippocampal somatostatin-expressing interneurons." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 121(17), e2306382121.
- Chamberland, S., Nebet, E. R., Valero, M., Hanani, M., Egger, R., Larsen, S. B., Eyring, K. W., Buzsaki, G., and Tsien, R. W. (2023). "Brief synaptic inhibition persistently interrupts firing of fast-spiking interneurons." *Neuron*, 111(8), 1264-1281 e5.
- Chang, H., Ma, J., Feng, K., Feng, N., Wang, X., Sun, J., Guo, T., Wei, Y., Xu, Y., Wang, H., Yin, L., and Zhang, X. (2023). "Elevated blood and cerebrospinal fluid biomarkers of microglial activation and blood-brain barrier disruption in anti-NMDA receptor encephalitis." *J Neuroinflammation*, 20(1), 172.
- Charan, J., and Kantharia, N. D. (2013). "How to calculate sample size in animal studies?" *J Pharmacol Pharmacother*, 4(4), 303-6.
- Chauhan, P., Jethwa, K., Rathawa, A., Chauhan, G., and Mehra, S. (2021). "The Anatomy of the Hippocampus", in R. Pluta, (ed.), *Cerebral Ischemia*. Brisbane (AU).
- Chidambaram, S. B., Rathipriya, A. G., Bolla, S. R., Bhat, A., Ray, B., Mahalakshmi, A. M., Manivasagam, T., Thenmozhi, A. J., Essa, M. M., Guillemin, G. J., Chandra, R., and Sakharkar, M. K. (2019). "Dendritic spines: Revisiting the physiological role." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 92, 161-193.
- Chistiakov, D. A., Killingsworth, M. C., Myasoedova, V. A., Orekhov, A. N., and Bobryshev, Y. V. (2017). "CD68/macrosialin: not just a histochemical marker." *Lab Invest*, 97(1), 4-13.
- Choi, D. W., Koh, J. Y., and Peters, S. (1988). "Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists." *J Neurosci*, 8(1), 185-96.
- Chugh, D., and Ekdahl, C. T. (2016). "Interactions Between Microglia and Newly Formed Hippocampal Neurons in Physiological and Seizure-Induced Inflammatory Environment." *Brain Plast*, 1(2), 215-221.
- Colonna, M., and Butovsky, O. (2017). "Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration." *Annu Rev Immunol*, 35, 441-468.
- Comer, A. L., Jinadasa, T., Sriram, B., Phadke, R. A., Kretsge, L. N., Nguyen, T. P. H., Antognetti, G., Gilbert, J. P., Lee, J., Newmark, E. R., Hausmann, F. S., Rosenthal, S., Liu Kot, K., Liu, Y., Yen, W. W., Dejanovic, B., and Cruz-Martin, A. (2020). "Increased expression of schizophrenia-associated gene C4 leads to hypoconnectivity of prefrontal cortex and reduced social interaction." *PLoS Biol*, 18(1), e3000604.
- Cornejo, V. H., Ofer, N., and Yuste, R. (2022). "Voltage compartmentalization in dendritic spines in vivo." *Science*, 375(6576), 82-86.
- Cornell, J., Salinas, S., Huang, H. Y., and Zhou, M. (2022). "Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory." *Neural Regen Res*, 17(4), 705-716.
- Cornford, J. H., Mercier, M. S., Leite, M., Magloire, V., Hausser, M., and Kullmann, D. M. (2019). "Dendritic NMDA receptors in parvalbumin neurons enable strong and stable neuronal assemblies." *Elife*, 8.

- Coyle, J. T., Tsai, G., and Goff, D. (2003). "Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia." *Ann N Y Acad Sci*, 1003, 318-27.
- Dalmau, J. (2016). "NMDA receptor encephalitis and other antibody-mediated disorders of the synapse: The 2016 Cotzias Lecture." *Neurology*, 87(23), 2471-2482.
- Dalmau, J., Armangue, T., Planaguma, J., Radosevic, M., Mannara, F., Leypoldt, F., Geis, C., Lancaster, E., Titulaer, M. J., Rosenfeld, M. R., and Graus, F. (2019). "An update on anti-NMDA receptor encephalitis for neurologists and psychiatrists: mechanisms and models." *Lancet Neurol*, 18(11), 1045-1057.
- Dalmau, J., Gleichman, A. J., Hughes, E. G., Rossi, J. E., Peng, X., Lai, M., Dessain, S. K., Rosenfeld, M. R., Balice-Gordon, R., and Lynch, D. R. (2008). "Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies." *Lancet Neurol*, 7(12), 1091-8.
- Dalmau, J., Lancaster, E., Martinez-Hernandez, E., Rosenfeld, M. R., and Balice-Gordon, R. (2011). "Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis." *Lancet Neurol*, 10(1), 63-74.
- Dayananda, K. K., Ahmed, S., Wang, D., Polis, B., Islam, R., and Kaffman, A. (2023). "Early life stress impairs synaptic pruning in the developing hippocampus." *Brain Behav Immun*, 107, 16-31.
- Deller, T., Adelmann, G., Nitsch, R., and Frotscher, M. (1996). "The alvear pathway of the rat hippocampus." *Cell Tissue Res*, 286(3), 293-303.
- Denk, W., Strickler, J. H., and Webb, W. W. (1990). "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy." *Science*, 248(4951), 73-6.
- Derkach, V., Barria, A., and Soderling, T. R. (1999). "Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(6), 3269-74.
- Dupuis, J. P., Ladepeche, L., Seth, H., Bard, L., Varela, J., Mikasova, L., Bouchet, D., Rogemond, V., Honnorat, J., Hanse, E., and Groc, L. (2014). "Surface dynamics of GluN2B-NMDA receptors controls plasticity of maturing glutamate synapses." *EMBO J*, 33(8), 842-61.
- Dupuis, J. P., Nicole, O., and Groc, L. (2023). "NMDA receptor functions in health and disease: Old actor, new dimensions." *Neuron*, 111(15), 2312-2328.
- Engert, F., and Bonhoeffer, T. (1999). "Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity." *Nature*, 399(6731), 66-70.
- Erard, R., Luisada, P. V., and Peele, R. (1980). "The PCP psychosis: prolonged intoxication or drug-precipitated functional illness?" *J Psychedelic Drugs*, 12(3-4), 235-51.
- Fan, G., Ma, J., Ma, R., Suo, M., Chen, Y., Zhang, S., Zeng, Y., and Chen, Y. (2023). "Microglia Modulate Neurodevelopment in Autism Spectrum Disorder and Schizophrenia." *Int J Mol Sci*, 24(24).
- Feng, D., Huang, A., Yan, W., and Chen, D. (2019). "CD200 dysfunction in neuron contributes to synaptic deficits and cognitive impairment." *Biochem Biophys Res Commun*, 516(4), 1053-1059.
- Fernandez-Arroyo, B., Jurado, S., and Lerma, J. (2024). "Understanding OLM interneurons: Characterization, circuitry, and significance in memory and navigation." *Neuroscience*.

- Finke, C., Kopp, U. A., Pruss, H., Dalmau, J., Wandinger, K. P., and Ploner, C. J. (2012). "Cognitive deficits following anti-NMDA receptor encephalitis." *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83(2), 195-8.
- Fleischmann, T., Arras, M., Sauer, M., Saleh, L., Rulicke, T., and Jirkof, P. (2017). "Voluntary intake of paracetamol-enriched drinking water and its influence on the success of embryo transfer in mice." *Res Vet Sci*, 111, 85-92.
- Fogwe, L. A., Reddy, V., and Mesfin, F. B. (2023). "Neuroanatomy, Hippocampus", *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Fritschy, J. M. (2008). "Epilepsy, E/I Balance and GABA(A) Receptor Plasticity." *Front Mol Neurosci*, 1, 5.
- Ganeshina, O., Berry, R. W., Petralia, R. S., Nicholson, D. A., and Geinisman, Y. (2004). "Differences in the expression of AMPA and NMDA receptors between axospinous perforated and nonperforated synapses are related to the configuration and size of postsynaptic densities." *J Comp Neurol*, 468(1), 86-95.
- Garber, C., Soung, A., Vollmer, L. L., Kanmogne, M., Last, A., Brown, J., and Klein, R. S. (2019). "T cells promote microglia-mediated synaptic elimination and cognitive dysfunction during recovery from neuropathogenic flaviviruses." *Nat Neurosci*, 22(8), 1276-1288.
- Garcia-Serra, A., Radosevic, M., Pupak, A., Brito, V., Rios, J., Aguilar, E., Maudes, E., Arino, H., Spatola, M., Mannara, F., Pedreno, M., Joubert, B., Gines, S., Planaguma, J., and Dalmau, J. (2021). "Placental transfer of NMDAR antibodies causes reversible alterations in mice." *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 8(1).
- Geiller, T., Vancura, B., Terada, S., Troullinou, E., Chavlis, S., Tsagkatakis, G., Tsakalides, P., Ocsai, K., Poirazi, P., Rozsa, B. J., and Losonczy, A. (2020). "Large-Scale 3D Two-Photon Imaging of Molecularly Identified CA1 Interneuron Dynamics in Behaving Mice." *Neuron*, 108(5), 968-983 e9.
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., and Gage, F. H. (2010). "Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration." *Cell*, 140(6), 918-34.
- Gleichman, A. J., Spruce, L. A., Dalmau, J., Seeholzer, S. H., and Lynch, D. R. (2012). "Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the GluN1 amino terminal domain." *J Neurosci*, 32(32), 11082-94.
- Golia, M. T., Poggini, S., Alboni, S., Garofalo, S., Ciano Albanese, N., Viglione, A., Ajmone-Cat, M. A., St-Pierre, A., Brunello, N., Limatola, C., Branchi, I., and Maggi, L. (2019). "Interplay between inflammation and neural plasticity: Both immune activation and suppression impair LTP and BDNF expression." *Brain Behav Immun*, 81, 484-494.
- Gonzalez-Burgos, G., Hashimoto, T., and Lewis, D. A. (2010). "Alterations of cortical GABA neurons and network oscillations in schizophrenia." *Curr Psychiatry Rep*, 12(4), 335-44.
- Goto, A. (2022). "Synaptic plasticity during systems memory consolidation." *Neurosci Res*, 183, 1-6.
- Gramuntell, Y., Klimczak, P., Coviello, S., Perez-Rando, M., and Nacher, J. (2021). "Effects of Aging on the Structure and Expression of NMDA Receptors of Somatostatin Expressing Neurons in the Mouse Hippocampus." *Front Aging Neurosci*, 13, 782737.

