

Aus dem Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin

Theoretische Medizin und Biowissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**STED-Bildgebung an einzelnen neuronalen Dendriten im
Mauscortex im Hinblick auf Dendritenspezifität von dendritischen
Dornen einer Zelle**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von

Carina Christine Theobald

geboren am 17.08.1995 in Saarlouis

In Widmung an meine Eltern
Gabriele und Joachim Theobald

Tag der Promotion: 03.06.2024

Betreuer: Junior- Prof. Dr. Marcel Lauterbach

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Junior-Prof. Dr. Marcel Lauterbach

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Schmitz

Inhaltsverzeichnis

I.	Abbildungsverzeichnis	I
II.	Tabellenverzeichnis	II
1	Zusammenfassung	1
2	Summary	2
3	Einleitung.....	3
4	Material und Methodik	9
4.1	Versuchs-Tiere.....	9
4.1.1	Präparation des Gehirns	10
4.2	Patch-Clamp-Technik.....	14
4.3	Färbung.....	17
4.4	Einbettung.....	17
4.5	STED-Mikroskopie	19
4.6	Skelettierung, Segmentierung und Dornen-Profile.....	24
4.7	Clusteranalyse	26
4.8	Statistik	27
5	Ergebnisse	28
6	Diskussion	40
7	Literaturverzeichnis.....	44
8	Danksagung	50
9	Lebenslauf.....	51

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Varianten der Patch-Clamp-Technik</i>	4
Abbildung 2: <i>Das Schema der STED-Mikroskopie</i>	7
Abbildung 3: <i>Geometrische Darstellung der Punktspreizfunktion</i>	7
Abbildung 4: <i>Vorbereitung für die Maushirnpräparation</i>	11
Abbildung 5: <i>Coronal zugeschnittenes Maushirn</i>	12
Abbildung 6: <i>Vorbereitende Maßnahmen der Geräte für die Präparation</i>	13
Abbildung 7: <i>Setup Patch-Clamp-Gerät</i>	14
Abbildung 8: <i>Ansicht eines Hirnschnittpräparates im Perfusionsbad des Patch-Clamp-Setups</i>	15
Abbildung 9: <i>STED-Mikroskop Setup</i>	19
Abbildung 10: <i>Justage mit Goldkugeln</i>	20
Abbildung 11: <i>Justage mit fluoreszierenden Kugeln</i>	22
Abbildung 12: <i>Ausschnitt aus einer Bildgebung am STED-Mikroskop</i>	23
Abbildung 13: <i>Übersichtsaufnahme eines Neurons</i>	23
Abbildung 14: <i>Bearbeitung der Dornen innerhalb der Software „webKnossos“</i>	24
Abbildung 15: <i>Übersichtsaufnahmen der drei Neurone</i>	28
Abbildung 16: <i>Übersichtsaufnahme eines zusammengesetzten Dendriten</i>	29
Abbildung 17: <i>Darstellung der manuellen Bearbeitung der Dornen und Dendriten mit Matlab-Routinen</i>	30
Abbildung 18: <i>Darstellung der vier Clustergruppen</i>	33
Abbildung 19: <i>Dornen sind inhomogen auf den Dendriten verteilt</i>	34
Abbildung 20: <i>„Pairwise Person’s Chi-Square“-Test zeigt signifikante Unterschiede zwischen der Verteilung der Cluster-Klassen auf den Dendriten</i>	35
Abbildung 21: <i>„Pairwise Person’s Chi-Square“-Test zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich aller Dendriten über alle Zellen hinweg</i>	36
Abbildung 22: <i>Die Merkmale der Dornen variieren auf verschiedenen Dendriten</i>	37
Abbildung 23: <i>Vergleich der Länge der dendritischen Dornen innerhalb eines Neurons</i>	38
Abbildung 24: <i>Vergleich der unterschiedlichen Dichte der dendritischen Dornen innerhalb eines Neurons</i>	39

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Lösungen für die Präparation der Hirnschnitte</i>	10
Tabelle 2: <i>Auflistung der Chemikalien</i>	16
Tabelle 3: <i>Tabelle der Chemikalien/Materialien für die Färbung und Einbettung</i>	17
Tabelle 4: <i>Zusammensetzung Mowiol</i>	17

1 Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass dendritische Dornen als Grundpfeiler für Lernen, Gedächtnis und Kognition gelten. Sie sind unter anderem ein grundlegendes Gefüge für die Informationsverarbeitung im Nervensystem und sind essentiell für das Verständnis von neurologischen Erkrankungen.

Für die Erforschung der dendritischen Dornen zählt die Fluoreszenzbildgebung zu einem der wichtigsten Ansätze in der neurobiologischen Forschung. Sowohl die Konfokaltechnik als auch die 2-Photonen-Mikroskopie werden für die Untersuchung der Morphologie verwendet. Die Auflösung dieser Mikroskopiertechniken ist jedoch durch die Beugungsgrenze limitiert und somit oftmals im Ergebnis der Bildgebung unzureichend, sodass diese häufig mit der Elektronenmikroskopie ergänzt wird. Die STED-Mikroskopie ist in der Lage, die Limitierung der Auflösung aufgrund der Beugungsgrenze zu umgehen und somit hochauflösende Bilder zu erzeugen. Diese Technik verbessert die Darstellung der morphologischen Parameter der Dornen. So sind beispielsweise die Morphologien der Dornenköpfe oder auch die Dornenhalsbreite besser zu beurteilen, von denen angenommen wird, dass sie eine bedeutende Rolle für die Funktion und Plastizität synaptischer Verbindungen darstellen.

Die Morphologie der Dornen wird mit Hilfe der hochauflösenden STED-Mikroskopie betrachtet, die es ermöglicht, den Dendriten schrittweise zu verfolgen und ihn zum Ende der Aufnahmen als Ganzes zu betrachten. Auf diese Weise können die Dornen eines kompletten Dendriten erfasst und beurteilt werden.

Primäres Ziel dieser Dissertation ist es, die Morphologie der einzelnen dendritischen Dornen innerhalb einer Zelle auf unterschiedlichen Dendriten zu beurteilen. So wird untersucht, wie homogen bzw. inhomogen die dendritischen Dornen auf den unterschiedlichen Dendriten verteilt sind.

In dieser Doktorarbeit ergeben die Untersuchungen hinsichtlich dendritischer Dornen einzelner Neuronen im auditiven Cortex der Maus vier Formklassen. Die Aufnahme und Analyse von insgesamt 570 dendritischen Dornen ergab, dass sie nicht zufällig auf den Dendriten verteilt sind, wobei einige Dornen bestimmter Klassen auf vereinzelt Dendriten häufiger anzutreffen sind. Des Weiteren besitzen Dendriten eine gewisse Individualität, die durch signifikante Unterschiede in Parametern wie Dornendichte und Dornenlänge unterstützt werden. Besonders hervorzuheben ist, dass zum ersten Mal im Mausmodell eine Dendritenspezifität der Dornen nachgewiesen werden konnte.

2 Summary

Dendritic spines are known to be the cornerstone of learning, memory and cognition. Among other things, they are a fundamental structure for information processing in the nervous system and are essential for understanding neurological diseases.

For the study of dendritic spines, fluorescence imaging is one of the most important approaches in neurobiological research. Both confocal and 2-photon microscopy are used to study morphology. However, the resolution of these microscopy techniques is limited by the diffraction limit and thus often insufficient in the imaging result, so it is often complemented with electron microscopy. STED microscopy is able to circumvent the limitation of resolution due to diffraction limit and thus produce high-resolution images. This technique improves the visualisation of the morphological parameters of the spines. For example, the curvature of the spine heads or even the spine neck width can be better assessed, which are thought to play a significant role in the function and plasticity of synaptic connections.

The morphology of the spines is imaged using high-resolution STED microscopy, which allows the dendrite to be followed step by step and viewed as a whole image. In this way, the spines of a complete dendrite can be recorded and assessed.

The primary goal of this dissertation is to assess the morphology of the individual dendritic spines within a cell on different dendrites. Thus, it is investigated how homogeneously or inhomogeneously the dendritic spines are distributed on the different dendrites.

In this doctoral thesis, the investigations of the dendritic spines of individual neurons in the auditory cortex of the mouse reveal four shape classes. Moreover, the spines are not randomly distributed on the dendrites, with some spines of certain classes being found more frequently on isolated dendrites. Furthermore, dendrites possess a certain individuality, which is supported by significant differences in parameters such as spine density and spine length. It is particularly noteworthy that dendrite specificity of spines could be shown in the mouse model for the first time.

3 Einleitung

Dendritische Dornen sind kleine Vorsprünge, entspringend aus neuronalen Dendriten (DeFelipe, 1992; Hayashi, 2005). Wobei die Form der dendritischen Dornen sehr unterschiedlich sein kann (Jones, 1969). Im Allgemeinen ist einem Dorn ein vergrößerter Kopf und ein dünner Hals zuzuordnen (Yuste, 2010). Des Weiteren enthalten sie Neurotransmitterrezeptoren, Organellen und Signalsysteme (Nimchinsky, 2002). Dendritische Dornen sind vermehrt im zentralen Nervensystem von vielen Wirbeltieren vorzufinden. Auch sind häufige Hirnerkrankungen, wie Schizophrenie- oder Alzheimererkrankungen, mit abnormalen Morphologien von dendritischen Dornen verbunden (Vaughn, 1989; Penzes, 2011). So sind auf manchen Dendriten kaum Dornen anzutreffen, wohingegen andere Dendriten ausgiebig mit Dornen ausgestattet sind (Ballesteros-Yanez, 2006). Auch die individuelle Form der Dornen ist auffällig und bedarf besonderem Interesse (Yuste, 2010).

Unterschiedliche Morphologien der Dornen werden schon früh von Jones und Powell im Jahr 1969 beschrieben (Jones, 1969). In der Zeit vor Jones und Powell verdeutlichte Ramón y Cajal im Jahr 1888, dass dendritische Dornen eine entscheidende Rolle in neuronalen Funktionen besitzen. Diese nannte er „espinas“ (Ramón, 1888). Auf Grundlage der optischen Mikroskopie und der Beobachtung von Dornen in Einzelschnitten am Elektronenmikroskop (EM) wird eine klassische Einteilung in stummelige, dünne und pilzförmige Dornen vorgenommen (Peters, 1970). Diese Einteilung wird weit verbreitet und in Studien verwendet (Benavides-Piccione, 2013). Eine aktuelle Studie am Reptilien- beziehungsweise Schildkrötenmodell veröffentlichte eine Einteilung der dendritischen Dornen in fünf Gruppen, die sie „Stocky“, „Dwarf“, „Club-like“, „Balanced“ und „Delicate“ nennen, die für das Schildkrötenmodell spezifisch ist (Knobloch, 2023). Auffällig ist, dass einige Dornen im Säugermodell scheinbar Zwischenstufen und somit in die zuvor genannten Kategorien schwer einzuordnen sind (Arellano, 2007).

Aus morphologischer Sicht werden wiederum Rückschlüsse auf die Funktion gezogen. Es wird angenommen, dass Dornen potenzielle Vermittler der konnektiven Plastizität sind, aufgrund ihrer morphologischen Lokalität zwischen Axon und Dendrit. Von dendritischen Dornen wird angenommen, dass sie als Grundpfeiler für Lernen und Gedächtnis gelten (Sorra, 2000). Außerdem fungieren Dornen als bedeutsame morphologische Korrelate von erregenden Synapsen und sind möglicherweise ein Speicher für das Langzeitgedächtnis im Gehirn (Segal, 2005).

So liegen zahlreiche Studien und Arbeiten vor, die sich mit der Morphologie der dendritischen Dornen beschäftigen.

Jedoch wurden bisher die statischen morphologischen Unterschiede von dendritischen Dornen nicht ausreichend geklärt. Am Reptilien- beziehungsweise Schildkrötenmodell konnte erstmals eine Dendritenspezifität der dendritischen Dornen nachgewiesen werden (Knobloch, 2023). In dieser Dissertationsarbeit wird der Frage nachgegangen, ob dendritische Dornen eine Dendritenspezifität im Säugetiermodell aufweisen.

Das heißt, wie homogen beziehungsweise inhomogen die Dornen auf den Dendriten verteilt sind. Außerdem wird eine morphologische Einteilung von Dornen vorgenommen. Diese dient der Kategorisierung von Dornen in reifen Neuronen und gibt eine Vermutung über die Beziehung zwischen Dorn-Morphologie und synaptischer Effizienz. Das hochauflösende STED-Mikroskop wird als Grundstein dieser Dissertationsarbeit für die Forschung verwendet, so wie auch die besondere Technik des Patch-Clamp Verfahrens.

Das Patch-Clamp-Verfahren ist eine Methode, die in der Neurophysiologie angewendet wird. Es wurde in den 1970er Jahren entwickelt (Neher, 1992) und wird in der Neurophysiologie eingesetzt, um elektrischen Signale von Neuronen zu messen (Zhang, 1998).

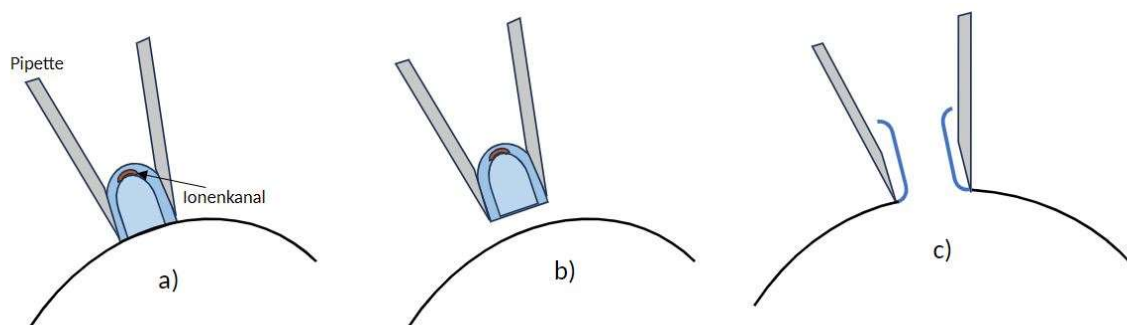


Abbildung 1: Varianten der Patch-Clamp-Technik, a) elektrische Abdichtung mitsamt den enthaltenden Ionenkanälen, b) Membranregion wird herausgelöst und untersucht, c) Membranbereich platzt, sodass durch die Pipette Substanzen zugeführt werden.

Die Technik verwendet eine mikroskopische Pipette, die an die Zellmembran einer einzelnen Zelle andockt. So gibt es verschiedene Varianten die Patch-Clamp-Technik zu nutzen. Durch einen leicht erzeugten Unterdruck kann ein Membranareal mitsamt den enthaltenden Ionenkanälen elektrisch abgedichtet werden, sodass messbare Widerstände zwischen innen und außen entstehen und so die Reaktion der Ionenkanäle beurteilbar ist (Abbildung 1, a)). Des Weiteren lassen sich Membranregionen mit der Pipette durch erhöhten Unterdruck herauslösen und können schließlich somit als biologisches Präparat dienen (Abbildung 1, b)). Im Rahmen meiner Versuche wurde eine andere Variante des Patch-Clamp-Verfahrens herangezogen.

Durch einen Saugstoß wurde die eingezogene Membranregion an der Pipette zum Platzen gebracht, ohne dass die Abdichtung zum Neuron verloren gegangen ist (Abbildung 1, c)).

So war es möglich Substanzen, wie zum Beispiel Biocytin, in die Zelle einzubringen (Neher, 1992).

Fortführend spielt die STED-Mikroskopie in dieser Dissertation eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Bildgebung der Dendriten und dendritischen Dornen.

Ehemals wurden für die Aufnahme von einzelnen dendritischen Dornen die Elektronenmikroskopie und die Lichtmikroskopie eingesetzt (Peters, 1970). Diese besitzen die Eigenschaft der meist zwei dimensional Darstellung von Dendriten unter dem Mikroskop (Wang, 2015). Um Bilder von einzelnen dendritischen Dornen anzufertigen, wird die Rasterelektronenmikroskopie verwendet, die als Goldstandard gilt (Denk, 2004; Harris, 1988). Das Elektronenmikroskop besitzt die Eigenschaft, Präparate in hoher Auflösung zu inspizieren (Hurbain, 2011). Jedoch müssen diese Präparate vorher stark bearbeitet und oft tiefgefroren sein, um die Struktur und Zusammensetzung des Präparates am besten erhalten zu können. Dieses Verfahren wird als Kryofixierung bezeichnet (Heuser, 2011). Jedoch kann das Verfahren der Kryofixierung in manchen Situationen von Nachteil sein.

So findet die Elektronenmikroskopie (EM) keine Anwendung bei der Untersuchung mit lebenden Zellpräparaten (Frederik, 1991). Des Weiteren lassen sich in der Elektronenmikroskopie Bilder mit sehr hoher Auflösung erzeugen. Dennoch ergibt sich ein Nachteil in der Einschränkung auf das Bildvolumen (Peddie, 2014). Im Gegensatz dazu kann die STED-Mikroskopie größere Bildvolumen darstellen. So können nicht nur Einzelstücke von verschiedenen Neuronen dargestellt, sondern komplette Dendriten mit ihren dendritischen Dornen untersucht werden.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie können mittels Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen ganz bestimmte Strukturen eines Objektes betrachtet werden. Fluoreszenz tritt auf, wenn eine Probe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt wird und schließlich Licht einer anderen Wellenlänge emittiert. Ein Fluoreszenzmikroskop besteht aus einer Lichtquelle, die die Probe beleuchtet, einem Filter, der das Anregungslicht herausfiltert und einem Objektiv, das das einfallende Licht fokussiert. Die Probe wird mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert, der spezifisch an eine bestimmte Struktur oder an ein bestimmtes Molekül in der Probe bindet. Wenn die Probe mit der Lichtquelle bestrahlt wird, absorbiert der Farbstoff das Anregungslicht und gibt Licht in einer anderen Wellenlänge ab (Kellogg, 2016; Renz, 2013).

Nachteil dieser Methode stellen die Phototoxizität, das Photobleaching und das Hintergrundrauschen dar. Bei der Phototoxizität kann die Beleuchtung der Probe mit intensivem Licht zu einer Schädigung oder sogar zum Tod der Zellen führen (Laissue, 2017).

Beim Photobleaching kann eine wiederholte Bestrahlung der Probe mit Licht dazu führen, dass der fluoreszierende Farbstoff abgebaut wird und somit das Signal schwächer wird (Song, 1995). Des Weiteren kann es schwierig sein, das Signal von schwach fluoreszierenden Proben von dem Hintergrundrauschen zu unterscheiden (Petty, 2007).

Die Konfokaltechnik schafft es, das Licht, das aus der Nicht-Fokalebene (außerhalb der Brennebene) kommt, mit Lochblenden und Laserlicht auszublenden.

Der einfallende Laserstrahl rastert mit Hilfe von entsprechend angesteuerten Scanspiegeln die zu untersuchende Probe in x- und y- Richtung ab. Der einfallende Laserstrahl lässt daraufhin die betreffenden Strukturen fluoreszieren. Das Fluoreszenzlicht das wiederkehrt, wird anschließend durch einen Detektor erkannt, der das Licht in ein elektrisches Signal umwandelt. Dieses Signal wird verstärkt, gefiltert und digitalisiert, um die Bildgebung und Analyse des Fluoreszenzbildes zu ermöglichen (Amos, 2003)

Die Herausforderung bei den zuvor genannten Mikroskopietechniken ist die Auflösung von Präparaten im Nanometerbereich. So können Strukturen, die kleiner als eine halbe Wellenlänge sind, nicht mehr als einzelne Objekte aufgelöst werden. Diese Problematik wird schon im Jahr 1869 von Émile Verdet und schließlich 1873 von Ernst Abbe erkannt (Lauterbach, 2012). Ernst Abbe nennt eine Grenze von 200nm, ab der einzelne Objekte nicht mehr aufgelöst werden können (Cremer, 2011).

Mit der Entwicklung der STED-Mikroskopie ist es möglich, lebende Strukturen zu untersuchen und dennoch die Abbe-Grenze zu umgehen. So wurde sich in dieser Dissertationsarbeit für die hochauflösende STED-Technik entschieden, da mit dieser Methode die Möglichkeit besteht, die winzigen und kritischen Formen der dendritischen Dornen detailliert darzustellen. Die STED-Technik erlaubt es, den Dendriten schrittweise in drei Dimensionen zu verfolgen und von den effektiven Färbemethoden zu profitieren. So können besonders konkrete und präzise Darstellungen der Details erreicht werden. Der Ausgangspunkt der STED-Technik ist die klassische Konfokalmikroskopie, die mit einem zweiten Laserstrahl ergänzt ist (Willig, 2006; Hell, 1994).

Der Aufbau eines STED-Mikroskops setzt sich unter anderem aus einem konventionellen Konfokallaserscanner zusammen. Der Konfokallaser/Anregungslaser (grün) regt zuvor markierte fluoreszierende Moleküle an (Abbildung 2).

Ein zweiter Laserstrahl, ein sogenannter Abregungslaser/STED-Laser (rot), regt die zuvor angeregten Strukturen in der Peripherie wieder ringförmig ab (Abbildung 2). Der zweite Laserstrahl (rot) wird als „Donutstrahl“ bezeichnet (Abbildung 2), da dieser beim Fokussieren ringförmig wird (Sieber, 2010).

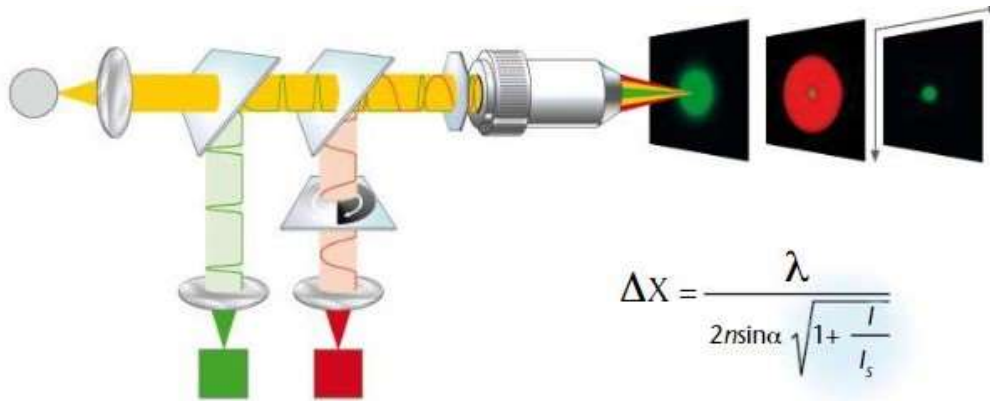


Abbildung 2: Das Schema der STED-Mikroskopie. Das grüne Quadrat stellt den Anregungslaser dar und das rote Quadrat den Abregungslaser. Rechts oben zeigt der erste größere grüne Kreis den Anregungslaser, der rote Kreis den Abregungslaser und der kleine grüne Kreis die somit entstandene PSF (Punktspreizfunktion) (mit Erlaubnis übernommen aus Sieber, 2010).

Dieses donutförmige Intensitätsprofil verbessert so die Auflösung. Dieses modifizierte Laserprofil wird mit dem Anregungsfokus überlagert. So kann sich der Abregungslaser (rot) ringförmig über den Anregungslaser (blau) platzieren und so eine Punktspreizfunktion (grün) erzeugen, die den Faktor für die Auflösung darstellt (Abbildung 3).

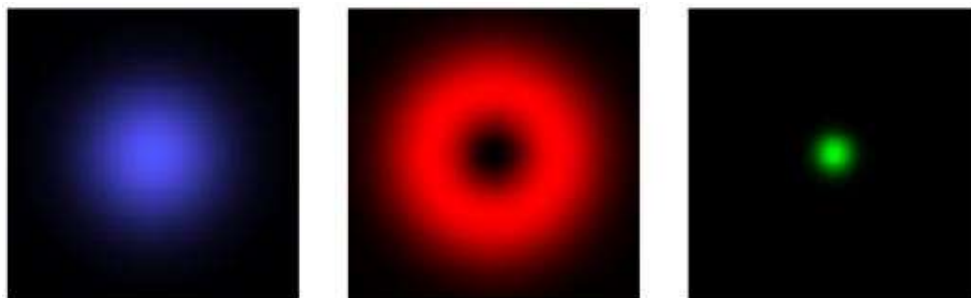


Abbildung 3: Geometrische Darstellung der Punktspreizfunktion. Im Fokus der Anregungslaser (blau), der donutförmige Abregungslaser (rot) und die resultierende PSF (grün) (mit Erlaubnis übernommen aus Lauterbach, 2009).

Durch die stimulierte Emission in den Randbereichen wird ein kleineres Volumen der Fluoreszenz verbleiben, dass eine Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze ermöglicht (Polzer, 2019).

So wird eine höhere räumliche Auflösung als bei herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopen erreicht, da es möglich ist, Strukturen mit geringerem Abstand voneinander zu unterscheiden. Die Größe des Zentrums der PSF kann durch verschiedene Faktoren, wie der Wellenlänge des STED-Strahls, die Eigenschaft des verwendeten Farbstoffs und die Intensität des STED-Strahls, beeinflusst werden. Durch die Veränderung dieser Parameter kann die Auflösung des STED-Mikroskops optimiert werden (Reuss, 2010).

Mit diesen Beschaffenheiten ermöglicht das STED-Mikroskop, Strukturen im 2-stelligen Nanobereich in biologischen Geweben zu verdeutlichen. STED Mikroskope detektieren ausschließlich Fluoreszenzlicht und kein Licht der Wellenlänge des STED-Lasers. Je stärker die STED-Laserleistung ist, umso schmaler wird das Volumen, bei dem Fluoreszenz möglich ist. Aus diesem Grund kann somit die Auflösung des Bildes erhöht werden (Sieber, 2010). Schließlich ist die STED-Technik eine leistungsstarke Methode zur Untersuchung von Strukturen im Nanometerbereich und wird vor allem in der biologischen und neurobiologischen Forschung eingesetzt.

4 Material und Methodik

Im nachfolgenden Abschnitt „Material und Methodik“ werden die experimentellen Vorgehensweisen und die erforderlichen Hilfsmittel beschrieben, die für die Durchführung der Dissertation verwendet wurden.

4.1 Versuchs-Tiere

Die Tiere wurden regelkonform nach der TierSchVersV und nach §4 Absatz 3 des Tierschutzgesetzes durch zervikale Dislokation getötet, sodass nach dem Tod des Tieres die Organentnahme (Gehirn) erfolgen konnte. Das Töten nach §4 Absatz 3 des Tierschutzgesetzes erfolgte durch eine zuständige Person, die die notwendigen Kenntnisse und Fähigkeiten mit einem Sachkundenachweis besitzt.

Die Verfahren zur Tierhaltung und Tierpflege wurden in Übereinstimmung mit den institutionellen Richtlinien (DIRECTIVE 2010/63/EU; Tierschutzgesetz; Tierschutzversuchstierverordnung; FELASA) ausgeführt.

Die verwendeten Tiere stammten aus einer ubiquitären Cre-Mauslinie (Schwenk, 1995) im Alter von vier bis sechs Wochen. In dieser Mauslinie wurde Cre in allen Zellen exprimiert. Der Vater der verwendeten Mäuse war heterozygot, die Mutter eine Black 6/N WT. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet. Bei der Auswahl der Mauslinie wurde darauf geachtet, dass es Überschusmäuse waren. So konnte im Sinne von „Replace, Reduce, Refine“, in diesem Fall „Reduce“, gehandelt werden.

4.1.1 Präparation des Gehirns

Für die Entnahme, die Präparation und das Patchen des Gehirns wurden folgende Lösungen vorbereitet:

	Chemikalien	mM	MW	g / 500 ml	µl / 500 ml	ml / 500 ml
Schnitt-Lösung	NaCl	87	58,44	2,542		
	KCl	3	74,56	0,111		
	NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	1,25	151,01	0,094		
	NaHCO ₃	25	84,01	1,050		
	Glucose	25	198,17	2,477		
	Sucrose	75	342,3	12,836		
	MgCl ₂ 6H ₂ O (1M Lösung)	3	203,3			1,5
	CaCl ₂ 2H ₂ O (1M Lösung)	0,5	147,02		250	
				g / 500 ml	µl / 250 ml	
Perfusions-Lösung	NaCl	12,6	58,44	3,68		
	KCl	3	74,56	0,112		
	NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	1,2	151,01	0,094		
	NaHCO ₃	25	84,01	1,05		
	Glucose	15	198,17	1,3		
	MgCl ₂ 6H ₂ O (1M Lösung)	1	203,3			500
	CaCl ₂ 2H ₂ O (1M Lösung)	2,5	147,02			250
				g / 250 ml	µl / 250 ml	
Inkubations-Lösung	NaCl	12,60	58,44	3,68		
	KCl	3	74,56	0,112		
	NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	1,2	151,01	0,094		
	NaHCO ₃	25	84,01	1,05		
	Glucose	15	198,17	1,3		
	MgCl ₂ 6H ₂ O (1M Lösung)	2	203,3			375
	CaCl ₂ 2H ₂ O (1M Lösung)	1	147,02			500

Tabelle 1: Lösungen für die Präparation der Hirnschnitte.