- Gray, E. G. (1959). "Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study." *J Anat*, 93(Pt 4), 420-33.
- Gribkova, E. D., and Gillette, R. (2021). "Role of NMDAR plasticity in a computational model of synaptic memory." *Sci Rep*, 11(1), 21182.
- Grunze, H. C., Rainnie, D. G., Hasselmo, M. E., Barkai, E., Hearn, E. F., McCarley, R. W., and Greene, R. W. (1996). "NMDA-dependent modulation of CA1 local circuit inhibition." *J Neurosci*, 16(6), 2034-43.
- Gu, L., Kleiber, S., Schmid, L., Nebeling, F., Chamoun, M., Steffen, J., Wagner, J., and Fuhrmann, M. (2014). "Long-term in vivo imaging of dendritic spines in the hippocampus reveals structural plasticity." *J Neurosci*, 34(42), 13948-53.
- Guasp, M., Rosa-Justicia, M., Munoz-Lopetegi, A., Martinez-Hernandez, E., Armangue, T., Sugranyes, G., Stein, H., Borrás, R., Prades, L., Arino, H., Planaguma, J., De-La-Serna, E., Escudero, D., Llufríu, S., Sánchez-Valle, R., Santamaria, J., Compte, A., Castro-Fornieles, J., Dalmau, J., and Spanish anti, N. E. S. G. (2022). "Clinical characterisation of patients in the post-acute stage of anti-NMDA receptor encephalitis: a prospective cohort study and comparison with patients with schizophrenia spectrum disorders." *Lancet Neurol*, 21(10), 899-910.
- Guet-McCreight, A., Skinner, F. K., and Topolnik, L. (2020). "Common Principles in Functional Organization of VIP/Calretinin Cell-Driven Disinhibitory Circuits Across Cortical Areas." *Front Neural Circuits*, 14, 32.
- Guirado, R., Perez-Rando, M., Sanchez-Matarredona, D., Castillo-Gomez, E., Liberia, T., Rovira-Esteban, L., Varea, E., Crespo, C., Blasco-Ibanez, J. M., and Nacher, J. (2014). "The dendritic spines of interneurons are dynamic structures influenced by PSA-NCAM expression." *Cereb Cortex*, 24(11), 3014-24.
- Gulyas, A. I., Hajos, N., and Freund, T. F. (1996). "Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus." *J Neurosci*, 16(10), 3397-411.
- Gulyas, A. I., Miettinen, R., Jacobowitz, D. M., and Freund, T. F. (1992). "Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus--I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fibre system." *Neuroscience*, 48(1), 1-27.
- Gunner, G., Cheadle, L., Johnson, K. M., Ayata, P., Badimon, A., Mondo, E., Nagy, M. A., Liu, L., Bemiller, S. M., Kim, K. W., Lira, S. A., Lamb, B. T., Tapper, A. R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Schaefer, A., and Schafer, D. P. (2019). "Sensory lesioning induces microglial synapse elimination via ADAM10 and fractalkine signaling." *Nat Neurosci*, 22(7), 1075-1088.
- Györffy, B. A., Kun, J., Torok, G., Bulyaki, E., Borhegyi, Z., Gulyassy, P., Kis, V., Szocsics, P., Micsonai, A., Matko, J., Drahos, L., Juhasz, G., Kekesi, K. A., and Kardos, J. (2018). "Local apoptotic-like mechanisms underlie complement-mediated synaptic pruning." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(24), 6303-6308.
- Haidar, M. A., Ibeh, S., Shakkour, Z., Reslan, M. A., Nwaiwu, J., Moqidem, Y. A., Sader, G., Nickles, R. G., Babale, I., Jaffa, A. A., Salama, M., Shaito, A., and Kobeissy, F. (2022). "Crosstalk between Microglia and Neurons in Neurotrauma: An Overview of the Underlying Mechanisms." *Curr Neuroparmacol*, 20(11), 2050-2065.
- Halasy, K., Buhl, E. H., Lorinczi, Z., Tamas, G., and Somogyi, P. (1996). "Synaptic target selectivity and input of GABAergic basket and bistratified interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus." *Hippocampus*, 6(3), 306-29.
- Hanada, T. (2020). "Ionotropic Glutamate Receptors in Epilepsy: A Review Focusing on AMPA and NMDA Receptors." *Biomolecules*, 10(3).

- Hansen, K. B., Wollmuth, L. P., Bowie, D., Furukawa, H., Menniti, F. S., Sobolevsky, A. I., Swanson, G. T., Swanger, S. A., Greger, I. H., Nakagawa, T., McBain, C. J., Jayaraman, V., Low, C. M., Dell'Acqua, M. L., Diamond, J. S., Camp, C. R., Perszyk, R. E., Yuan, H., and Traynelis, S. F. (2021). "Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels." *Pharmacol Rev*, 73(4), 298-487.
- Hansen, K. B., Yi, F., Perszyk, R. E., Furukawa, H., Wollmuth, L. P., Gibb, A. J., and Traynelis, S. F. (2018). "Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors." *J Gen Physiol*, 150(8), 1081-1105.
- Hardingham, G. E., and Bading, H. (2010). "Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders." *Nat Rev Neurosci*, 11(10), 682-96.
- Harris, A. C., Jin, X. T., Greer, J. E., Povlishock, J. T., and Jacobs, K. M. (2022). "Somatostatin interneurons exhibit enhanced functional output and resilience to axotomy after mild traumatic brain injury." *Neurobiol Dis*, 171, 105801.
- Harris, K. M., Jensen, F. E., and Tsao, B. (1992). "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), 2685-705.
- Harrison, P. J., and Owen, M. J. (2003). "Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications." *Lancet*, 361(9355), 417-9.
- Hashimoto, T., Bazmi, H. H., Mirnics, K., Wu, Q., Sampson, A. R., and Lewis, D. A. (2008). "Conserved regional patterns of GABA-related transcript expression in the neocortex of subjects with schizophrenia." *Am J Psychiatry*, 165(4), 479-89.
- Havekes, R., Park, A. J., Tudor, J. C., Luczak, V. G., Hansen, R. T., Ferri, S. L., Bruinenberg, V. M., Poplawski, S. G., Day, J. P., Aton, S. J., Radwanska, K., Meerlo, P., Houslay, M. D., Baillie, G. S., and Abel, T. (2016). "Sleep deprivation causes memory deficits by negatively impacting neuronal connectivity in hippocampal area CA1." *Elife*, 5.
- Hayashi, Y. (2022). "Molecular mechanism of hippocampal long-term potentiation - Towards multiscale understanding of learning and memory." *Neurosci Res*, 175, 3-15.
- Hayashi, Y., Shi, S. H., Esteban, J. A., Piccini, A., Poncer, J. C., and Malinow, R. (2000). "Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction." *Science*, 287(5461), 2262-7.
- Haynes, S. E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M. E., Gan, W. B., and Julius, D. (2006). "The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides." *Nat Neurosci*, 9(12), 1512-9.
- Heindl, S., Gesierich, B., Benakis, C., Llovera, G., Duering, M., and Liesz, A. (2018). "Automated Morphological Analysis of Microglia After Stroke." *Front Cell Neurosci*, 12, 106.
- Heine, J., Kopp, U. A., Klag, J., Ploner, C. J., Pruss, H., and Finke, C. (2021). "Long-Term Cognitive Outcome in Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis." *Ann Neurol*, 90(6), 949-961.
- Helm, M. S., Dankovich, T. M., Mandad, S., Rammner, B., Jahne, S., Salimi, V., Koerbs, C., Leibrandt, R., Urlaub, H., Schikorski, T., and Rizzoli, S. O. (2021). "A large-scale nanoscopy and biochemistry analysis of postsynaptic dendritic spines." *Nat Neurosci*, 24(8), 1151-1162.