Die Messungenauigkeit in Tabelle 1 beliefen sich auf $\pm 0,005$. Die Schnittlösung wurde mit destilliertem Wasser angesetzt (siehe Tabelle 1, 500 ml). Für MgCl₂ und CaCl₂ wurde eine 1M Stammlösung verwendet.

Die 250 ml (Tabelle 1) wurden jeweils aus der fertig angesetzten Perfusionslösung separiert (vor Zugabe von $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) und damit die Inkubationslösung hergestellt. Die Schnittlösung wurde für eine Stunde bei -78°C aufbewahrt.

Des Weiteren wurde die Perfusionslösung während der Zeit der Präparation des Maushirns bei 6°C aufbewahrt und die Inkubationslösung wurde in den vorgesehenen Behälter im Wärmebad eingefüllt, sodass sich die Lösung an die Temperatur von 37°C des Wärmebads angleichen konnte (Abbildung 6, b)).

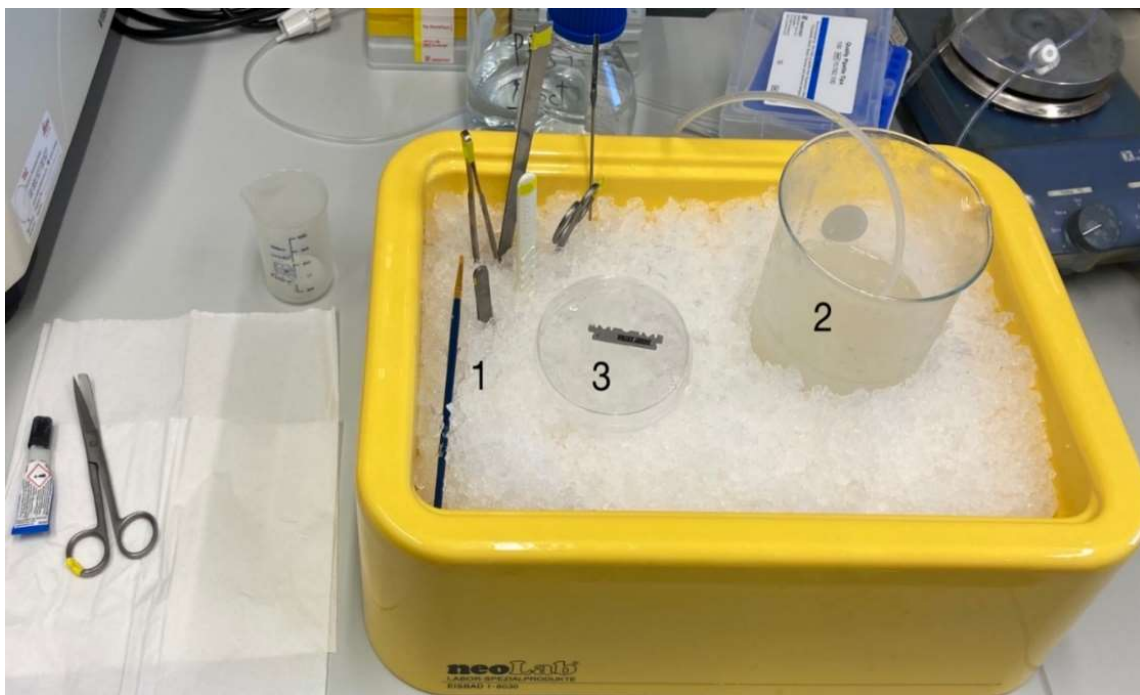


Abbildung 4: Vorbereitung für die Maushirnpräparation: 1: chirurgisches Instrumentarium gekühlt, 2: Schnittlösung mit Carbogen-Gas versorgt, 3: gekühlte Klinge für das Vibratom.

Essenziell für die vorbereitenden Maßnahmen der Präparation ist die Versorgung der Schnittlösung mit Carbogengas ($95\% \text{O}_2$, $5\% \text{CO}_2$) sowohl im Kältebad, das von umliegenden Wassereis umgeben wurde (Abbildung 4, 2), als auch im Behälter des Vibratoms (Abbildung 6, a)), um die Zellen des Maushirns über die Zeit des Versuchsverlaufes vor dem vorzeitigen Zelltod zu schützen.

Die Entnahme des Gehirns ist ein wichtiger Teil bei der Präparation. Hierbei muss auf eine ausreichende Kühlung geachtet und mit wenig Druck gearbeitet werden, um den Zelltod zu verhindern. Die Mäuse wurden durch eine zuvor durchgeführte zervikale Dislokation und anschließender Enthauptung getötet.

Die Köpfe wurden anschließend für 10 bis 20 Sekunden in eiskalte und mit Carbogengas versorgte Schnittlösung zum Abkühlen gelegt (Abbildung 4, 2).

Für die Schädelexposition wurden Haut und übriges Bindegewebe geschnitten und in Richtung Nase des Tieres gezogen. Um den Schädel zu öffnen, wurde mittels einer Schere entlang der Mittellinie vom kaudalen Ende bis zum Riechkolben geschnitten.

Hinzu wurde ein seitlicher Schnitt durch die Kieferknochen bis zu den Ohren und zu den Augen von beiden Seiten des Schädels vorgenommen. Schließlich wurde am offenen Rand des Schädels, von der Mittellinie aus, der Schädel geöffnet und das Maushirn dargestellt.

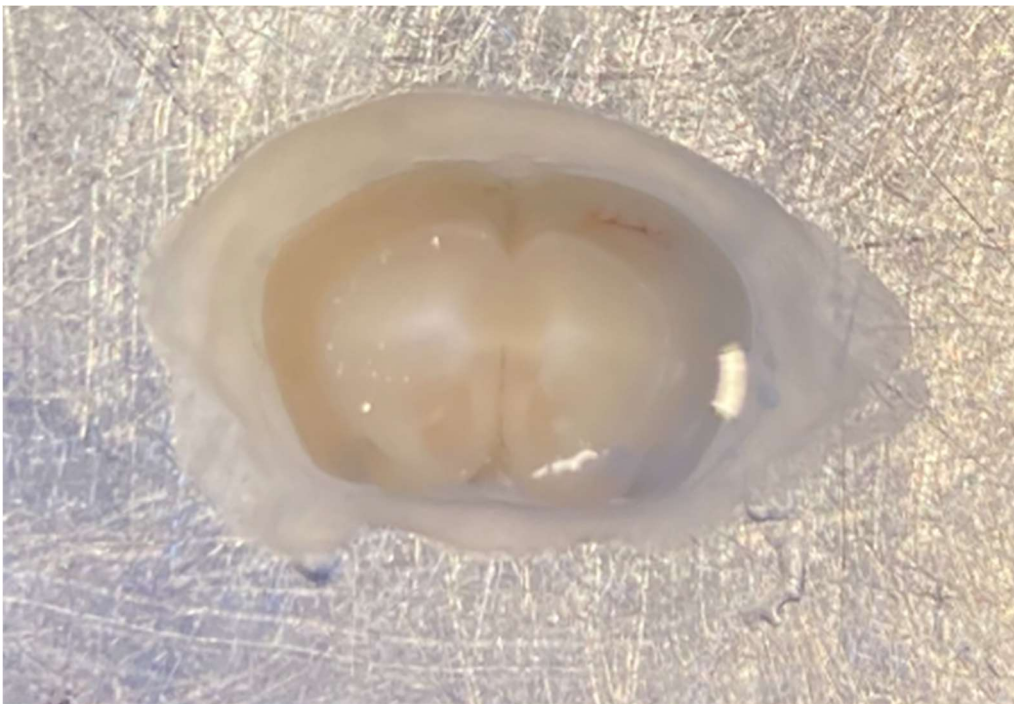


Abbildung 5: Coronal zugeschnittenes Maushirn. Gehirn wurde in coronaler Richtung zurechtgeschnitten und mit der magnetischen Platte für den korrekten Halt verklebt. Nach diesem Schritt werden die Hirnschnittpräparate mit Hilfe des Vibratoms angefertigt.

Mit einem gebogenen feinen Spatel wurde das Gehirn entnommen und für 3 bis 5 Minuten in die Schnittlösung gelegt (Abbildung 4, 2). Anschließend wurde das Maushirn mit einer gekühlten Klinge (Abbildung 4, 3) in coronaler Richtung zugeschnitten (Abbildung 5). Der Riechkolben wurde entfernt, sodass der Abschnitt mit Hippocampus und Cortex am Vibratom zugeschnitten werden konnte (Abbildung 6, a)).

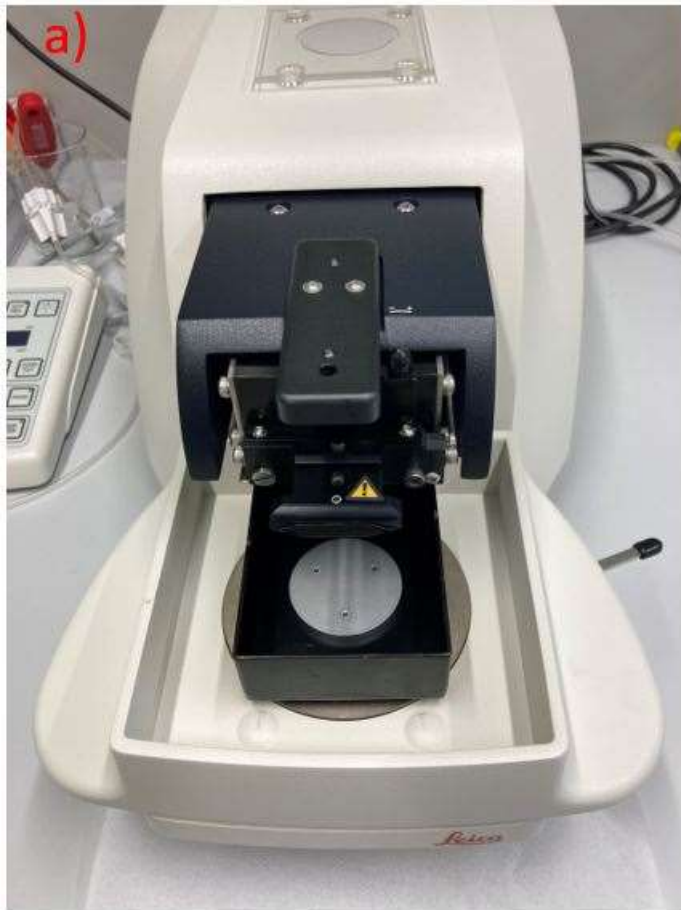


Abbildung 6: Vorbereitende Maßnahmen der Geräte für die Präparation. a) Vibratom mit Bühne (unbefüllt), b) Wärmebehälter und Behälter mit Inkubationslösung/Gitter.

Die Hirnschnitte wurden mit Hilfe des Vibratoms (Abbildung 6, a)) in 300 µm dicke Scheiben in coronaler Richtung geschnitten. Das Gehirn wurde zuvor mit einem geeigneten Kleber (Loctite 454, Listed P1, Reg. No. 123009, Henkel) auf der Platte des Vibratoms (Leica VT 1200 S) fixiert. Die Bühne beinhaltet gekühlte Schnittlösung, die zusätzlich mit Carbogengas versorgt wurde. Nach dem Schneideprozess wurden die Hirnschnitte auf das Gitter in der Inkubationslösung im Wasserbad bei 37°C deponiert (Abbildung 6, b)). Die Hirnschnitte verweilten für mindestens 15 Minuten und maximal 4 Stunden in der Inkubationslösung. Folgend wurden die Hirnschnitte mit der Patch-Clamp-Technik bearbeitet.

4.2 Patch-Clamp-Technik

Die Zellen wurden bei Raumtemperatur (ca. 23°C) im Verfahren des Patch-Clamp mit Biocytin befüllt. Die Einbringung von Biocytin in die Zelle ist ein wesentlicher Schritt der Experimente, die im weiteren Verlauf die nachfolgende Färbung und Darstellung bei der Untersuchung am Mikroskop betrifft. Verwendet wurden langstielige Patch-Pipetten (6-8 M Ω) aus Borosilikatglas (SCIENCE PRODUCTS GmbH, GB150F-8P, 0.86x1.50X80mm). Diese wurden vorher mit Hilfe einer Pipettenziehmaschine (Sutter Instruments, P-97) hergestellt. Um das scharfkantige Ende der Pipette nach dem Ziehvorgang zu glätten, wurde unter einem Mikroskop (World Precision Instruments, Mf-200 miniforge) unter Benutzung einer Elektrode das Ende kurz angeschmolzen. Die Experimente wurden an einem aufrechten Zeiss-Mikroskop mit 40x-Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss Axioskop, 40x/0.5W, PH7, Unendlich/O Objektiv) durchgeführt (Abbildung 7).

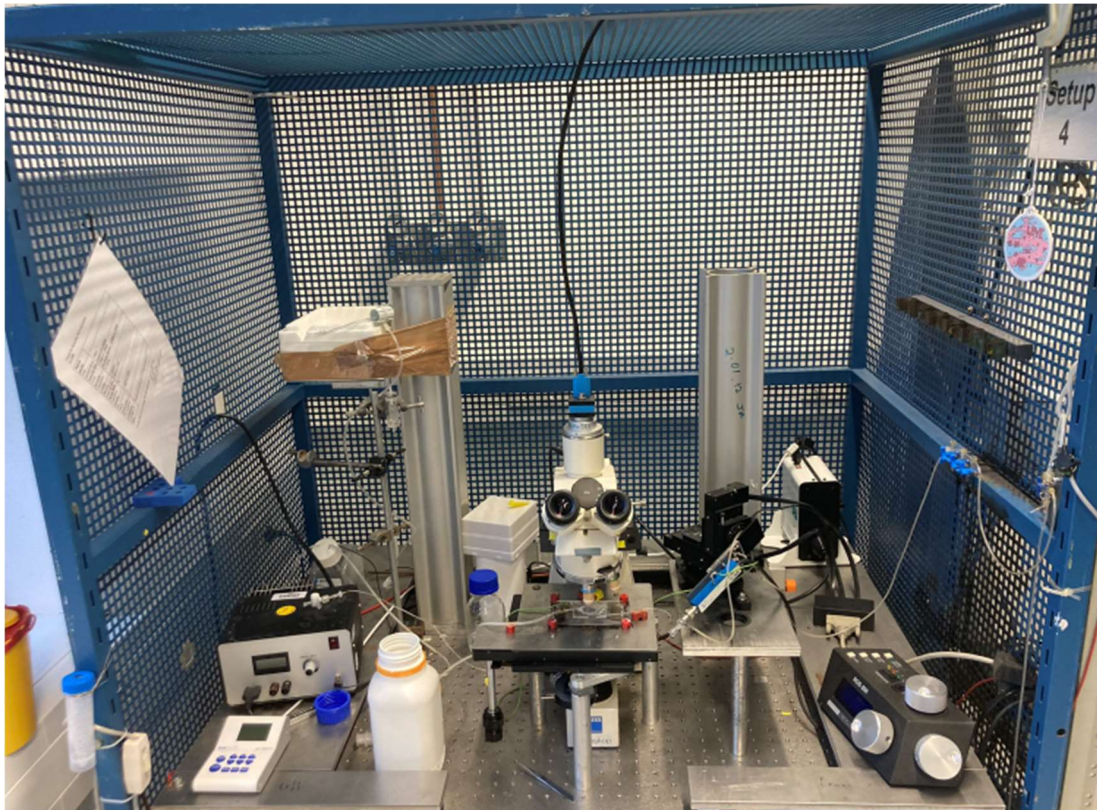


Abbildung 7: *Setup Patch-Clamp-Gerät. Aufbau des Arbeitsplatzes zur Befüllung der Zellen mit Biocytin unter der Patch-Clamp-Technik.*

Unter anderem verlaufen Zu- und Ablauf in die Messkammer, die für die nötige Perfusion (Abbildung 7) sorgen. Die Perfusionslösung spielt eine entscheidende Rolle für die Versorgung der Hirnschnitte.