- Helmchen, F., and Denk, W. (2005). "Deep tissue two-photon microscopy." *Nat Methods*, 2(12), 932-40.
- Hernangomez, M., Mestre, L., Correa, F. G., Loria, F., Mecha, M., Inigo, P. M., Docagne, F., Williams, R. O., Borrell, J., and Guaza, C. (2012). "CD200-CD200R1 interaction contributes to neuroprotective effects of anandamide on experimentally induced inflammation." *Glia*, 60(9), 1437-50.
- Holtmaat, A. J., Trachtenberg, J. T., Wilbrecht, L., Shepherd, G. M., Zhang, X., Knott, G. W., and Svoboda, K. (2005). "Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo." *Neuron*, 45(2), 279-91.
- Homayoun, H., and Moghaddam, B. (2007). "NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons." *J Neurosci*, 27(43), 11496-500.
- Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K. M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B. A., Lemere, C. A., Selkoe, D. J., and Stevens, B. (2016). "Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models." *Science*, 352(6286), 712-716.
- Honore, E., Khlaifia, A., Bosson, A., and Lacaille, J. C. (2021). "Hippocampal Somatostatin Interneurons, Long-Term Synaptic Plasticity and Memory." *Front Neural Circuits*, 15, 687558.
- Hoshino, K., Hasegawa, K., Kamiya, H., and Morimoto, Y. (2017). "Synapse-specific effects of IL-1beta on long-term potentiation in the mouse hippocampus." *Biomed Res*, 38(3), 183-188.
- Huang, Q., Xie, Y., Hu, Z., and Tang, X. (2020). "Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: A review of pathogenic mechanisms, treatment, prognosis." *Brain Res*, 1727, 146549.
- Hughes, E. G., Peng, X., Gleichman, A. J., Lai, M., Zhou, L., Tsou, R., Parsons, T. D., Lynch, D. R., Dalmau, J., and Balice-Gordon, R. J. (2010). "Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis." *J Neurosci*, 30(17), 5866-75.
- Hunter, D., Jamet, Z., and Groc, L. (2021). "Autoimmunity and NMDA receptor in brain disorders: Where do we stand?" *Neurobiol Dis*, 147, 105161.
- Imai, Y., Ibata, I., Ito, D., Ohsawa, K., and Kohsaka, S. (1996). "A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage." *Biochem Biophys Res Commun*, 224(3), 855-62.
- Jackson, M. E., Homayoun, H., and Moghaddam, B. (2004). "NMDA receptor hypofunction produces concomitant firing rate potentiation and burst activity reduction in the prefrontal cortex." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(22), 8467-72.
- Jawaid, S., Kidd, G. J., Wang, J., Swetlik, C., Dutta, R., and Trapp, B. D. (2018). "Alterations in CA1 hippocampal synapses in a mouse model of fragile X syndrome." *Glia*, 66(4), 789-800.
- Jeon, S. W., and Kim, Y. K. (2023). "Neuron-Microglia Crosstalk in Neuropsychiatric Disorders." *Adv Exp Med Biol*, 1411, 3-15.
- Jurek, B., Chayka, M., Kreye, J., Lang, K., Kraus, L., Fidzinski, P., Kornau, H. C., Dao, L. M., Wenke, N. K., Long, M., Rivalan, M., Winter, Y., Leubner, J., Herken, J., Mayer, S., Mueller, S., Boehm-Sturm, P., Dirnagl, U., Schmitz, D., Kolch, M., and Pruss, H. (2019). "Human gestational N-methyl-d-aspartate receptor autoantibodies impair neonatal murine brain function." *Ann Neurol*, 86(5), 656-670.

- Kabir, M. T., Sufian, M. A., Uddin, M. S., Begum, M. M., Akhter, S., Islam, A., Mathew, B., Islam, M. S., Amran, M. S., and Md Ashraf, G. (2019). "NMDA Receptor Antagonists: Repositioning of Memantine as a Multitargeting Agent for Alzheimer's Therapy." *Curr Pharm Des*, 25(33), 3506-3518.
- Kandel, E. R., Dudai, Y., and Mayford, M. R. (2014). "The molecular and systems biology of memory." *Cell*, 157(1), 163-86.
- Karnani, M. M., Agetsuma, M., and Yuste, R. (2014). "A blanket of inhibition: functional inferences from dense inhibitory connectivity." *Curr Opin Neurobiol*, 26, 96-102.
- Karnani, M. M., Jackson, J., Ayzenshtat, I., Hamzehei Sichani, A., Manoocheri, K., Kim, S., and Yuste, R. (2016). "Opening Holes in the Blanket of Inhibition: Localized Lateral Disinhibition by VIP Interneurons." *J Neurosci*, 36(12), 3471-80.
- Katona, I., Acsady, L., and Freund, T. F. (1999). "Postsynaptic targets of somatostatin-immunoreactive interneurons in the rat hippocampus." *Neuroscience*, 88(1), 37-55.
- Kelsch, W., Li, Z., Wieland, S., Senkov, O., Herb, A., Gongrich, C., and Monyer, H. (2014). "GluN2B-containing NMDA receptors promote glutamate synapse development in hippocampal interneurons." *J Neurosci*, 34(48), 16022-30.
- Kim, A., Garcia-Garcia, E., Straccia, M., Comella-Bolla, A., Miguez, A., Masana, M., Alberch, J., Canals, J. M., and Rodriguez, M. J. (2020). "Reduced Fractalkine Levels Lead to Striatal Synaptic Plasticity Deficits in Huntington's Disease." *Front Cell Neurosci*, 14, 163.
- Kim, H. J., Cho, M. H., Shim, W. H., Kim, J. K., Jeon, E. Y., Kim, D. H., and Yoon, S. Y. (2017). "Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects." *Mol Psychiatry*, 22(11), 1576-1584.
- Klausberger, T., Marton, L. F., O'Neill, J., Huck, J. H., Dalezios, Y., Fuentealba, P., Suen, W. Y., Papp, E., Kaneko, T., Watanabe, M., Csicsvari, J., and Somogyi, P. (2005). "Complementary roles of cholecystokinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations." *J Neurosci*, 25(42), 9782-93.
- Knierim, J. J. (2015). "The hippocampus." *Curr Biol*, 25(23), R1116-21.
- Koch, H., Niturad, C. E., Theiss, S., Bien, C. G., Elger, C., Wandinger, K. P., Vincent, A., Malter, M., Kortvelyessy, P., Lerche, H., and Dihne, M. (2019). "In vitro neuronal network activity as a new functional diagnostic system to detect effects of Cerebrospinal fluid from autoimmune encephalitis patients." *Sci Rep*, 9(1), 5591.
- Koh, M. T., Spiegel, A. M., and Gallagher, M. (2014). "Age-associated changes in hippocampal-dependent cognition in Diversity Outbred mice." *Hippocampus*, 24(11), 1300-7.
- Kosaka, T., Wu, J. Y., and Benoit, R. (1988). "GABAergic neurons containing somatostatin-like immunoreactivity in the rat hippocampus and dentate gyrus." *Exp Brain Res*, 71(2), 388-98.
- Kosenkov, A. M., Maiorov, S. A., and Gaidin, S. G. (2024). "Astrocytic NMDA Receptors." *Biochemistry (Mosc)*, 89(6), 1045-1060.
- Kreye, J., Wenke, N. K., Chayka, M., Leubner, J., Murugan, R., Maier, N., Jurek, B., Ly, L. T., Brandl, D., Rost, B. R., Stumpf, A., Schulz, P., Radbruch, H., Hauser, A. E., Pache, F., Meisel, A., Harms, L., Paul, F., Dirnagl, U., Garner, C., Schmitz, D., Wardemann, H., and Pruss, H. (2016). "Human cerebrospinal fluid monoclonal

- N-methyl-D-aspartate receptor autoantibodies are sufficient for encephalitis pathogenesis." *Brain*, 139(Pt 10), 2641-2652.
- Kullmann, D. M., and Lamsa, K. P. (2007). "Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons." *Nat Rev Neurosci*, 8(9), 687-99.
- Kwon, H. S., and Koh, S. H. (2020). "Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes." *Transl Neurodegener*, 9(1), 42.
- Ladagu, A. D., Olopade, F. E., Adejare, A., and Olopade, J. O. (2023). "GluN2A and GluN2B N-Methyl-D-Aspartate Receptor (NMDARs) Subunits: Their Roles and Therapeutic Antagonists in Neurological Diseases." *Pharmaceuticals (Basel)*, 16(11).
- Lane, H. Y., Wang, S. H., and Lin, C. H. (2023). "Differential relationships of NMDAR hypofunction and oxidative stress with cognitive decline." *Psychiatry Res*, 326, 115288.
- Le Roux, N., Cabezas, C., Bohm, U. L., and Poncer, J. C. (2013). "Input-specific learning rules at excitatory synapses onto hippocampal parvalbumin-expressing interneurons." *J Physiol*, 591(7), 1809-22.
- Leao, R. N., Mikulovic, S., Leao, K. E., Munguba, H., Gezelius, H., Enjin, A., Patra, K., Eriksson, A., Loew, L. M., Tort, A. B., and Kullander, K. (2012). "OLM interneurons differentially modulate CA3 and entorhinal inputs to hippocampal CA1 neurons." *Nat Neurosci*, 15(11), 1524-30.
- Lee, J., Park, J., Jeong, M., Oh, S. J., Yoon, J. H., and Oh, Y. S. (2024). "Anatomical topology of extrahippocampal projections from dorsoventral CA pyramidal neurons in mice." *Front Neuroanat*, 18, 1421034.
- Lee, K. F., Soares, C., and Beique, J. C. (2012). "Examining form and function of dendritic spines." *Neural Plast*, 2012, 704103.
- Lee, S., Hjerling-Leffler, J., Zagha, E., Fishell, G., and Rudy, B. (2010). "The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors." *J Neurosci*, 30(50), 16796-808.
- Lester, R. A., Clements, J. D., Westbrook, G. L., and Jahr, C. E. (1990). "Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents." *Nature*, 346(6284), 565-7.
- Lewis, D. A. (2009). "Neuroplasticity of excitatory and inhibitory cortical circuits in schizophrenia." *Dialogues Clin Neurosci*, 11(3), 269-80.
- Lewis, D. A. (2014). "Inhibitory neurons in human cortical circuits: substrate for cognitive dysfunction in schizophrenia." *Curr Opin Neurobiol*, 26, 22-6.
- Lewis, D. A., Hashimoto, T., and Volk, D. W. (2005). "Cortical inhibitory neurons and schizophrenia." *Nat Rev Neurosci*, 6(4), 312-24.
- Li, J., Cheng, X. Y., Yang, H., Li, L., Niu, Y., Yu, J. Q., Li, W. Q., and Yao, Y. (2020). "Matrine ameliorates cognitive deficits via inhibition of microglia mediated neuroinflammation in an Alzheimer's disease mouse model." *Pharmazie*, 75(7), 344-347.
- Li, Q., and Barres, B. A. (2018). "Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease." *Nat Rev Immunol*, 18(4), 225-242.
- Lim, L., Mi, D., Llorca, A., and Marin, O. (2018). "Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons." *Neuron*, 100(2), 294-313.
- Lin, L. C., and Sibille, E. (2013). "Reduced brain somatostatin in mood disorders: a common pathophysiological substrate and drug target?" *Front Pharmacol*, 4, 110.