Der Zulauf war mit einem Schlauch verbunden, der sich oberhalb der Messkammer befand und beförderte auf diesem Weg die Perfusionslösung zu dem Hirnschnitt. Auch der Ablauf war mit einem Schlauch verbunden, der die überschüssige Perfusionslösung aus der Messkammer in einen Sammelbehälter beförderte. Durch die konstante Überspülung der Präparate trocknet das Präparat nicht aus und wird mit Nährlösung versorgt, sodass das Zellsterben verhindert wird. Sobald Neurone abgestorben sind, ist das Befüllen der Zellen unmöglich. Die Absaugung der Lösung wird durch Unterdruck umgesetzt und landet in einem Sammelbehälter. Im Anschluss wurde die Pipette (befüllt mit Biocytin) an den Pipettenhalter (HEKA EPC 10, S/N: 590467) mit Mikromanipulator (Sutter Instruments, ROE-200) am Vorverstärker (HEKA, patch clamp, EPC 10) montiert.

Die Elektrode wird in die Messkammer mit der durchlaufenden Perfusionslösung platziert, womit die elektrische Verbindung zum Bad der Messkammer hergestellt wird (Abbildungen 7 und 8). Die Bewegung der Pipette und das Andocken der Pipette an die Zelle konnte zusätzlich mit einer Kamera überprüft werden (the imaging source, DMK 37BUX178, 37U-Serie).

Das gesamte Setup ist auf einem Tisch platziert, der pneumatisch gefedert ist (Abbildung 7). Mit Hilfe der Pneumatik konnten unerwünschte Bewegungen während des Versuchs abgefedert und ausgeglichen werden. Neben dem Setup ist ein Haupt- und Endverstärker (HEKA, EPC 10) montiert, der das Signal des Vorverstärkers entgegennimmt und Strom bzw. Spannung verstärkt.

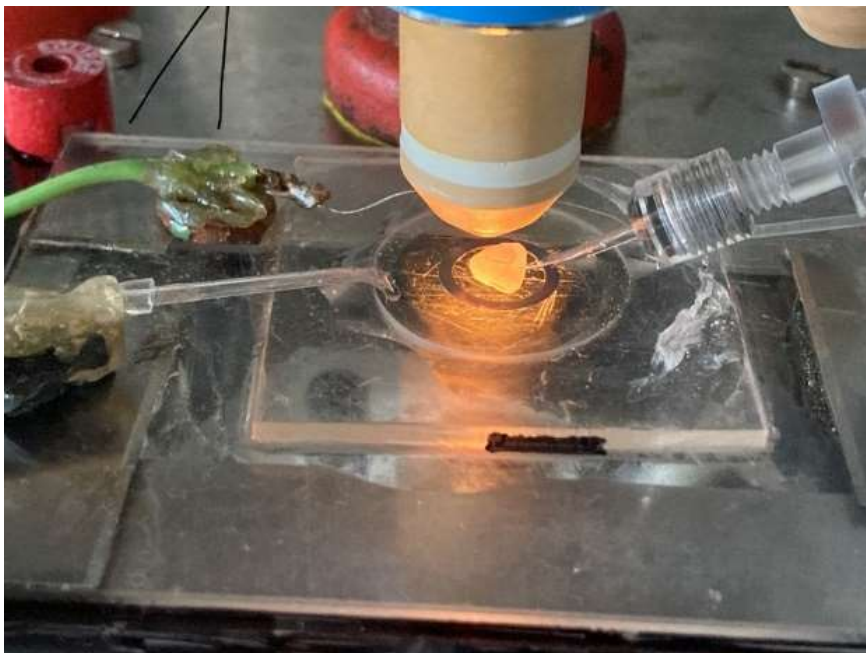


Abbildung 8: Ansicht eines Hirnschnittpräparates im Perfusionsbad des Patch-Clamp-Setups. Rechts: Patch-Pipette, Mitte: Präparat mit Netz, Links: Zufluss der Perfusionslösung, Oben/Mittig: Mikroskop.

Damit das Präparat stabil in der Flüssigkeit liegt, wurde ein kleiner Ring mit Netzstruktur (Hugo Sachs Elektronik -harvard Apparatus GmbH, March) auf den Hirnschnitt platziert (Abbildung 8). Die Zellen wurden für mindestens 20 Minuten gepatcht, um die Füllung mit Biocytin sicherzustellen.

Die verwendete Software wurde mit einem Verstärker (Heka, EPC 10) verwendet, der das elektrische Signal verstärkt, das von der Elektrode abgeleitet wird und wandelt es in digitale Daten um. Gemessen wurde in voltage-Clamp. Das Datensystem wiederum erfasst die digitalen Daten und sendet es an die Software.

Anhand der Software konnte die Kapazität der Zellmembran verfolgt werden und somit der Erfolg des Patchens genauestens beurteilt werden. Außerdem wurde es für die Visualisierung und Interpretation, Steuerung des Systems und für die Datenerfassung genutzt.

Nach dem abgeschlossenen Füllvorgang der Zelle mit Biocytin wurden die Schnitte für 24 Stunden in 100mM Phosphatpuffer (pH 7,4) mit 4% Paraformaldehyd (NaHPO_4 0.2M, Na_2HPO_4 0.2M) bei 6°C überführt und somit fixiert. Die Stammlösung NaHPO_4 mit 200mM und Na_2HPO_4 mit 200mM wurden mit einer 8%igen frischen aus Paraformaldehyd hergestellten Formaldehydlösung 1 zu 1 gemischt. Die Endkonzentration war schließlich 100mM Phosphatpuffer und 4% Paraformaldehyd.

Die Hersteller der Chemikalien für Abschnitt 4.1.1 und 4.2 sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Chemikalien	Hersteller
NaHCO_3	Merck KGaA, 64271 Darmstadt/Deutschland
NaH_2PO_4 2H ₂ O, KCl, Glucose	Carl Roth GmbH + Co KG in 76185 Karlsruhe/Deutschland
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH in 71711 Steinheim/Deutschland
NaCl	VWR Chemicals in 3001 Leuven/Belgien
10X PBS (1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na_2HPO_4 ; 18 mM KH_2PO_4 (pH 7,4))	Merck KGaA, 64271 Darmstadt/Deutschland
Biocytin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH in 71711 Steinheim/Deutschland

Tabelle 2: Auflistung der Chemikalien.

Die Zellen wurden dankenswerterweise unter Aufsicht und von Herrn Dr. David Stevens, aus dem Zentrum für integrative Physiologie und molekulare Medizin der Uniklinik Homburg, im Verfahren der Patch-Clamp-Technik befüllt. In dieser Phase lehrte und leitete mich Herr Dr. Stevens durch die Patch-Clamp-Technologie.

4.3 Färbung

Nachdem die Hirnschnittpräparate in 4 % Paraformaldehyd bei 6 °C geruht hatten, wurden diese gefärbt. Bei der verwendeten Färbemethode wird die starke Bindung von Streptavidin an Biocytin ausgenutzt. Nach dreimaligem Waschen der Hirnschnittpräparate in PBS wurden die Schnitte für eine Stunde in 2%igem Triton X-100 in PBS inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 6°C in PBS inkubiert, das Streptavidin, gekoppelt an das Fluorophor Atto 647N (1:500 in PBS), enthält (Tabelle 3).

Nach diesem Schritt wurden die Hirnschnitte dreimal für 20 Minuten in PBS gespült.

4.4 Einbettung

Eingebettet wurde mit der Substanz „Mowiol“, einem Spacer (SIGMA-ALDRICH, adhesive sheets, 0.36mm, double sided), einem Objektträger und einem Deckglas (High Precision, 22x22 mm, 170±5 µm, No. 1.5 H).

Chemikalien/Materialien	Hersteller
10%Triton	Sigma Aldrich Chemie GmbH in 71711 Steinheim/Deutschland
Atto647N-Streptavidin	Sigma Aldrich Chemie GmbH in 71711 Steinheim/Deutschland
Mowiol	Sigma Aldrich Chemie GmbH in 71711 Steinheim/Deutschland
Glycerol	Grüssing GmbH in 26849 Filsum/Deutschland
Tris-HCL-Puffer	Sigma Aldrich Chemie GmbH in 71711 Steinheim7Deutschland
Spacer 0,36mm (Platzhalter)	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Grace Bio-Labs SecureSeal adhesive sheets) in 71711 Steinheim/Deutschland

Tabelle 3: *Tabelle der Chemikalien/Materialien für die Färbung und Einbettung.*

Mowiol wurde mit folgenden Komponenten vorbereitet:

Mowiol				
	6 g Glycerol	2,4 g Mowiol 4-88	6 ml destilliertes H ₂ O	12 ml Tris-HCL Puffer (0,2 M, pH 8,4)

Tabelle 4: *Zusammensetzung Mowiol.*

Die Schnittpräparate wurden auf den Objektträger übertragen und der beidseits klebende Spacer (Platzhalter) mit einer Dicke von 0,36 mm kastenförmig um das Präparat aufgebracht.

Schließlich wurde das Mowiol auf den Hirnschnitt hinzugefügt und das Deckglas zum Schluss vorsichtig aufgelegt.

Das Deckglas weist eine Dicke von $170\pm 5\mu\text{m}$ auf. Dies ist essenziell wichtig für die nachfolgende Untersuchung am STED-Mikroskop, da die Dicke des Deckglases die Aberrationen und damit die Auflösung des Mikroskops beeinflusst.

Die vorbereiteten Objektträger wurden einen Tag getrocknet und schließlich mit Nagellack, der um das Deckglas aufgetragen wurde, versiegelt.

Die aufgeführten Lösungen wurden mit deionisiertem und RNAse freiem H_2O aus einem Reinstwassersystem von Milli-Q (Merck; Darmstadt/Deutschland) hergestellt.

4.5 STED-Mikroskopie

Das STED-Mikroskop Setup basiert auf einem inversen STED-Mikroskop. Hinzu kommen vier gepulste Anregungslaser und zwei gepulste STED-Abregungslaser. Es kann sowohl in 2D als auch in 3D aufgenommen werden. Außerdem verfügt das Setup über mehrere Komponenten, wie einen Scanner, verschiedene Objektivlinsen, einen Detektor und eine Software für die Visualisierung und der Bearbeitung der Aufnahmen (Abbildung 9).



Abbildung 9: *STED-Mikroskop Setup. Aufbau des Arbeitsplatzes zur Bildgebung der Zellen mit ihren Dendriten und dazugehörigen dendritischen Dornen.*

Die Bildgebung an den Hirnschnitten wurde auf einem invertierten STED-Mikroskop (Abberior Instruments GmbH) mit einem 100X Silikonölimmersionsobjektiv und NA 1,4 (UPLSAPO100XO, Olympus) unter Verwendung von gepulsten Anregungslasern mit 640nm und 565nm sowie einem STED-Laser mit 775nm vorgenommen. Die Lochblende wurde auf 1,5 Airy Einheiten eingestellt. Die Voxelgröße betrug 20x20x300nm.

Vor der Aufnahme der Dendriten mit ihren Dornen wurde jeweils eine Justage des STED-Mikroskops vorgenommen.