- Liu, J., Chang, L., Song, Y., Li, H., and Wu, Y. (2019). "The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease." *Front Neurosci*, 13, 43.
- Liu, N., Wang, Y., An, A. Y., Banker, C., Qian, Y. H., and O'Donnell, J. M. (2020). "Single housing-induced effects on cognitive impairment and depression-like behavior in male and female mice involve neuroplasticity-related signaling." *Eur J Neurosci*, 52(1), 2694-2704.
- Liu, Y. J., Spangenberg, E. E., Tang, B., Holmes, T. C., Green, K. N., and Xu, X. (2021). "Microglia Elimination Increases Neural Circuit Connectivity and Activity in Adult Mouse Cortex." *J Neurosci*, 41(6), 1274-1287.
- Liu, Y. Q., Yu, F., Liu, W. H., He, X. H., and Peng, B. W. (2014). "Dysfunction of hippocampal interneurons in epilepsy." *Neurosci Bull*, 30(6), 985-998.
- Lovett-Barron, M., Turi, G. F., Kaifosh, P., Lee, P. H., Bolze, F., Sun, X. H., Nicoud, J. F., Zemelman, B. V., Sternson, S. M., and Losonczy, A. (2012). "Regulation of neuronal input transformations by tunable dendritic inhibition." *Nat Neurosci*, 15(3), 423-30, S1-3.
- Luby, E. D., Cohen, B. D., Rosenbaum, G., Gottlieb, J. S., and Kelley, R. (1959). "Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl." *AMA Arch Neurol Psychiatry*, 81(3), 363-9.
- Luo, X., Guet-McCreight, A., Villette, V., Francavilla, R., Marino, B., Chamberland, S., Skinner, F. K., and Topolnik, L. (2020). "Synaptic Mechanisms Underlying the Network State-Dependent Recruitment of VIP-Expressing Interneurons in the CA1 Hippocampus." *Cereb Cortex*, 30(6), 3667-3685.
- Lyketsos, C. G., Carrillo, M. C., Ryan, J. M., Khachaturian, A. S., Trzepacz, P., Amatniek, J., Cedarbaum, J., Brashear, R., and Miller, D. S. (2011). "Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement*, 7(5), 532-9.
- Lynch, D. R., Rattelle, A., Dong, Y. N., Roslin, K., Gleichman, A. J., and Panzer, J. A. (2018). "Anti-NMDA Receptor Encephalitis: Clinical Features and Basic Mechanisms." *Adv Pharmacol*, 82, 235-260.
- Lyu, J., Nagarajan, R., Kambali, M., Wang, M., and Rudolph, U. (2023). "Selective inhibition of somatostatin-positive dentate hilar interneurons induces age-related cellular changes and cognitive dysfunction." *PNAS Nexus*, 2(5), pgad134.
- Ma, Y. N., Sun, Y. X., Wang, T., Wang, H., Zhang, Y., Su, Y. A., Li, J. T., and Si, T. M. (2020). "Subchronic MK-801 treatment during adolescence induces long-term, not permanent, excitatory-inhibitory imbalance in the rat hippocampus." *Eur J Pharmacol*, 867, 172807.
- Maccaferri, G., Roberts, J. D., Szucs, P., Cottingham, C. A., and Somogyi, P. (2000). "Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro." *J Physiol*, 524 Pt 1(Pt 1), 91-116.
- MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., and Barker, J. L. (1986). "NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones." *Nature*, 321(6069), 519-22.
- Magee, J. C. (2000). "Dendritic integration of excitatory synaptic input." *Nat Rev Neurosci*, 1(3), 181-90.
- Magee, J. C., and Grienberger, C. (2020). "Synaptic Plasticity Forms and Functions." *Annu Rev Neurosci*, 43, 95-117.
- Malenka, R. C., and Bear, M. F. (2004). "LTP and LTD: an embarrassment of riches." *Neuron*, 44(1), 5-21.

- Maletic-Savatic, M., Malinow, R., and Svoboda, K. (1999). "Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity." *Science*, 283(5409), 1923-7.
- Malviya, M., Barman, S., Golombeck, K. S., Planaguma, J., Mannara, F., Strutz-Seebohm, N., Wrzos, C., Demir, F., Baksmeier, C., Steckel, J., Falk, K. K., Gross, C. C., Kovac, S., Bonte, K., Johnen, A., Wandinger, K. P., Martin-Garcia, E., Becker, A. J., Elger, C. E., Klocker, N., Wiendl, H., Meuth, S. G., Hartung, H. P., Seebohm, G., Leypoldt, F., Maldonado, R., Stadelmann, C., Dalmau, J., Melzer, N., and Goebels, N. (2017). "NMDAR encephalitis: passive transfer from man to mouse by a recombinant antibody." *Ann Clin Transl Neurol*, 4(11), 768-783.
- Manto, M., Dalmau, J., Didelot, A., Rogemond, V., and Honnorat, J. (2010). "In vivo effects of antibodies from patients with anti-NMDA receptor encephalitis: further evidence of synaptic glutamatergic dysfunction." *Orphanet J Rare Dis*, 5, 31.
- Martinez-Hernandez, E., Horvath, J., Shiloh-Malawsky, Y., Sangha, N., Martinez-Lage, M., and Dalmau, J. (2011). "Analysis of complement and plasma cells in the brain of patients with anti-NMDAR encephalitis." *Neurology*, 77(6), 589-93.
- Mathern, G. W., Babb, T. L., Pretorius, J. K., and Leite, J. P. (1995). "Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata." *J Neurosci*, 15(5 Pt 2), 3990-4004.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C., and Kasai, H. (2004). "Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines." *Nature*, 429(6993), 761-6.
- Matta, J. A., Pelkey, K. A., Craig, M. T., Chittajallu, R., Jeffries, B. W., and McBain, C. J. (2013). "Developmental origin dictates interneuron AMPA and NMDA receptor subunit composition and plasticity." *Nat Neurosci*, 16(8), 1032-41.
- Mayer, M. L., and Westbrook, G. L. (1987). "Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones." *J Physiol*, 394, 501-27.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., and Guthrie, P. B. (1984). "Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones." *Nature*, 309(5965), 261-3.
- McCutcheon, R. A., Reis Marques, T., and Howes, O. D. (2020). "Schizophrenia-An Overview." *JAMA Psychiatry*, 77(2), 201-210.
- McKinney, R. A., Capogna, M., Durr, R., Gähwiler, B. H., and Thompson, S. M. (1999). "Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation." *Nat Neurosci*, 2(1), 44-9.
- Megias, M., Emri, Z., Freund, T. F., and Gulyas, A. I. (2001). "Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells." *Neuroscience*, 102(3), 527-40.
- Meng, J., Han, L., Zheng, N., Wang, T., Xu, H., Jiang, Y., Wang, Z., Liu, Z., Zheng, Q., Zhang, X., Luo, H., Can, D., Lu, J., Xu, H., and Zhang, Y. W. (2022). "Microglial Tmem59 Deficiency Impairs Phagocytosis of Synapse and Leads to Autism-Like Behaviors in Mice." *J Neurosci*, 42(25), 4958-4979.
- Mikasova, L., De Rossi, P., Bouchet, D., Georges, F., Rogemond, V., Didelot, A., Meissirel, C., Honnorat, J., and Groc, L. (2012). "Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis." *Brain*, 135(Pt 5), 1606-21.
- Miles, R. (1990). "Synaptic excitation of inhibitory cells by single CA3 hippocampal pyramidal cells of the guinea-pig in vitro." *J Physiol*, 428, 61-77.