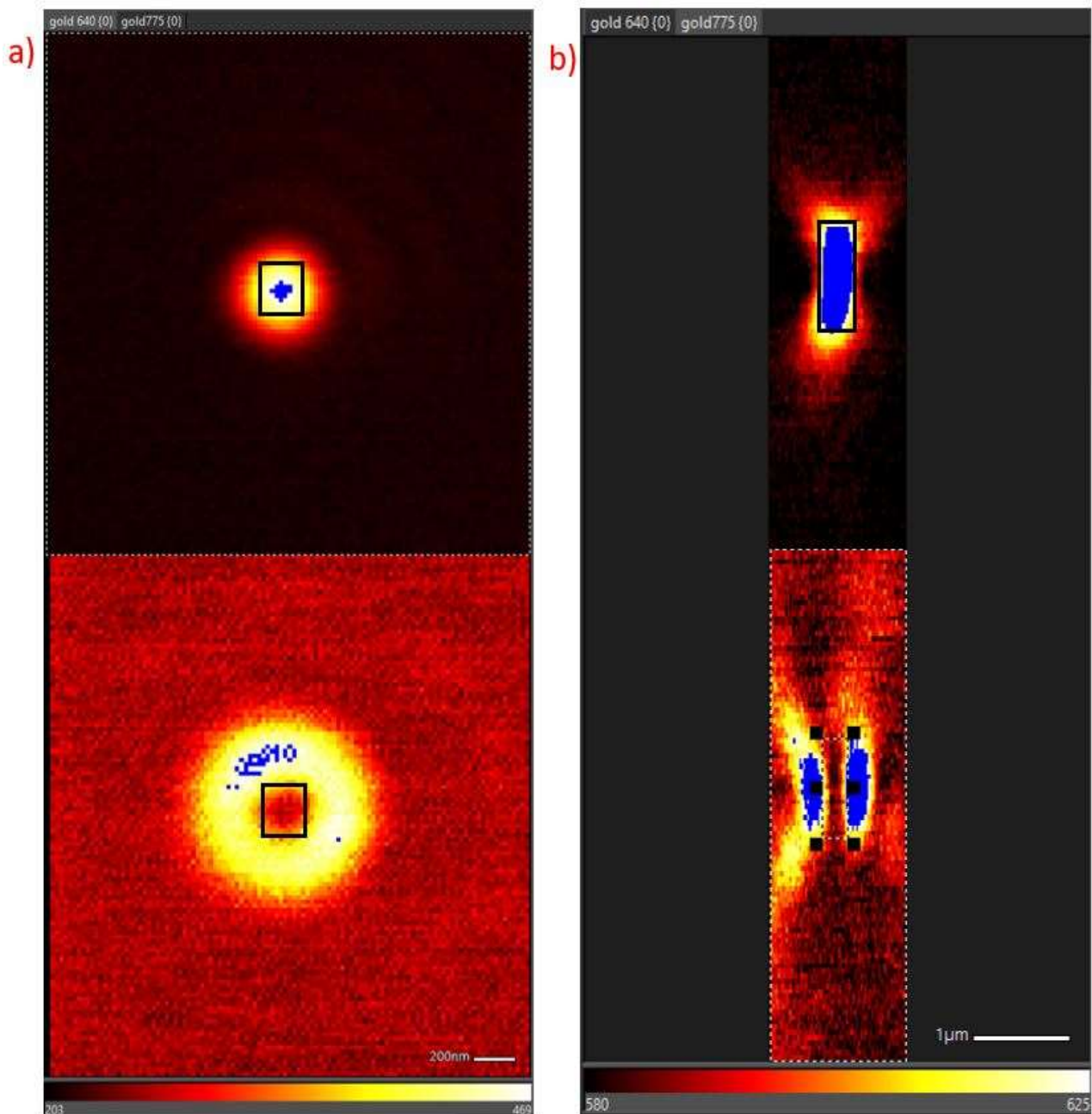


Abbildung 10: Justage mit Goldkugeln. a) Justage mit Goldkugeln in x-y-Richtung. Skalenbalken: 200nm. b) Justage mit Goldkugeln in x-z-Richtung. Skalenbalken: 1µm. Sowohl in Bildgebung a), als auch b) wurden drei der vier Kästchen nachträglich von Hand für das bessere Verständnis eingezeichnet. Das Kästchen, das im Programm „Impsector“ eingezeichnet worden ist, befindet sich in Abbildung b) /untere Abbildung. Von einer guten Justage kann ausgegangen werden, wenn die Kästchen sowohl in der oberen, als auch in der unteren Abbildung mittig im Fokus zu liegen kommen. Blau stellt hierbei den gesättigten Bereich dar. Die Farbskala am unteren Rand der Abbildungen a) und b) verläuft von Schwarz über Rot zu Gelb. Das heißt, sie stellen die Reihenfolge von keinem Photon bis zur Sättigung dar.

Die Justage erfolgte mit Hilfe von Goldkugelchen (abberior, Gold Nanoparticles, 150nm). Um das fertig justierte Ergebnis der Goldkugelchen zu sehen, muss ein Bild in lateraler x-y-Objektebene (Abbildung 10, a)) und ein Bild von der axialen x-z-, bzw. y-z-Ebene (Abbildung 10, b)) der Punktantwort (PSF) aufgenommen werden. Die Goldkugelchen wurden verwendet, da sie die Eigenschaft besitzen, Licht effizient zu streuen.

Wenn der STED-Laser (Abregungslaser) auf die Goldkugelchen trifft, wird er von ihnen gestreut. Auf diese Weise ist es möglich, die Laser sichtbar zu machen. So konnte die Qualität der Überlagerung des Anregungs- und Abregungslaser beurteilt werden. Die Bilgebungen wurden mit einer Farbskala skaliert, auf der eine niedrige Photonenzahl pro Pixel schwarz und bei zunehmender Menge an Photonen die Skala erst rot, dann gelb und schließlich im gesättigten Bereich blau wird. Sättigung bedeutet, dass das Maximum der möglichen Photonen pro Pixel erreicht wurde. Für gewöhnlich ist eine Sättigung zu vermeiden, da sie einen Kontrastverlust darstellt, in diesem Fall hilft sie aber beim Identifizieren des idealen Justagepunktes. Der Anregungsfokus (Abbildung 10 a) und b), obere Abbildung) konnte mit dem ringförmigen Ausschaltfokus (Abbildung 10 a) und b) untere Abbildung) verglichen werden. Anschließend wurde nahezu zentral in die Mitte des Anregungsfokus (Abbildung 10 a) und b) obere Abbildung) ein Kästchen eingezeichnet. Dieser Platz des Kästchens wurde schließlich auf das entstandene Bild nach dem Anschalten des Ausschaltfokus verglichen (Abbildung 10 a) und b), untere Abbildung). Wenn diese Markierungen sowohl im oberen als auch im unteren Bild mittig im Fokus zu liegen kommen, wird davon ausgegangen, dass der Anregungs- und Ausschaltfokus überlagernd liegen. Hierbei ist es essentiell wichtig, dass der Abregungslaser sich genau mittig mit dem Anregungslaser (Abbildung 10 a) und b)) überlagert. Erst dann kann schließlich davon ausgegangen werden, dass bei den späteren Aufnahmen der dendritischen Dornen eine gute Auflösung erreicht werden kann. Das liegt daran, dass der STED-Donut (Abregungslaser) um den Anregungslaser herum die Moleküle effizient abregt. Je stärker der Abregungslaser, desto stärker wird die Fluoreszenz auf das Zentrum des Donuts konzentriert. Dieser gesamte Vorgang findet im dreidimensionalen Raum statt.

Nach der Justage mit den Goldkugelchen wurden fluoreszierende Kugelchen (abberior, Nanoparticles, Red Fluor, 40nm) als Kontrolle verwendet, um die tatsächliche Auflösung und Leistung als Fluoreszenzmikroskop zu kontrollieren (Abbildung 11, a) und b)).

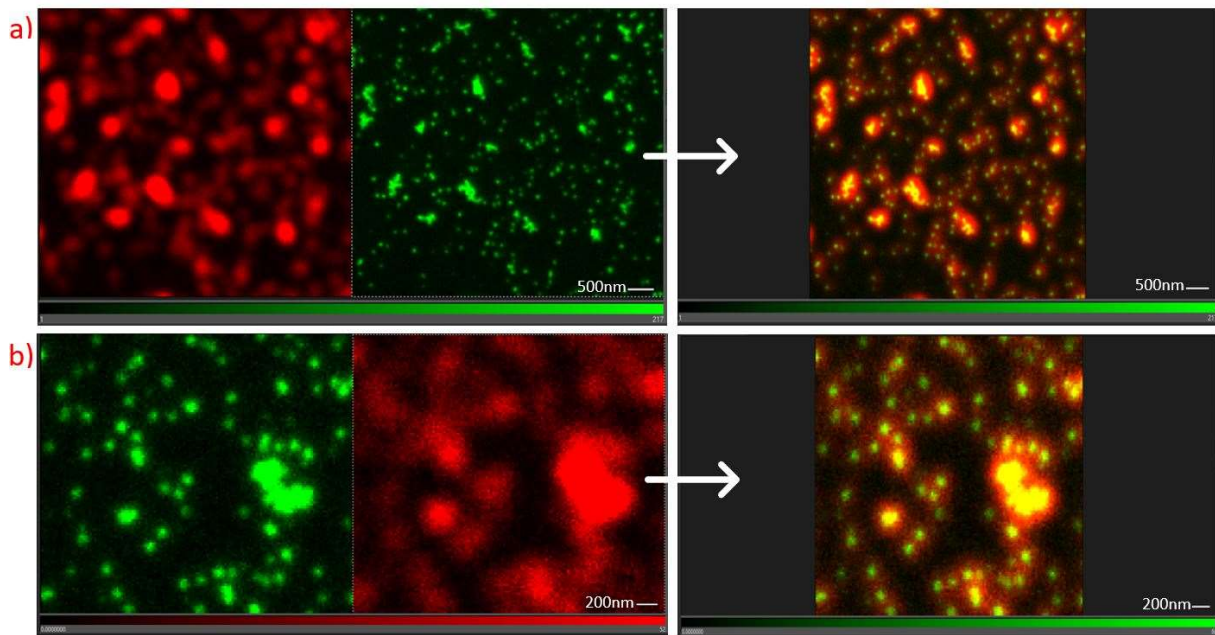


Abbildung 11: Justage mit fluoreszierenden Kügelchen. a) links: konfokale Bildaufnahme (rot), rechts: STED-Bildaufnahme (grün). Skalensbalken: 500nm. Es wird ein Übersichtsbild gezeigt, sowohl von der konfokalen, als auch der STED-Aufnahme. Der weiße Pfeil zeigt auf die Überlagerung der konfokalen- und STED-Aufnahme. b) links: STED-Aufnahme (grün), rechts: konfokale Aufnahme (rot). Skalensbalken: 200nm. Es wird eine Zoom-Aufnahme von einem Teil der Übersichtsaufnahme aus a) gezeigt. Der Pfeil zeigt zu der Überlagerung der beiden Zoom-Aufnahmen von der konfokalen- und der STED-Aufnahme. Die Farbskala, die sich am unteren Rand der Abbildungen befindet, verläuft von schwarz über dunkelrot zu hellrot. Oder von schwarz über dunkelgrün zu hellgrün. Diese Farbskala gibt die Reihenfolge von keinem Photon bis gesättigt wieder.

Hierbei wurde auf den Beobachtungsbereich der Fluoreszenzkügelchen fokussiert und ein Bild erfasst, sodass die Auflösung bewertet werden konnte. Dabei repräsentiert die linke Bildaufnahme (rot) die konfokale- und die rechte Abbildung (grün) die STED-Aufnahme (Abbildung 11, a)). Der Pfeil zeigt auf eine Abbildung, die durch die Überlagerung der beiden Aufnahmen (konfokale- und STED-Aufnahme) entstanden ist. Aus diesem Bildfeld wurde wiederum ein Zoom aus einer beliebigen Region ausgewählt und betrachtet, um eine exaktere Kontrolle zu erhalten (Abbildung 11, b)). Zur besseren Beurteilung wurden darauffolgend sowohl die konfokale-, als auch die STED- Aufnahme (Abbildung 11, a)/Pfeil), als auch die Überlagerung aus dem Zoom-Ausschnitt (Abbildung 11, b)/Pfeil) überlagert. Wichtig hierbei ist, dass die STED-Abbildung sich mittig in der konfokalen Abbildung bei der Überlagerung wiederfindet. Wenn dies erfüllt ist, sind Anregungs- und Abregungslaser übereinander platziert und damit ein hohes Level der Qualität der STED-Aufnahmen erreicht. Die Bildgebungen wurden mit einer Farbskala skaliert, auf der eine niedrige Photonenzahl pro Pixel schwarz und bei zunehmender Menge an Photonen die Skala erst dunkelrot/dunkelgrün und schließlich rot/grün wird.

Nach der korrekten Justage des Mikroskops wurde jeder einzelne Dendrit schrittweise verfolgt und mit einem geringen Überlapp in 3D-Bildaufnahmen aufgenommen.

Die Bildstapel wurden mit Hilfe theoretischer Punktspreizfunktionen und geschriebenen Routinen in Matlab (The Mathworks, Natick, USA), linear entfaltet (Wiener gefiltert).

Die 3D-Bildaufnahmen wurden sowohl als konfokales- als auch als STED-Bild erfasst und für die erste Übersicht, mit dem ImageJ-Plugin „mosaicJ“ zusammengefügt (Preibisch, 2009).

Zur Veranschaulichung der Unterschiede zwischen einer konfokalen und einer STED-Aufnahme wurde ein Bildstapel mit der Software „Inspector 16.3.13794“ entlang der z-Achse auf eine Ebene gebracht. So konnten die Aufnahmen in Form einer Maximumintensitätsprojektion verglichen werden (Abbildung 12).

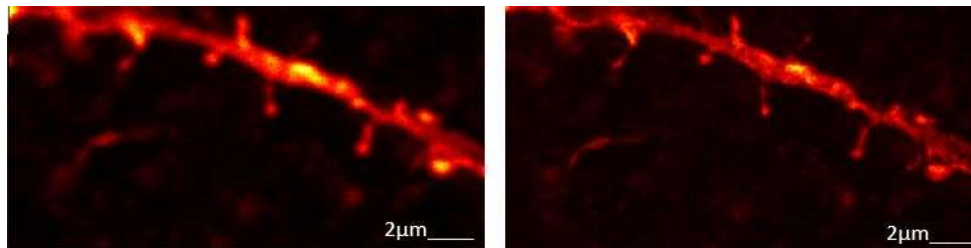


Abbildung 12: Ausschnitt aus einer Bildgebung am STED-Mikroskop. Links: konfokale Bildgebung. Rechts: STED-Bildgebung. Darstellung in Maximumintensitätsprojektion. Skalenbalken: 2µm.

Des Weiteren wurden Übersichtsaufnahmen der Neurone in Projektion mit Hilfe des ImageJ-Plugins „mosaicJ“ angefertigt (Abbildung 13). Die 3D-Bildstapel der Neurone wurden mit der Konfokaltechnik mit Überlapp erfasst und mittels einem 30x Silikonölimmersionsobjektiv erfasst.

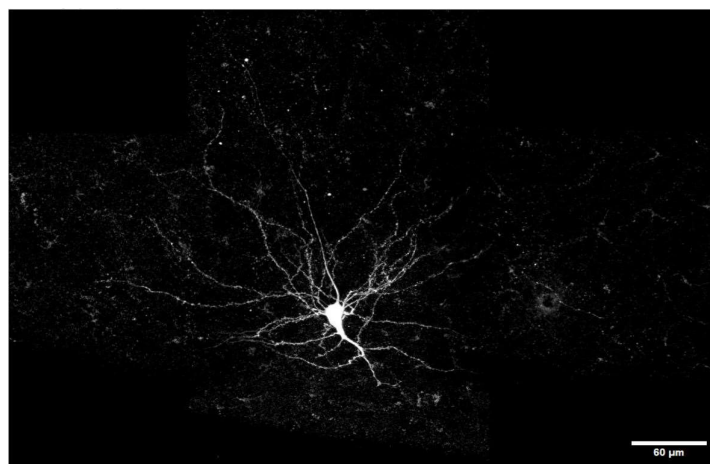


Abbildung 13: Übersichtsaufnahme eines Neurons. Konfokale Übersichtsaufnahme in Maximumintensitätsprojektion. Aufgenommen mit einem 30x Silikonölimmersionsobjektiv. Skalenbalken 60µm.

4.6 Skelettierung, Segmentierung und Dornen-Profile

Die Skelettierung der einzelnen Dendriten und Dornen wurde mit Hilfe der Software „webKnossos“ (Boergens, 2017) durchgeführt.