- Miles, R., Toth, K., Gulyas, A. I., Hajos, N., and Freund, T. F. (1996). "Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus." *Neuron*, 16(4), 815-23.
- Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A. W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., Koizumi, S., Moorhouse, A. J., Yoshimura, Y., and Nabekura, J. (2016). "Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex." *Nat Commun*, 7, 12540.
- Mony, L., and Paoletti, P. (2023). "Mechanisms of NMDA receptor regulation." *Curr Opin Neurobiol*, 83, 102815.
- Morris, R. G. (1989). "Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5." *J Neurosci*, 9(9), 3040-57.
- Moscato, E. H., Peng, X., Jain, A., Parsons, T. D., Dalmau, J., and Balice-Gordon, R. J. (2014). "Acute mechanisms underlying antibody effects in anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis." *Ann Neurol*, 76(1), 108-19.
- Nagarajan, R., Lyu, J., Kambali, M., Wang, M., Courtney, C. D., Christian-Hinman, C. A., and Rudolph, U. (2024). "Genetic Ablation of Dentate Hilar Somatostatin-Positive GABAergic Interneurons is Sufficient to Induce Cognitive Impairment." *Mol Neurobiol*, 61(2), 567-580.
- Nakahara, S., Matsumoto, M., Ito, H., and Tajinda, K. (2018). "Ectopic Mossy Fiber Pathfinding in the Hippocampus Caused the Abnormal Neuronal Transmission in the Mouse Models of Psychiatric Disease." *Biol Pharm Bull*, 41(1), 138-141.
- Nakazawa, K., and Sapkota, K. (2020). "The origin of NMDA receptor hypofunction in schizophrenia." *Pharmacol Ther*, 205, 107426.
- Nasyrova, R. F., Khasanova, A. K., Altynbekov, K. S., Asadullin, A. R., Markina, E. A., Gayduk, A. J., Shipulin, G. A., Petrova, M. M., and Shnayder, N. A. (2022). "The Role of D-Serine and D-Aspartate in the Pathogenesis and Therapy of Treatment-Resistant Schizophrenia." *Nutrients*, 14(23).
- Nayak, D., Roth, T. L., and McGavern, D. B. (2014). "Microglia development and function." *Annu Rev Immunol*, 32, 367-402.
- Nguyen, L., and Wang, C. (2023). "Anti-NMDA Receptor Autoimmune Encephalitis: Diagnosis and Management Strategies." *Int J Gen Med*, 16, 7-21.
- Nicoll, R. A., and Schulman, H. (2023). "Synaptic memory and CaMKII." *Physiol Rev*, 103(4), 2877-2925.
- Nicolle, D. C. M., and Moses, J. L. (2018). "A Systematic Review of the Neuropsychological Sequelae of People Diagnosed with Anti N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis in the Acute and Chronic Phases." *Arch Clin Neuropsychol*, 33(8), 964-983.
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., and Svoboda, K. (2002). "Structure and function of dendritic spines." *Annu Rev Physiol*, 64, 313-53.
- Norris, G. T., Smirnov, I., Filiano, A. J., Shadowen, H. M., Cody, K. R., Thompson, J. A., Harris, T. H., Gaultier, A., Overall, C. C., and Kipnis, J. (2018). "Neuronal integrity and complement control synaptic material clearance by microglia after CNS injury." *J Exp Med*, 215(7), 1789-1801.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbert, A., and Prochiantz, A. (1984). "Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones." *Nature*, 307(5950), 462-5.
- Nyiri, G., Stephenson, F. A., Freund, T. F., and Somogyi, P. (2003). "Large variability in synaptic N-methyl-D-aspartate receptor density on interneurons and a

- comparison with pyramidal-cell spines in the rat hippocampus." *Neuroscience*, 119(2), 347-63.
- Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., and Kohsaka, S. (2004). "Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity." *J Neurochem*, 88(4), 844-56.
- Oliva, A. A., Jr., Jiang, M., Lam, T., Smith, K. L., and Swann, J. W. (2000). "Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons." *J Neurosci*, 20(9), 3354-68.
- Olney, J. W. (1969). "Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate." *Science*, 164(3880), 719-21.
- Pagano, J., Giona, F., Beretta, S., Verpelli, C., and Sala, C. (2021). "N-methyl-d-aspartate receptor function in neuronal and synaptic development and signaling." *Curr Opin Pharmacol*, 56, 93-101.
- Palop, J. J., Chin, J., Roberson, E. D., Wang, J., Thwin, M. T., Bien-Ly, N., Yoo, J., Ho, K. O., Yu, G. Q., Kreitzer, A., Finkbeiner, S., Noebels, J. L., and Mucke, L. (2007). "Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease." *Neuron*, 55(5), 697-711.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A., and North, R. A. (2006). "Vesicular release of ATP at central synapses." *Pflugers Arch*, 452(5), 589-97.
- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). "NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease." *Nat Rev Neurosci*, 14(6), 383-400.
- Paolicelli, R. C., Bolascho, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., and Gross, C. T. (2011). "Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development." *Science*, 333(6048), 1456-8.
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M. E., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Brone, B., Brown, G. C., Butovsky, O., Carson, M. J., Castellano, B., Colonna, M., Cowley, S. A., Cunningham, C., Davalos, D., De Jager, P. L., de Strooper, B., Denes, A., Eggen, B. J. L., Eyo, U., Galea, E., Garel, S., Ginhoux, F., Glass, C. K., Gokce, O., Gomez-Nicola, D., Gonzalez, B., Gordon, S., Graeber, M. B., Greenhalgh, A. D., Gressens, P., Greter, M., Gutmann, D. H., Haass, C., Heneka, M. T., Heppner, F. L., Hong, S., Hume, D. A., Jung, S., Kettenmann, H., Kipnis, J., Koyama, R., Lemke, G., Lynch, M., Majewska, A., Malcangio, M., Malm, T., Mancuso, R., Masuda, T., Matteoli, M., McColl, B. W., Miron, V. E., Molofsky, A. V., Monje, M., Mracsko, E., Nadjar, A., Neher, J. J., Neniskyte, U., Neumann, H., Noda, M., Peng, B., Peri, F., Perry, V. H., Popovich, P. G., Pridans, C., Priller, J., Prinz, M., Ragozzino, D., Ransohoff, R. M., Salter, M. W., Schaefer, A., Schafer, D. P., Schwartz, M., Simons, M., Smith, C. J., Streit, W. J., Tay, T. L., Tsai, L. H., Verkhratsky, A., von Bernhardi, R., Wake, H., Wittamer, V., Wolf, S. A., Wu, L. J., and Wyss-Coray, T. (2022). "Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads." *Neuron*, 110(21), 3458-3483.
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., 3rd, Lafaille, J. J., Hempstead, B. L., Littman, D. R., and Gan, W. B. (2013). "Microglia promote

- learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor." *Cell*, 155(7), 1596-609.
- Parsons, M. P., and Raymond, L. A. (2014). "Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders." *Neuron*, 82(2), 279-93.
- Paulsen, F., and Waschke, J. (2017). *Sobotta, Atlas der Anatomie des Menschen Band 3 : Kopf, Hals und Neuroanatomie*: Urban & Fischer.
- Pchitskaya, E., and Bezprozvanny, I. (2020). "Dendritic Spines Shape Analysis- Classification or Clusterization? Perspective." *Front Synaptic Neurosci*, 12, 31.
- Pelkey, K. A., Chittajallu, R., Craig, M. T., Tricoire, L., Wester, J. C., and McBain, C. J. (2017). "Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons." *Physiol Rev*, 97(4), 1619-1747.
- Perez-Rando, M., Castillo-Gomez, E., Belles, M., Carceller, H., and Nacher, J. (2017a). "The activation of NMDA receptors alters the structural dynamics of the spines of hippocampal interneurons." *Neurosci Lett*, 658, 79-84.
- Perez-Rando, M., Castillo-Gomez, E., Guirado, R., Blasco-Ibanez, J. M., Crespo, C., Varea, E., and Nacher, J. (2017b). "NMDA Receptors Regulate the Structural Plasticity of Spines and Axonal Boutons in Hippocampal Interneurons." *Front Cell Neurosci*, 11, 166.
- Perez-Rando, M., Guirado, R., Tellez-Merlo, G., Carceller, H., and Nacher, J. (2022). "Estradiol Regulates Polysialylated Form of the Neural Cell Adhesion Molecule Expression and Connectivity of O-LM Interneurons in the Hippocampus of Adult Female Mice." *Neuroendocrinology*, 112(1), 51-67.
- Petrak, L. J., Harris, K. M., and Kirov, S. A. (2005). "Synaptogenesis on mature hippocampal dendrites occurs via filopodia and immature spines during blocked synaptic transmission." *J Comp Neurol*, 484(2), 183-90.
- Pettigrew, L. C., Kryscio, R. J., and Norris, C. M. (2016). "The TNFalpha-Transgenic Rat: Hippocampal Synaptic Integrity, Cognition, Function, and Post-Ischemic Cell Loss." *PLoS One*, 11(5), e0154721.
- Pfeffer, C. K., Xue, M., He, M., Huang, Z. J., and Scanziani, M. (2013). "Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons." *Nat Neurosci*, 16(8), 1068-76.
- Pfeiffer, T., Avignone, E., and Nagerl, U. V. (2016). "Induction of hippocampal long-term potentiation increases the morphological dynamics of microglial processes and prolongs their contacts with dendritic spines." *Sci Rep*, 6, 32422.
- Pfeiffer, T., Poll, S., Bancelin, S., Angibaud, J., Inavalli, V. K., Keppler, K., Mittag, M., Fuhrmann, M., and Nagerl, U. V. (2018). "Chronic 2P-STED imaging reveals high turnover of dendritic spines in the hippocampus in vivo." *Elife*, 7.
- Phelps, E. A. (2004). "Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex." *Curr Opin Neurobiol*, 14(2), 198-202.
- Pi, H. J., Hangya, B., Kvitsiani, D., Sanders, J. I., Huang, Z. J., and Kepecs, A. (2013). "Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control." *Nature*, 503(7477), 521-4.
- Planaguma, J., Leypoldt, F., Mannara, F., Gutierrez-Cuesta, J., Martin-Garcia, E., Aguilar, E., Titulaer, M. J., Petit-Pedrol, M., Jain, A., Balice-Gordon, R., Lakadamyali, M., Graus, F., Maldonado, R., and Dalmau, J. (2015). "Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice." *Brain*, 138(Pt 1), 94-109.
- Pollak, T. A., McCormack, R., Peakman, M., Nicholson, T. R., and David, A. S. (2014). "Prevalence of anti-N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor [corrected]