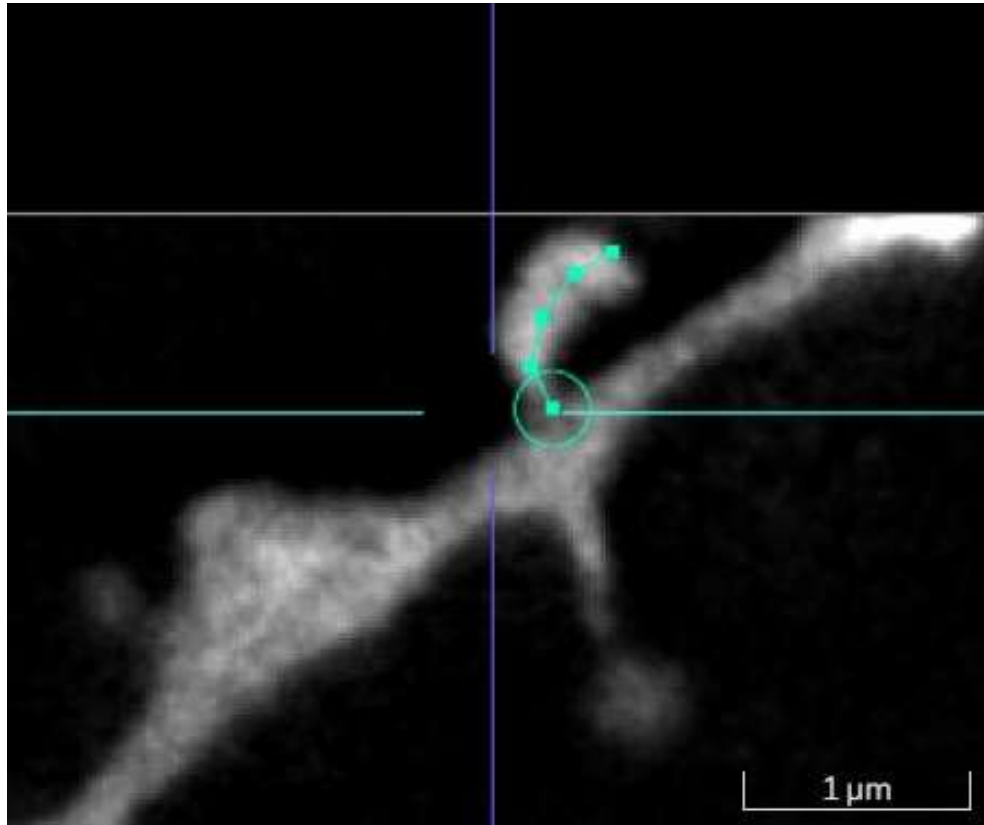


Abbildung 14: *Bearbeitung der Dornen innerhalb der Software „webKnossos“. Ausschnitt eines bearbeiteten Dendriten mit einem in grün markierten dendritischen Dorn. Skalenbalken: 1 µm.*

Zunächst wurden die Skelette der Dornen und Dendriten in jedem einzelnen Bildstapel markiert (Abbildung 14, markierter Dorn liegt in einer Ebene). Außerdem war es möglich sich durch die Bildebenen zu bewegen und so die Punkte durch die z-Achse in 3D zu setzen. Bei den Markierungen wurden Abkürzungen in das Kommentarfenster beigefügt, sodass es im darauffolgenden Programm mit der Software „Matlab“ benutzt werden kann und somit erkannt wird. Bei den Dornskeletten wurden die Startpunkte am Dendriten, das Ende des Halses, der Beginn des Kopfes und das Ende des Dornes manuell markiert. Bei den Dendrit-Skeletten wurden Dendrit-Start und Dendrit-Ende in den Kommentaren gekennzeichnet. Die Skelette der Dendriten und dendritische Dornen in den einzelnen Bildstapeln wurden anschließend mit Hilfe von Routinen in Matlab zusammengefügt.

Da in diesem Fall die Dendriten mit einer beträchtlichen Anzahl dendritischen Dornen besetzt waren, wurde nur jeder dritte Dorn betrachtet und bearbeitet.

Die Segmentierung basierte auf den entfalteten 3D-Datensätzen in Kombination mit den Skeletten aus „webKnossos“. Dies wurde mit Hilfe von Routinen in Matlab und unter Zuhilfenahme der zuvor markierten Skelette (webKnossos) vorgenommen. Die einzelnen zuvor markierten Dendriten und Dornen wurden manuell, entlang des Skelettes in den Bildebenebenen (xy), segmentiert, indem es so exakt wie möglich nachgezeichnet wurde. Aufgrund der geringeren Auflösung entlang der optischen Achse (z) wurde kein Versuch einer Volumenrekonstruktion unternommen. So war es möglich, jeden einzelnen dendritischen Dorn von insgesamt 570 manuell nachzuzeichnen.

Die Durchmesserprofile der dendritischen Dornen wurden bestimmt, indem der Durchmesser der segmentierten Dornen senkrecht zum Skelett etwa alle 20nm gemessen wurde. Der Kopfdurchmesser der Dornen wurde als der größte Durchmesser innerhalb des Kopfbereiches definiert. Wohingegen der Halsdurchmesser des Dornes als kleinster Durchmesser im Halsbereich bezeichnet wurde. Die Dorn-Länge wurde als die Länge entlang des 3D-Skeletts vom Befestigungspunkt bis zum Ende des Kopfes definiert.

4.7 Clusteranalyse

Die Clusteranalyse beruht auf einem hierarchischen Clustering und wurde mit dem Ward-Algorithmus, wie den euklidischen Abständen, in einem mehrdimensionalen Raum verwendet. Die Analyse wurde auf der Grundlage des Dornendurchmesserprofils und der Dornenlänge durchgeführt. Um das Durchmesserprofil von der Dornenlänge zu trennen, wurden die Profile neu abgetastet, sodass sie für jeden Dorn 100 Abtastpunkte erhalten. Somit stand die Form unabhängig von der Länge als Clusterkriterium zur Verfügung. Dies ist essentiell, um die einzelnen Profile der Dornen vergleichen zu können. Die Länge wurde dann als unabhängiges Merkmal in das Clustering einbezogen. Innerhalb des Verfahrens des hierarchischen Clustering wurden Untergruppen gebildet mit dendritischen Dornen, die in der Form einen geringen Unterschied aufwiesen. Dieses Vergleichsverfahren wurde jeweils in Untergruppen kontinuierlich weitergeführt. Dies wurde so lange ausgeführt, bis es einen logisch sichtbaren Unterschied der Clustergruppen gab. Das hierarchische Clustering wurde mit dem Ward-Algorithmus verwendet. Zur Darstellung typischer Durchmesserprofile wurde die Länge aller Profile innerhalb jedes Clusters auf die mittlere Länge skaliert.

4.8 Statistik

Statistische Unterschiede zwischen mehreren Gruppen wurden mit einem Kruskal-Wallis-Test auf einem Signifikanzniveau von 5% bewertet. Für alle statistischen Tests wurde Matlab verwendet.

Um auf signifikante Unterschiede in der Clusterverteilung zu testen, wurden Person's-Chi-Quadrat-Tests mit Matlab (Funktion `crosstab`) mit einem Signifikanzniveau von 5% durchgeführt. Es wurde eine konservative Korrektur für Mehrfachvergleiche unter Verwendung der Bonferroni-Korrektur angewandt. Unterschiedliche Bonferroni-Korrekturen wurden für die einzelnen Neurone unter ihren Dendriten (je drei paarweise Vergleiche) und für den Vergleich aller Neurone mit ihren Dendriten (36 paarweise Vergleiche) verwendet.

Alle Matlab Programme und Routinen wurden von Jun. Prof. Dr. Marcel Lauterbach selbst programmiert und für die Dissertationsarbeit zur Verfügung gestellt. An einigen Stellen wurden die Routinen in Matlab verändert und angepasst.

5 Ergebnisse

Die Dissertationsarbeit untersucht anhand von 570 dendritischer Dornen im Mauscortex die homogene beziehungsweise inhomogene Verteilung der dendritischen Dornen auf unterschiedlichen Dendriten. So wurde untersucht, ob eine Dendritenspezifität der dendritischen Dornen vorliegt. Dafür wurden jeweils drei Dendriten einer Zelle nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Am Ende standen insgesamt drei Neurone (Abbildung 15), neun Dendriten und 570 Dornen zur Verfügung. Des Weiteren stammten alle Neurone aus einer Maus, um eine „inter-Maus-Variabilität“ auszuschließen. So konnten eventuell bestehende Unterschiede zwischen verschiedenen Individuen einer Tierart ausgegrenzt werden.

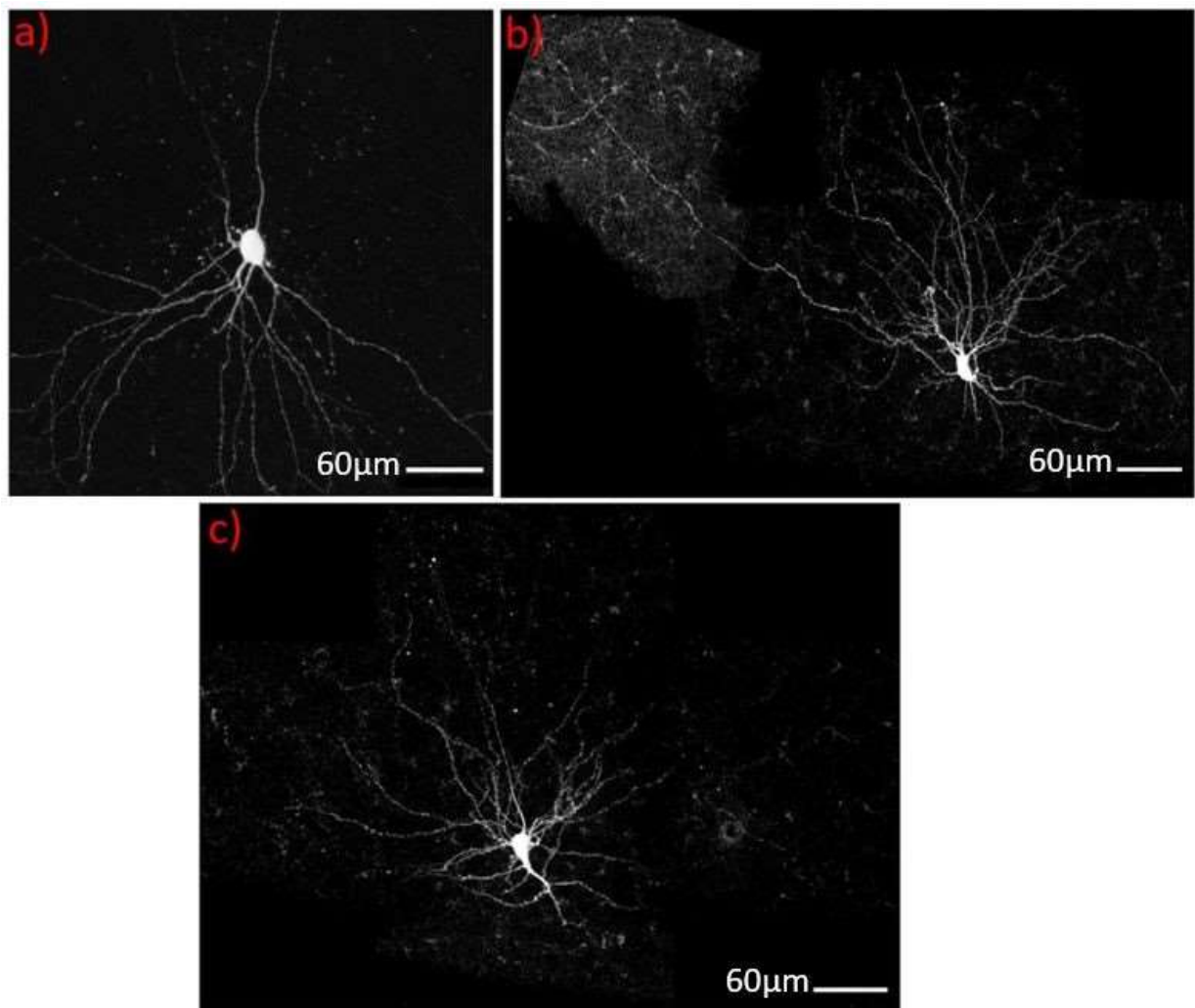


Abbildung 15: Übersichtsaufnahmen der drei Neurone. a) Neuron 1, b) Neuron 2, c) Neuron 3. Aufgenommen in der konfokalen Technik mittels einem 30x Silikonölimmersionsobjektiv. Dargestellt in Maximumintensitätsprojektion. Skalenbalken: 60µm.

Nach der cervicalen Dislokation und anschließender Enthauptung der Maus wurden die Hirnschnittpräparate durch einen speziellen Zuschnitt angefertigt. Die Zellen wurden schließlich mit Biocytin unter Zuhilfenahme der Patch-Clamp-Technik befüllt. Nach der Fixierung der Schnitte in 4% Paraformaldehyd wurden diese mit dem Fluorophor Atto 647N angefärbt. Anschließend wurden die Präparate mit der Substanz Mowiol eingebettet.

Nachfolgend wurden an den einzelnen Hirnschnittpräparaten die angefärbten Neurone gesucht. Nach der aufgefundenen Lokalisation der Neurone wurden diese mittels einem 30x Silikonölimmersionsobjektiv erfasst (Abbildung 15). So konnten mehrere 3D-Einzelbildaufnahmen mittels der Konfokaltechnik angefertigt werden. Die 3D-Einzelbildaufnahmen wurden jeweils mit einem geringen Überlapp aufgenommen, sodass es in der späteren Anordnung der Einzelbilder für eine bessere Orientierung beim Zusammenfügen sorgte. Vor dem Zusammenfügen der Einzelbilder wurden die 3D-Aufnahmen in eine Ebene überführt (Maximumintensitätsprojektion). Die Übersichtsaufnahmen der einzelnen Neurone sind schließlich durch die manuelle Anordnung der Einzelbilder mit Hilfe des ImageJ Plugin „mosaicJ“ entstanden (Abbildung 15).

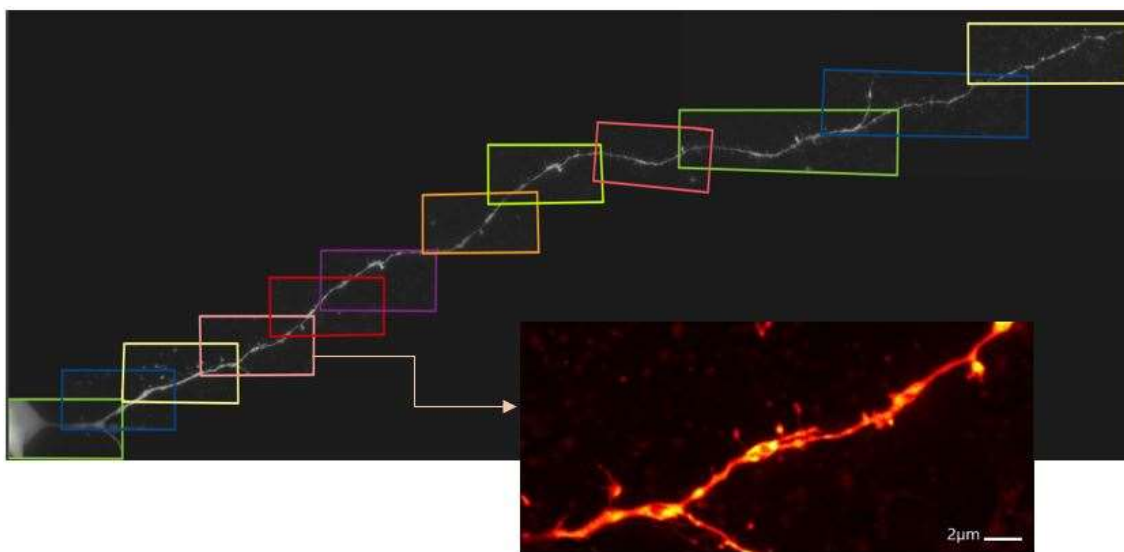


Abbildung 16: Übersichtsaufnahme eines zusammengesetzten Dendriten. Dendrit C, Neuron 1 mit STED-mikroskopischen Bildaufnahmen mittels einem 100x Silikonölimmersionsobjektiv. Die bunten Kästchen stellen die jeweilige Maximumintensitätsprojektion der einzelnen 3D-Datensätze dar. Eingefügt ist die vierte Maximumintensitätsprojektion eines 3D-Datensatzes ausgehend von Dendrit C, Neuron 1 mit einem Skalenbalken von 2µm.

Die einzelnen Dendriten mit ihren jeweiligen dendritischen Dornen wurden unter einem 100x Silikonölimmersionsobjektiv mit der STED-Technologie erfasst. Aufgenommen wurde ein 3D-Datensatz.

Die 3D-Einzelbildaufnahmen wurden jeweils mit einem geringen Überlapp aufgenommen, sodass es in der späteren Anordnung der Einzelbilder für eine bessere Orientierung sorgte. Die Bildaufnahmen wurden schließlich für die Übersichtsbilder der Dendriten in die Maximumintensitätsprojektion umgewandelt und mit Hilfe von ImageJ und seinem Plugin „mosaicJ“ zusammengefügt (Abbildung 16).

Es wurde die Tatsache ausgenutzt, dass eine einzelne Zelle mit hohem Kontrast markiert wurde („single-cell“-Aufnahme), so dass der gesamte Dendrit verfolgt werden konnte. Dadurch wurde das abgebildete Gesamtvolumen enorm reduziert. So konnten das Ausbleichen und die Menge der Daten reduziert werden. Die STED Mikroskopie ergibt eine höhere Auflösung für die Untersuchung der dendritischen Dornen, im Vergleich zur bisher verwendeten Konfokalmikroskopie. Dies ermöglichte einen genauen Einblick in die Morphologie der dendritischen Dornen. Nach der Aufnahme der Dendriten wurden die Bilderstapel mit Matlab Routinen entfaltet, um das Rauschen im Frequenzraum zu minimieren. Die entfalteten 3D-Datensätze wurden mit der Software „webKnossos“ bearbeitet. So war es mir möglich die Skelette jedes dritten Dornes und Dendriten manuell in jedem Bildstapel zu markieren.

Die aufgenommenen Dornen und Dendriten wurden anschließend mit Routinen in Matlab bearbeitet und analysiert (Abbildung 17).

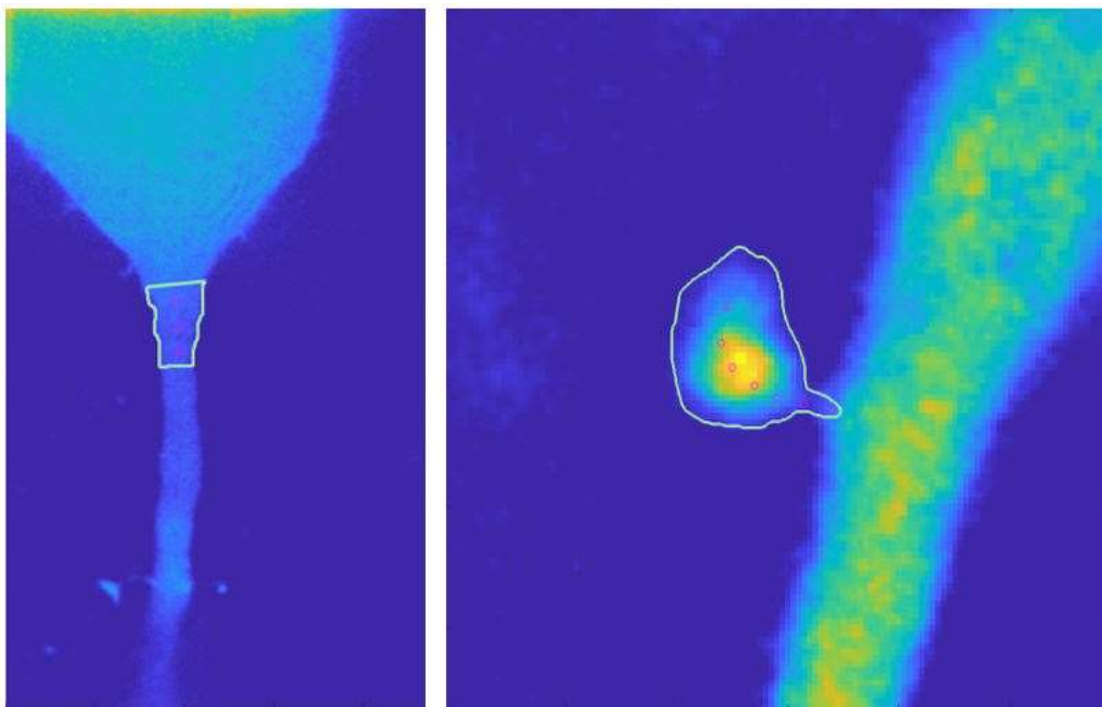


Abbildung 17: Darstellung der manuellen Segmentierung der Dornen und Dendriten mit Matlab-Routinen. Links: manuelles Nachziehen des Dendritenabschnitts in einer Ebene, die durch die drei roten Kreise angezeigt wird. Rechts: manuelles Nachziehen eines Dornes innerhalb einer Ebene, die durch die roten Kreise angezeigt wird. Dies beruht auf den zuvor entfalteten Datensätzen in Kombination mit den Markierungen in jeder Ebene aus „webKnossos“.

Im ersten Schritt konnten alle Dendriten- und Dornabschnitte manuell in jeder Bildebene auf den zuvor entfalteten Bilddaten nachgezeichnet werden. So wurden alle 570 dendritische Dornen in jeder Bildebene von Hand innerhalb der Matlab-Routine nachgezogen. Kombiniert wurden die zuvor in „webKnossos“ gesetzten Markierungen mit den zuvor entfalteten Bilddatensätzen. Die zuvor gesetzten Markierungen („webKnossos“) in einer Ebene wurden somit innerhalb Matlabs mit roten Kreisen angezeigt. Die Silhouette zum Nachzeichnen lieferten die entfalteten Datensätze. So wurden sowohl die zuvor gesetzten Markierungen aus „webKnossos“ mit den entfalteten Datensätzen übereinandergelegt. Dieses Vorgehen wurde so lange durchgeführt bis alle Dendriten und jeder von den insgesamt 570 markierten Dornen in jeder Bildebene von Hand nachgezogen wurden.

Im nächsten Schritt erfolgte eine Clusteranalyse, um die Morphologien der dendritischen Dornen in unterschiedliche Gruppen einzuteilen. Die Dornen wurden auf der Grundlage ihres Durchmesserprofils und ihrer Länge „geclustert“. Innerhalb des Verfahrens des hierarchischen Clustering wurden Untergruppen gebildet mit dendritischen Dornen, die in ihrer Gestalt einen geringen Unterschied aufwiesen. Dieses Vergleichsverfahren wurde jeweils in Untergruppen kontinuierlich weitergeführt, bis ein logisch sichtbarer Unterschied der Dornenklassen erkannt wurde. So konnte festgestellt werden, ob die dendritischen Dornen in ihrer Morphologie unterscheidbare Klassen bilden. Die Morphologien der hier analysierten Dornen konnten in vier verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 18).

Die Dornen wurden folgenden Untergruppen zugewiesen:

	mit „dünnem Hals“ und „hervorstehendem Kopf“
Dornen,	mit „kurzen Hals“ und „hervorstehendem Kopf“
	in „Filopodien“, mit dünnen, fadenförmigen Ausstülpungen
	mit „dünnem Hals“ und „großem Kopf“

Durch das Clustering werden unterschiedliche Hals- und Kopfformen, als auch die Inhomogenität von dendritischen Dornen aufgezeigt. So weisen einige kaum einen dendritischen Hals oder Kopf auf, andere hingegen einen sehr ausgeprägten Kopf und/oder Hals. Außerdem wird gezeigt, dass Dornen einiger Klassen sehr ausgeprägte Kopf- und Halsregionen haben (Abbildung 18, Cluster 4), während bei anderen Dornen die Köpfe fast ab dem Punkt, an dem sie aus dem Dendriten herausragen (Abbildung 18, Cluster 2), allmählich dicker werden.

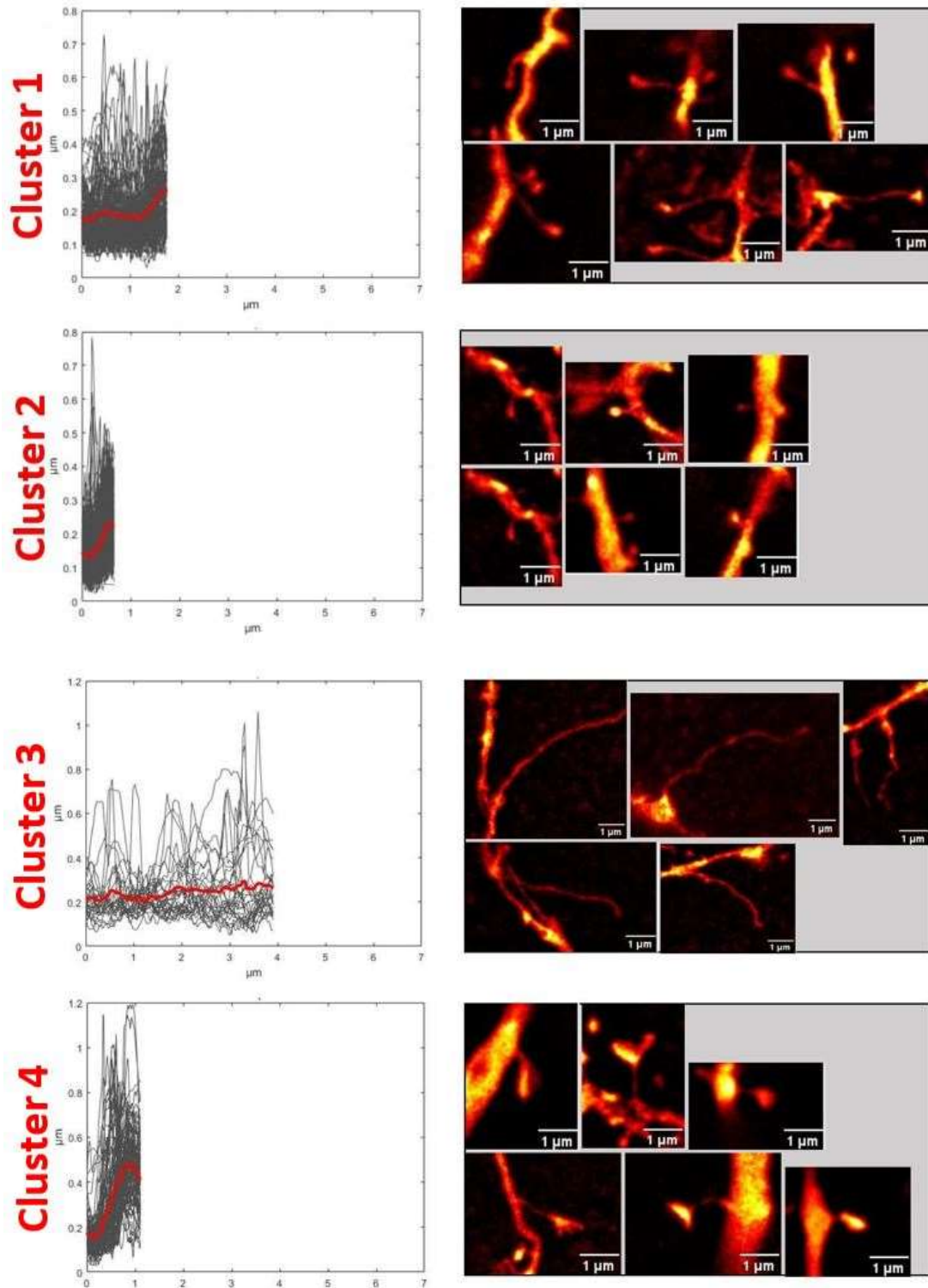


Abbildung 18: Darstellung der vier Clustergruppen. Cluster 1: Dornen mit dünnen Hals und hervorstehendem Kopf. Cluster 2: kurze Dornen mit hervorstehendem Kopf. Cluster 3: Filopodien. Cluster 4: Dornen mit dünnen Hals und großem Kopf. Skalenbalken: 1 µm. Linke Seite der Abbildung zeigt die Durchmesserprofile (schwarz) und das durchschnittliche Profil (rot) der Klassen. Rechte Seite der Abbildung zeigt repräsentative Beispiele für jede Klasse in Maximumintensitätsprojektion.

Angesichts dieser Inhomogenität der dendritischen Dornen ist es interessant herauszufinden, ob die verschiedenen Dornen homogen über alle Dendriten verteilt sind oder die verschiedenen Klassen dendritenspezifisch sind. Die Analyse der relativen Häufigkeit der verschiedenen Dornenklassen auf den einzelnen Dendriten ergab eine ungleichmäßige Verteilung. Es wurde festgestellt, dass Dornen einer bestimmten Klasse nicht mit gleicher Wahrscheinlichkeit auf allen Dendriten vorhanden sind, selbst nicht innerhalb derselben Zelle (Abbildung 19, a)).