- antibodies in patients with schizophrenia and related psychoses: a systematic review and meta-analysis." *Psychol Med*, 44(12), 2475-87.
- Pouille, F., and Scanziani, M. (2001). "Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition." *Science*, 293(5532), 1159-63.
- Price, C. J., Cauli, B., Kovacs, E. R., Kulik, A., Lambolez, B., Shigemoto, R., and Capogna, M. (2005). "Neurogliaform neurons form a novel inhibitory network in the hippocampal CA1 area." *J Neurosci*, 25(29), 6775-86.
- Quade, A., Rostasy, K., Wickstrom, R., Aydin, O. F., Sartori, S., Nosadini, M., Knierim, E., Kluger, G., Korinthenberg, R., Stuve, B., Waltz, S., Leiz, S., and Hausler, M. (2023). "Autoimmune Encephalitis with Autoantibodies to NMDAR1 following Herpes Encephalitis in Children and Adolescents." *Neuropediatrics*, 54(1), 14-19.
- Raghuraman, R., Karthikeyan, A., Wei, W. L., Dheen, S. T., and Sajikumar, S. (2019). "Activation of microglia in acute hippocampal slices affects activity-dependent long-term potentiation and synaptic tagging and capture in area CA1." *Neurobiol Learn Mem*, 163, 107039.
- Rahman, K. A., Orlando, M., Boulos, A., Andrzejak, E., Schmitz, D., Ziv, N. E., Pruss, H., Garner, C. C., and Ichkova, A. (2023). "Microglia actively remove NR1 autoantibody-bound NMDA receptors and associated post-synaptic proteins in neuron microglia co-cultures." *Glia*, 71(8), 1804-1829.
- Raven, F., Medina, A. V., Schmidt, K., He, A., Vankampen, A. A., Balendran, V., and Aton, S. J. (2024). "Brief sleep disruption alters synaptic structures among hippocampal and neocortical somatostatin-expressing interneurons." *bioRxiv*.
- Raven, F., Meerlo, P., Van der Zee, E. A., Abel, T., and Havekes, R. (2019). "A brief period of sleep deprivation causes spine loss in the dentate gyrus of mice." *Neurobiol Learn Mem*, 160, 83-90.
- Richter, V., Muche, R., and Mayer, B. (2018). "How much confidence do we need in animal experiments? Statistical assumptions in sample size estimation." *J Appl Anim Welf Sci*, 21(4), 325-333.
- Riebe, I., Seth, H., Culley, G., Dosa, Z., Radi, S., Strand, K., Frojd, V., and Hanse, E. (2016). "Tonically active NMDA receptors--a signalling mechanism critical for interneuronal excitability in the CA1 stratum radiatum." *Eur J Neurosci*, 43(2), 169-78.
- Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Dickstein, D. L., Hof, P. R., and Wearne, S. L. (2008). "Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images." *PLoS One*, 3(4), e1997.
- Rogers, R. S., and Bhattacharya, J. (2013). "When cells become organelle donors." *Physiology (Bethesda)*, 28(6), 414-22.
- Roumier, A., Bechade, C., Poncer, J. C., Smalla, K. H., Tomasello, E., Vivier, E., Gundelfinger, E. D., Triller, A., and Bessis, A. (2004). "Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse." *J Neurosci*, 24(50), 11421-8.
- Royer, S., Zemelman, B. V., Losonczy, A., Kim, J., Chance, F., Magee, J. C., and Buzsaki, G. (2012). "Control of timing, rate and bursts of hippocampal place cells by dendritic and somatic inhibition." *Nat Neurosci*, 15(5), 769-75.
- Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., and Hjerling-Leffler, J. (2011). "Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons." *Dev Neurobiol*, 71(1), 45-61.
- Runge, K., Cardoso, C., and de Chevigny, A. (2020). "Dendritic Spine Plasticity: Function and Mechanisms." *Front Synaptic Neurosci*, 12, 36.

- Russo, M. E. (1981). "The pathophysiology of epilepsy." *Cornell Vet*, 71(2), 221-47.
- Sakalar, E., Klausberger, T., and Lasztoczi, B. (2022). "Neurogliaform cells dynamically decouple neuronal synchrony between brain areas." *Science*, 377(6603), 324-328.
- Salesse, C., Mueller, C. L., Chamberland, S., and Topolnik, L. (2011). "Age-dependent remodelling of inhibitory synapses onto hippocampal CA1 oriens-lacunosum moleculare interneurons." *J Physiol*, 589(Pt 20), 4885-901.
- Sato-Hashimoto, M., Nozu, T., Toriba, R., Horikoshi, A., Akaike, M., Kawamoto, K., Hirose, A., Hayashi, Y., Nagai, H., Shimizu, W., Saiki, A., Ishikawa, T., Elhanbly, R., Kotani, T., Murata, Y., Saito, Y., Naruse, M., Shibasaki, K., Oldenborg, P. A., Jung, S., Matozaki, T., Fukazawa, Y., and Ohnishi, H. (2019). "Microglial SIRPalpha regulates the emergence of CD11c(+) microglia and demyelination damage in white matter." *Elife*, 8.
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Heller, C. T., and Stevens, B. (2014). "An engulfment assay: a protocol to assess interactions between CNS phagocytes and neurons." *J Vis Exp*(88).
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., and Stevens, B. (2012). "Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner." *Neuron*, 74(4), 691-705.
- Scheuss, V., and Bonhoeffer, T. (2014). "Function of dendritic spines on hippocampal inhibitory neurons." *Cereb Cortex*, 24(12), 3142-53.
- Scheyltjens, I., and Arckens, L. (2016). "The Current Status of Somatostatin-Interneurons in Inhibitory Control of Brain Function and Plasticity." *Neural Plast*, 2016, 8723623.
- Schmid, L. C., Mittag, M., Poll, S., Steffen, J., Wagner, J., Geis, H. R., Schwarz, I., Schmidt, B., Schwarz, M. K., Remy, S., and Fuhrmann, M. (2016). "Dysfunction of Somatostatin-Positive Interneurons Associated with Memory Deficits in an Alzheimer's Disease Model." *Neuron*, 92(1), 114-125.
- Schmiedt, C., Brand, A., Hildebrandt, H., and Basar-Eroglu, C. (2005). "Event-related theta oscillations during working memory tasks in patients with schizophrenia and healthy controls." *Brain Res Cogn Brain Res*, 25(3), 936-47.
- Schulz, J. M., Knoflach, F., Hernandez, M. C., and Bischofberger, J. (2018). "Dendrite-targeting interneurons control synaptic NMDA-receptor activation via nonlinear alpha5-GABA(A) receptors." *Nat Commun*, 9(1), 3576.
- Scoville, W. B., and Milner, B. (1957). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20(1), 11-21.
- Shi, H. J., Wang, S., Wang, X. P., Zhang, R. X., and Zhu, L. J. (2023). "Hippocampus: Molecular, Cellular, and Circuit Features in Anxiety." *Neurosci Bull*, 39(6), 1009-1026.
- Shi, X., Luo, L., Wang, J., Shen, H., Li, Y., Mamtilahun, M., Liu, C., Shi, R., Lee, J. H., Tian, H., Zhang, Z., Wang, Y., Chung, W. S., Tang, Y., and Yang, G. Y. (2022). "Author Correction: Stroke subtype-dependent synapse elimination by reactive gliosis in mice." *Nat Commun*, 13(1), 1183.
- Smarr, K. L., and Keefer, A. L. (2020). "Measures of Depression and Depressive Symptoms." *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 72 Suppl 10, 608-629.
- Somogyi, P., and Klausberger, T. (2005). "Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus." *J Physiol*, 562(Pt 1), 9-26.

- Speigel, I. A., and Hemmings, H. C., Jr. (2021). "Relevance of Cortical and Hippocampal Interneuron Functional Diversity to General Anesthetic Mechanisms: A Narrative Review." *Front Synaptic Neurosci*, 13, 812905.
- Spiteri, A. G., Wishart, C. L., Pamphlett, R., Locatelli, G., and King, N. J. C. (2022). "Microglia and monocytes in inflammatory CNS disease: integrating phenotype and function." *Acta Neuropathol*, 143(2), 179-224.
- Squire, L. R. (2009). "The legacy of patient H.M. for neuroscience." *Neuron*, 61(1), 6-9.
- Standaert, D. G., Landwehrmeyer, G. B., Kerner, J. A., Penney, J. B., Jr., and Young, A. B. (1996). "Expression of NMDAR2D glutamate receptor subunit mRNA in neurochemically identified interneurons in the rat neostriatum, neocortex and hippocampus." *Brain Res Mol Brain Res*, 42(1), 89-102.
- Steiner, J., Walter, M., Glanz, W., Sarnyai, Z., Bernstein, H. G., Vielhaber, S., Kastner, A., Skalej, M., Jordan, W., Schiltz, K., Klingbeil, C., Wandinger, K. P., Bogerts, B., and Stoecker, W. (2013). "Increased prevalence of diverse N-methyl-D-aspartate glutamate receptor antibodies in patients with an initial diagnosis of schizophrenia: specific relevance of IgG NR1a antibodies for distinction from N-methyl-D-aspartate glutamate receptor encephalitis." *JAMA Psychiatry*, 70(3), 271-8.
- Stence, N., Waite, M., and Dailey, M. E. (2001). "Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices." *Glia*, 33(3), 256-66.
- Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., Howell, G. R., Christopherson, K. S., Nouri, N., Micheva, K. D., Mehalow, A. K., Huberman, A. D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A. M., Lambris, J. D., Smith, S. J., John, S. W., and Barres, B. A. (2007). "The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination." *Cell*, 131(6), 1164-78.
- Subeh, G. K., Lajber, M., Patel, T., and Mostafa, J. A. (2021). "Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis: A Detailed Review of the Different Psychiatric Presentations and Red Flags to Look for in Suspected Cases." *Cureus*, 13(5), e15188.
- Sudhof, T. C. (2021). "The cell biology of synapse formation." *J Cell Biol*, 220(7).
- Sun, H., He, X., Tao, X., Hou, T., Chen, M., He, M., and Liao, H. (2020). "The CD200/CD200R signaling pathway contributes to spontaneous functional recovery by enhancing synaptic plasticity after stroke." *J Neuroinflammation*, 17(1), 171.
- Swanson, L. W., and Cowan, W. M. (1977). "An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat." *J Comp Neurol*, 172(1), 49-84.
- Swanson, L. W., Wyss, J. M., and Cowan, W. M. (1978). "An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat." *J Comp Neurol*, 181(4), 681-715.
- Symmonds, M., Moran, C. H., Leite, M. I., Buckley, C., Irani, S. R., Stephan, K. E., Friston, K. J., and Moran, R. J. (2018). "Ion channels in EEG: isolating channel dysfunction in NMDA receptor antibody encephalitis." *Brain*, 141(6), 1691-1702.
- Takacs, V., Bardoczi, Z., Orosz, A., Major, A., Tar, L., Berki, P., Papp, P., Mayer, M. I., Sebok, H., Zsolt, L., Sos, K. E., Kali, S., Freund, T. F., and Nyiri, G. (2024). "Synaptic and dendritic architecture of different types of hippocampal somatostatin interneurons." *PLoS Biol*, 22(3), e3002539.

- Takacs, V. T., Freund, T. F., and Gulyas, A. I. (2008). "Types and synaptic connections of hippocampal inhibitory neurons reciprocally connected with the medial septum." *Eur J Neurosci*, 28(1), 148-64.
- Takacs, V. T., Klausberger, T., Somogyi, P., Freund, T. F., and Gulyas, A. I. (2012). "Extrinsic and local glutamatergic inputs of the rat hippocampal CA1 area differentially innervate pyramidal cells and interneurons." *Hippocampus*, 22(6), 1379-91.
- Takahashi, H., and Magee, J. C. (2009). "Pathway interactions and synaptic plasticity in the dendritic tuft regions of CA1 pyramidal neurons." *Neuron*, 62(1), 102-11.
- Tamamaki, N., and Nojyo, Y. (1995). "Preservation of topography in the connections between the subiculum, field CA1, and the entorhinal cortex in rats." *J Comp Neurol*, 353(3), 379-90.
- Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J., Obata, K., and Kaneko, T. (2003). "Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse." *J Comp Neurol*, 467(1), 60-79.
- Taraschenko, O., Fox, H. S., Pittock, S. J., Zekeridou, A., Gafurova, M., Eldridge, E., Liu, J., Dravid, S. M., and Dingledine, R. (2019). "A mouse model of seizures in anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis." *Epilepsia*, 60(3), 452-463.
- Timms, A. E., Dorschner, M. O., Wechsler, J., Choi, K. Y., Kirkwood, R., Girirajan, S., Baker, C., Eichler, E. E., Korvatska, O., Roche, K. W., Horwitz, M. S., and Tsuang, D. W. (2013). "Support for the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia from exome sequencing in multiplex families." *JAMA Psychiatry*, 70(6), 582-90.
- Titulaer, M. J., McCracken, L., Gabilondo, I., Armangue, T., Glaser, C., Iizuka, T., Honig, L. S., Benseler, S. M., Kawachi, I., Martinez-Hernandez, E., Aguilar, E., Gresa-Arribas, N., Ryan-Flanagan, N., Torrents, A., Saiz, A., Rosenfeld, M. R., Balice-Gordon, R., Graus, F., and Dalmau, J. (2013). "Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study." *Lancet Neurol*, 12(2), 157-65.
- Tonnesen, J., Katona, G., Rozsa, B., and Nagerl, U. V. (2014). "Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses." *Nat Neurosci*, 17(5), 678-85.
- Topolnik, L., and Tamboli, S. (2022). "The role of inhibitory circuits in hippocampal memory processing." *Nat Rev Neurosci*, 23(8), 476-492.
- Trachtenberg, J. T., Chen, B. E., Knott, G. W., Feng, G., Sanes, J. R., Welker, E., and Svoboda, K. (2002). "Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex." *Nature*, 420(6917), 788-94.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., and Dingledine, R. (2010). "Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function." *Pharmacol Rev*, 62(3), 405-96.
- Tremblay, M. E., Lowery, R. L., and Majewska, A. K. (2010). "Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience." *PLoS Biol*, 8(11), e1000527.
- Tsien, J. Z., Huerta, P. T., and Tonegawa, S. (1996). "The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory." *Cell*, 87(7), 1327-38.
- Tukker, J. J., Lasztocki, B., Katona, L., Roberts, J. D., Pissadaki, E. K., Dalezios, Y., Marton, L., Zhang, L., Klausberger, T., and Somogyi, P. (2013). "Distinct

- dendritic arborization and in vivo firing patterns of parvalbumin-expressing basket cells in the hippocampal area CA3." *J Neurosci*, 33(16), 6809-25.
- Turi, G. F., Li, W. K., Chavlis, S., Pandi, I., O'Hare, J., Priestley, J. B., Grosmark, A. D., Liao, Z., Ladow, M., Zhang, J. F., Zemelman, B. V., Poirazi, P., and Losonczy, A. (2019). "Vasoactive Intestinal Polypeptide-Expressing Interneurons in the Hippocampus Support Goal-Oriented Spatial Learning." *Neuron*, 101(6), 1150-1165 e8.
- Tuzun, E., Zhou, L., Baehring, J. M., Bannykh, S., Rosenfeld, M. R., and Dalmau, J. (2009). "Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma." *Acta Neuropathol*, 118(6), 737-43.
- Tyan, L., Chamberland, S., Magnin, E., Camire, O., Francavilla, R., David, L. S., Deisseroth, K., and Topolnik, L. (2014). "Dendritic inhibition provided by interneuron-specific cells controls the firing rate and timing of the hippocampal feedback inhibitory circuitry." *J Neurosci*, 34(13), 4534-47.
- Tzilivaki, A., Tukker, J. J., Maier, N., Poirazi, P., Sammons, R. P., and Schmitz, D. (2023). "Hippocampal GABAergic interneurons and memory." *Neuron*, 111(20), 3154-3175.
- Uhlhaas, P. J., and Singer, W. (2010). "Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia." *Nat Rev Neurosci*, 11(2), 100-13.
- Van Derveer, A. B., Bastos, G., Ferrell, A. D., Gallimore, C. G., Greene, M. L., Holmes, J. T., Kubricka, V., Ross, J. M., and Hamm, J. P. (2021). "A Role for Somatostatin-Positive Interneurons in Neuro-Oscillatory and Information Processing Deficits in Schizophrenia." *Schizophr Bull*, 47(5), 1385-1398.
- Vasek, M. J., Garber, C., Dorsey, D., Durrant, D. M., Bollman, B., Soung, A., Yu, J., Perez-Torres, C., Frouin, A., Wilton, D. K., Funk, K., DeMasters, B. K., Jiang, X., Bowen, J. R., Mennerick, S., Robinson, J. K., Garbow, J. R., Tyler, K. L., Suthar, M. S., Schmidt, R. E., Stevens, B., and Klein, R. S. (2016). "A complement-microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment." *Nature*, 534(7608), 538-43.
- Vicini, S., Wang, J. F., Li, J. H., Zhu, W. J., Wang, Y. H., Luo, J. H., Wolfe, B. B., and Grayson, D. R. (1998). "Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors." *J Neurophysiol*, 79(2), 555-66.
- Vida, I., Halasy, K., Szinyei, C., Somogyi, P., and Buhl, E. H. (1998). "Unitary IPSPs evoked by interneurons at the stratum radiatum-stratum lacunosum-moleculare border in the CA1 area of the rat hippocampus in vitro." *J Physiol*, 506 (Pt 3)(Pt 3), 755-73.
- Viney, T. J., Lasztoczi, B., Katona, L., Crump, M. G., Tukker, J. J., Klausberger, T., and Somogyi, P. (2013). "Network state-dependent inhibition of identified hippocampal CA3 axo-axonic cells in vivo." *Nat Neurosci*, 16(12), 1802-1811.
- Vucurovic, K., Gallopin, T., Ferezou, I., Rancillac, A., Chameau, P., van Hooft, J. A., Geoffroy, H., Monyer, H., Rossier, J., and Vitalis, T. (2010). "Serotonin 3A receptor subtype as an early and protracted marker of cortical interneuron subpopulations." *Cereb Cortex*, 20(10), 2333-47.
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S., and Nabekura, J. (2009). "Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals." *J Neurosci*, 29(13), 3974-80.
- Waller, R., Mandeya, M., Viney, E., Simpson, J. E., and Wharton, S. B. (2020). "Histological characterization of interneurons in Alzheimer's disease reveals a

- loss of somatostatin interneurons in the temporal cortex." *Neuropathology*, 40(4), 336-346.
- Wang, R., and Reddy, P. H. (2017). "Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease." *J Alzheimers Dis*, 57(4), 1041-1048.
- Wang, S., Bian, L., Yin, Y., and Guo, J. (2022). "Targeting NMDA Receptors in Emotional Disorders: Their Role in Neuroprotection." *Brain Sci*, 12(10).
- Warren, N., Siskind, D., and O'Gorman, C. (2018). "Refining the psychiatric syndrome of anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis." *Acta Psychiatr Scand*, 138(5), 401-408.
- Washburn, H. R., Xia, N. L., Zhou, W., Mao, Y. T., and Dalva, M. B. (2020). "Positive surface charge of GluN1 N-terminus mediates the direct interaction with EphB2 and NMDAR mobility." *Nat Commun*, 11(1), 570.
- Weickert, C. S., Fung, S. J., Catts, V. S., Schofield, P. R., Allen, K. M., Moore, L. T., Newell, K. A., Pellen, D., Huang, X. F., Catts, S. V., and Weickert, T. W. (2013). "Molecular evidence of N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction in schizophrenia." *Mol Psychiatry*, 18(11), 1185-92.
- Weinhard, L., di Bartolomei, G., Bolasco, G., Machado, P., Schieber, N. L., Neniskyte, U., Exiga, M., Vadisiute, A., Raggioli, A., Schertel, A., Schwab, Y., and Gross, C. T. (2018). "Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction." *Nat Commun*, 9(1), 1228.
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., and Bear, M. F. (2006). "Learning induces long-term potentiation in the hippocampus." *Science*, 313(5790), 1093-7.
- Wit, C. B., and Hiesinger, P. R. (2023). "Neuronal filopodia: From stochastic dynamics to robustness of brain morphogenesis." *Semin Cell Dev Biol*, 133, 10-19.
- Witter, M. P., and Amaral, D. G. (1991). "Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex." *J Comp Neurol*, 307(3), 437-59.
- Wright, S., Hashemi, K., Stasiak, L., Bartram, J., Lang, B., Vincent, A., and Upton, A. L. (2015). "Epileptogenic effects of NMDAR antibodies in a passive transfer mouse model." *Brain*, 138(Pt 11), 3159-67.
- Wright, S. K., Rosch, R. E., Wilson, M. A., Upadhy, M. A., Dhangar, D. R., Clarke-Bland, C., Wahid, T. T., Barman, S., Goebels, N., Kreye, J., Pruss, H., Jacobson, L., Bassett, D. S., Vincent, A., Greenhill, S. D., and Woodhall, G. L. (2021). "Multimodal electrophysiological analyses reveal that reduced synaptic excitatory neurotransmission underlies seizures in a model of NMDAR antibody-mediated encephalitis." *Commun Biol*, 4(1), 1106.
- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B. A., and Stevens, B. (2015). "Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity." *Trends Immunol*, 36(10), 605-613.
- Xu, C., Nedergaard, M., Fowell, D. J., Friedl, P., and Ji, N. (2024). "Multiphoton fluorescence microscopy for in vivo imaging." *Cell*, 187(17), 4458-4487.
- Xu, Q., Zhu, Y., Wang, Q., Han, J., Mao, F., Zeng, S., Chen, S., Zhao, C., Gu, M., Li, Z., Luo, X., Fu, X., and Huang, Y. (2021). "Clinical features, treatments, and outcomes of patients with anti-N-methyl-D-aspartate encephalitis-a single-center, retrospective analysis in China." *Front Biosci (Landmark Ed)*, 26(9), 496-503.
- Yang, G., Pan, F., and Gan, W. B. (2009). "Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories." *Nature*, 462(7275), 920-4.
- Yilmaz, M., Yalcin, E., Presumey, J., Aw, E., Ma, M., Whelan, C. W., Stevens, B., McCarroll, S. A., and Carroll, M. C. (2021). "Overexpression of schizophrenia

- susceptibility factor human complement C4A promotes excessive synaptic loss and behavioral changes in mice." *Nat Neurosci*, 24(2), 214-224.
- Yu, S. P., Jiang, M. Q., Shim, S. S., Pourkhodad, S., and Wei, L. (2023). "Extrasynaptic NMDA receptors in acute and chronic excitotoxicity: implications for preventive treatments of ischemic stroke and late-onset Alzheimer's disease." *Mol Neurodegener*, 18(1), 43.
- Yuste, R. (2013). "Electrical compartmentalization in dendritic spines." *Annu Rev Neurosci*, 36, 429-49.
- Zecevic, D. (2023). "Electrical properties of dendritic spines." *Biophys J*, 122(22), 4303-4315.
- Zhan, Y., Paolicelli, R. C., Sforazzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A. L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., and Gross, C. T. (2014). "Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior." *Nat Neurosci*, 17(3), 400-6.
- Zhang, Q., Tanaka, K., Sun, P., Nakata, M., Yamamoto, R., Sakimura, K., Matsui, M., and Kato, N. (2012). "Suppression of synaptic plasticity by cerebrospinal fluid from anti-NMDA receptor encephalitis patients." *Neurobiol Dis*, 45(1), 610-5.
- Zhao, X., Teng, Y., Ni, J., Li, T., Shi, J., and Wei, M. (2023). "Systematic review: clinical characteristics of anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis." *Front Hum Neurosci*, 17, 1261638.
- Zhou, S., and Yu, Y. (2018). "Synaptic E-I Balance Underlies Efficient Neural Coding." *Front Neurosci*, 12, 46.
- Zrzavy, T., Endmayr, V., Bauer, J., Macher, S., Mossaheb, N., Schwaiger, C., Ricken, G., Winklehner, M., Glatter, S., Breu, M., Wimmer, I., Kovacs, G. G., Risser, D. U., Klupp, N., Simonitsch-Klupp, I., Roetzer, T., Rommer, P., Berger, T., Gelpi, E., Lassmann, H., Graus, F., Dalmau, J., and Hoftberger, R. (2021). "Neuropathological Variability within a Spectrum of NMDAR-Encephalitis." *Ann Neurol*, 90(5), 725-737.
- Zuo, Y., Yang, G., Kwon, E., and Gan, W. B. (2005). "Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex." *Nature*, 436(7048), 261-5.

10 Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Dr. Sabine Liebscher bedanken, ohne deren herausragende Betreuung und außerordentliche Unterstützung das Anfertigen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Des Weiteren geht mein Dank an Pavel Svehla und Sebastian Ehrt nicht nur für die exzellente Einarbeitung in die Methodiken und Unterstützung während der Doktorarbeit, sondern auch für die Zusammenarbeit bei dem Projekt „*ex vivo* Analysen SST-exprimierender Interneurone im Hippokampus bei NMDAR Autoimmunenzephalitis“.

Bei Dr. Julie Fourneau und Frau PD Dr. Florence Bareyre möchte ich mich für die Zusammenarbeit im Zuge des Projektes zur Interaktion von Mikroglia mit präsynaptischen Elementen bedanken.

Zuletzt geht mein Dank an alle PhD StudentInnen und MitdoktorandInnen der AG Liebscher für die herzliche Aufnahme in die Laborgemeinschaft und tatkräftige Unterstützung bei allen Problemen des Laboralltags.

11 Anhang

11.1 Publikationsliste

Human NMDAR autoantibodies disrupt excitatory-inhibitory balance, leading to hippocampal network hypersynchrony.

Ceanga M, Rahmati V, Haselmann H, Schmidl L, Hunter D, **Brauer AK**, Liebscher S, Kreye J, Prüss H, Groc L, Hallermann S, Dalmau J, Ori A, Heckmann M, Geis C. Cell Rep. 2023 Oct 31;42(10):113166.

Frequency and Longitudinal Course of Behavioral and Neuropsychiatric Symptoms in Participants With Genetic Frontotemporal Dementia.

Sonja Schönecker, Francisco J Martinez-Murcia, Jannis Denecke, Nicolai Franzmeier, Adrian Danek, Olivia Wagemann, Catharina Prix, Elisabeth Wlasich, Jonathan Vöglein, Sandra V Loosli, **Anna Brauer**, Juan-Manuel Górriz Sáez, Arabella Bouzigues, Lucy L Russell, Phoebe H Foster, Eve Ferry-Bolder, John C van Swieten, Lize C Jiskoot, Harro Seelaar, Raquel Sanchez-Valle, Robert Laforce Jr, Caroline Graff, Daniela Galimberti, Rik Vandenberghe, Alexandre de Mendonça, Pietro Tiraboschi, Isabel Santana, Alexander Gerhard, Sandro Sorbi, Markus Otto, Florence Pasquier, Simon Ducharme, Christopher Butler, Isabelle Le Ber, Elizabeth Finger, Maria Carmela Taglia, Mario Masellis, James B Rowe, Matthias Synofzik, Fermin Moreno, Barbara Borroni, Jonathan D Rohrer; Genetic Frontotemporal Dementia Initiative (GENFI); Josef Priller, Günter U Höglinger, Johannes Levin. Neurology 2024 Oct 22;103(8):209569.