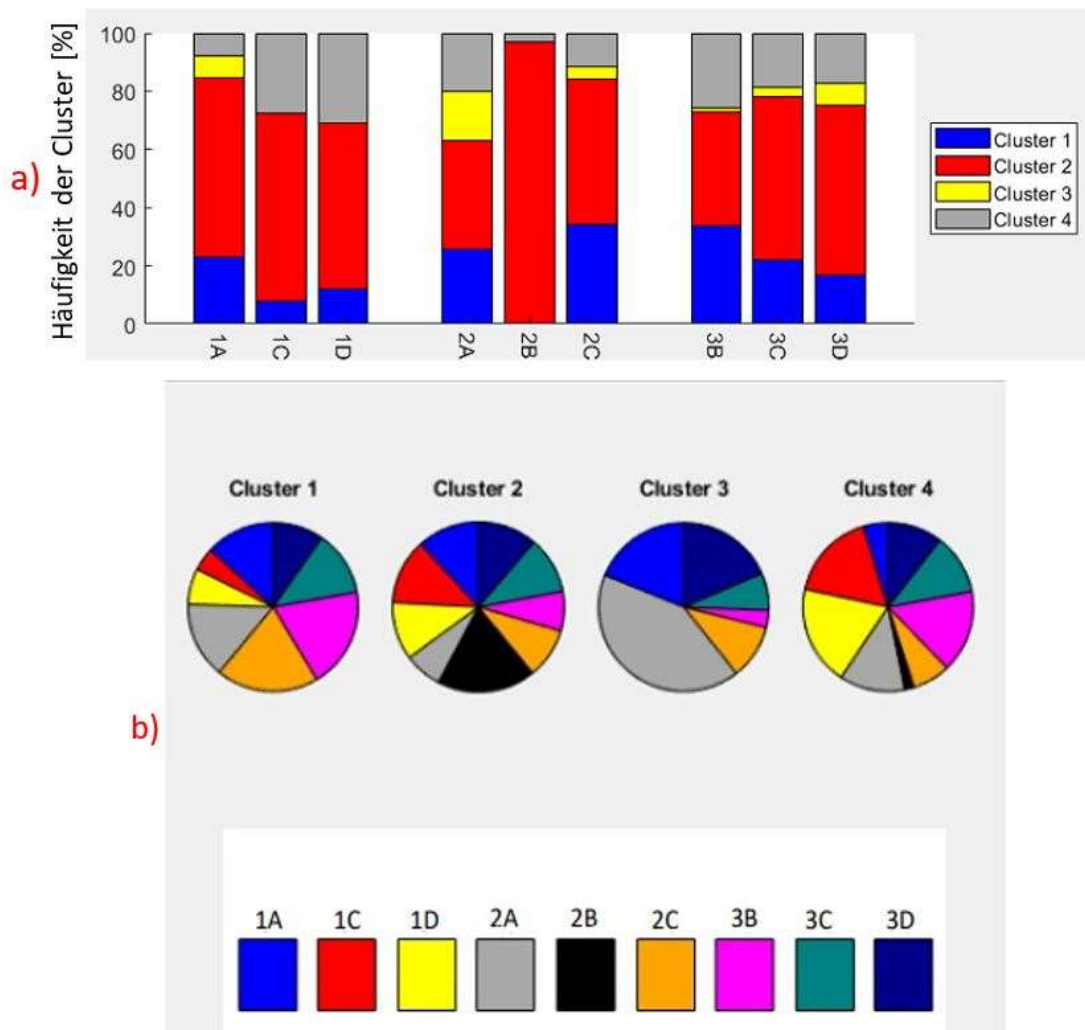


Abbildung 19: Dornen sind inhomogen auf den Dendriten verteilt. a) relative Häufigkeit der Cluster-Klassen auf verschiedenen Dendriten. b) Verteilung von dendritischen Dornen verschiedener Klassen auf jedem Dendriten.

Die Verteilung der dendritischen Dornen der verschiedenen Klassen auf jedem Dendriten ist auch für jeden Dendriten unterschiedlich (Abbildung 19, b)). Folglich ist die Verteilung der Klassen auf den verschiedenen Dendriten der verschiedenen Zellen unterschiedlich.

Schließlich wurde der „Pearson’s Chi-Quadrat“-Test zur Untersuchung der Unterschiede in jeder einzelnen Zelle herangezogen.

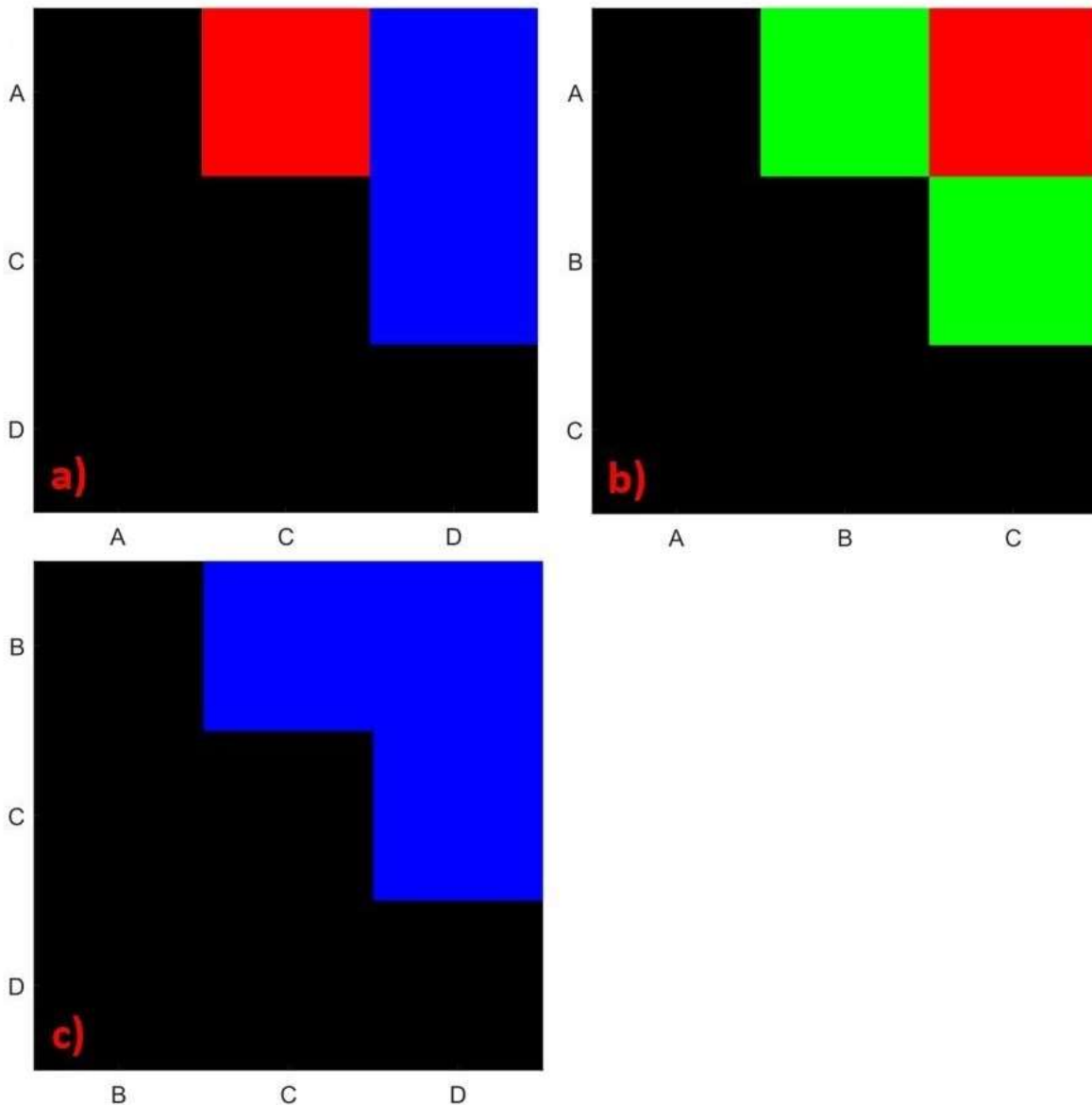


Abbildung 20: "Pairwise Person's Chi-Square"-Test zeigt signifikante Unterschiede zwischen der Verteilung der Cluster-Klassen auf den einzelnen Dendriten. Kodierung der Farben: $p \leq 0.05$ rot, $p \leq 0.01$ gelb, $p \leq 0.001$ grün, $p > 0.05$ blau. a) -c) zeigt den Vergleich der Dendriten innerhalb jeder Zelle.

Es zeigte sich, dass die Dornenklassen auf den Dendriten der ersten beiden Zellen unterschiedlich sind (Abbildung 20, a) und b)). Die zweite Zelle (Abbildung 20, b)) zeigt sich mit einem hoch signifikanten Unterschied zwischen Dendrit C und B und Dendrit A und B ($p \leq 0.001$), als auch mit einem signifikanten Unterschied zwischen Dendrit A und C ($p \leq 0.05$). Die erste Zelle (Abbildung 20, a)) stellt einen Unterschied zwischen Dendrit C und A dar ($p \leq 0.05$).

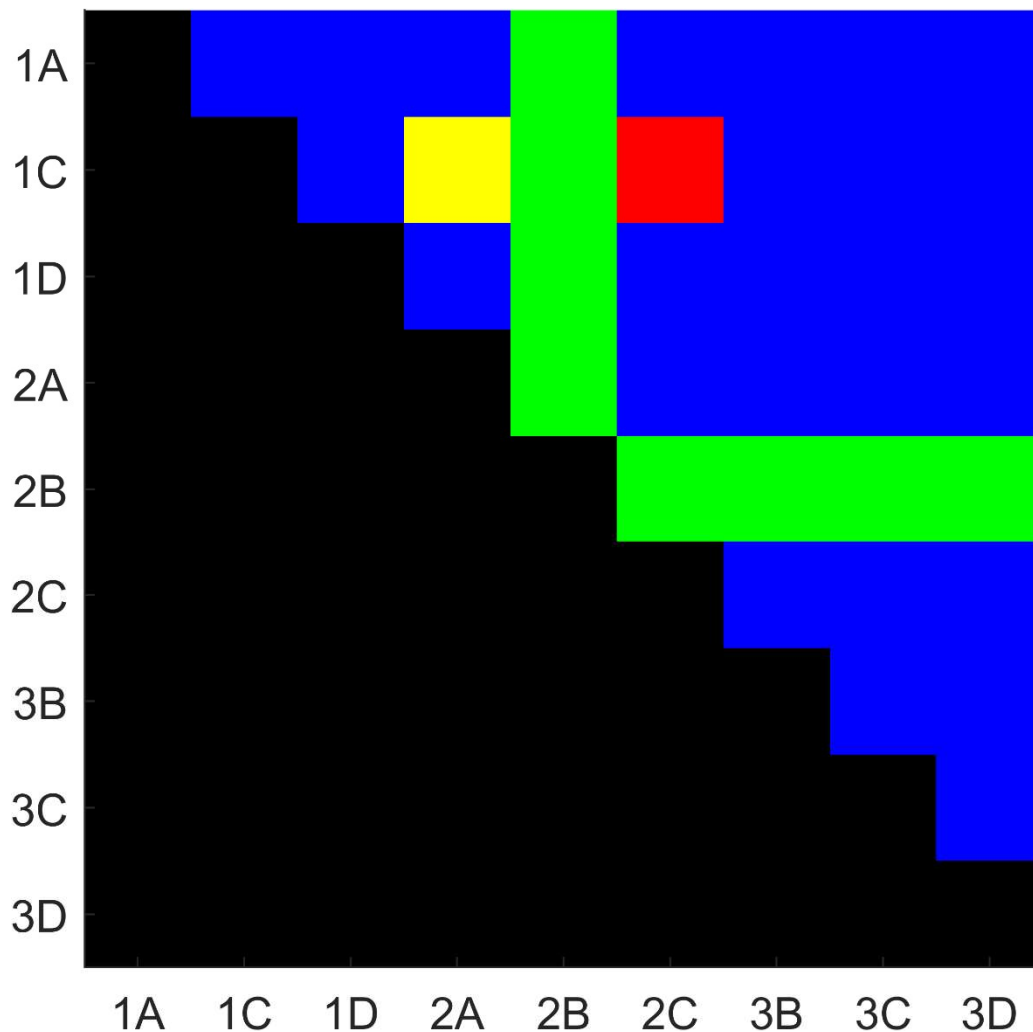


Abbildung 21: "Pairwise Person's Chi-Square"-Test zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich aller Dendriten über alle Zellen hinweg. Kodierung der Farben: $p \leq 0.05$ rot, $p \leq 0.01$ gelb, $p \leq 0.001$ grün, $p > 0.05$ blau.

Vergleicht man die Dornenzusammensetzung an den verschiedenen Dendriten über alle Zellen hinweg, so wird auch der Unterschied in der Dornenzusammensetzung von Zelle 2 (2B) zu 1 und 3 ($p \leq 0.001$) deutlich (Abbildung 21), als auch zwischen 1C zu 2A ($p \leq 0.01$) und 1C zu 2C ($p \leq 0.05$).

Um ein $\alpha_{\text{gesamt}} = 5\%$ (Signifikanzniveau) zu erreichen wurden die Mehrfachvergleiche für die einzelnen Neurone mit jeweils 3 paarweisen Vergleichen (Abbildung 20) und für den Vergleich aller Dendriten über alle Zellen hinweg mit 36 Vergleichen (Abbildung 21) mit unterschiedlichen Bonferroni-Korrekturen korrigiert, um der Alphafehler-Kumulierung entgegenzuwirken.

Nachfolgend wurde geprüft, ob sich Unterschiede zwischen den Dornen auf den verschiedenen Dendriten in messbaren Größen zeigen. So wurde die Dornenmorphologie durch drei Merkmale veranschaulicht. Die ausgewählten Merkmale sind die Kopfbreite, die Halsbreite und das Verhältnis Kopfbreite-Halsbreite. Des Weiteren wurden die Dornenlänge und die Dornendichte betrachtet.

Bei zwei von drei analysierten Zellen unterscheiden sich die Kopfbreite, die Halsbreite und das Verhältnis zwischen Kopfbreite-Halsbreite (Abbildung 22). Bei einer Zelle die Dornenlänge (Abbildung 23) an mehreren Dendriten derselben Zelle. Auch in Bezug auf die Dornendichte unterschieden sich zwei Zellen innerhalb ihrer Dendriten (Abbildung 24).

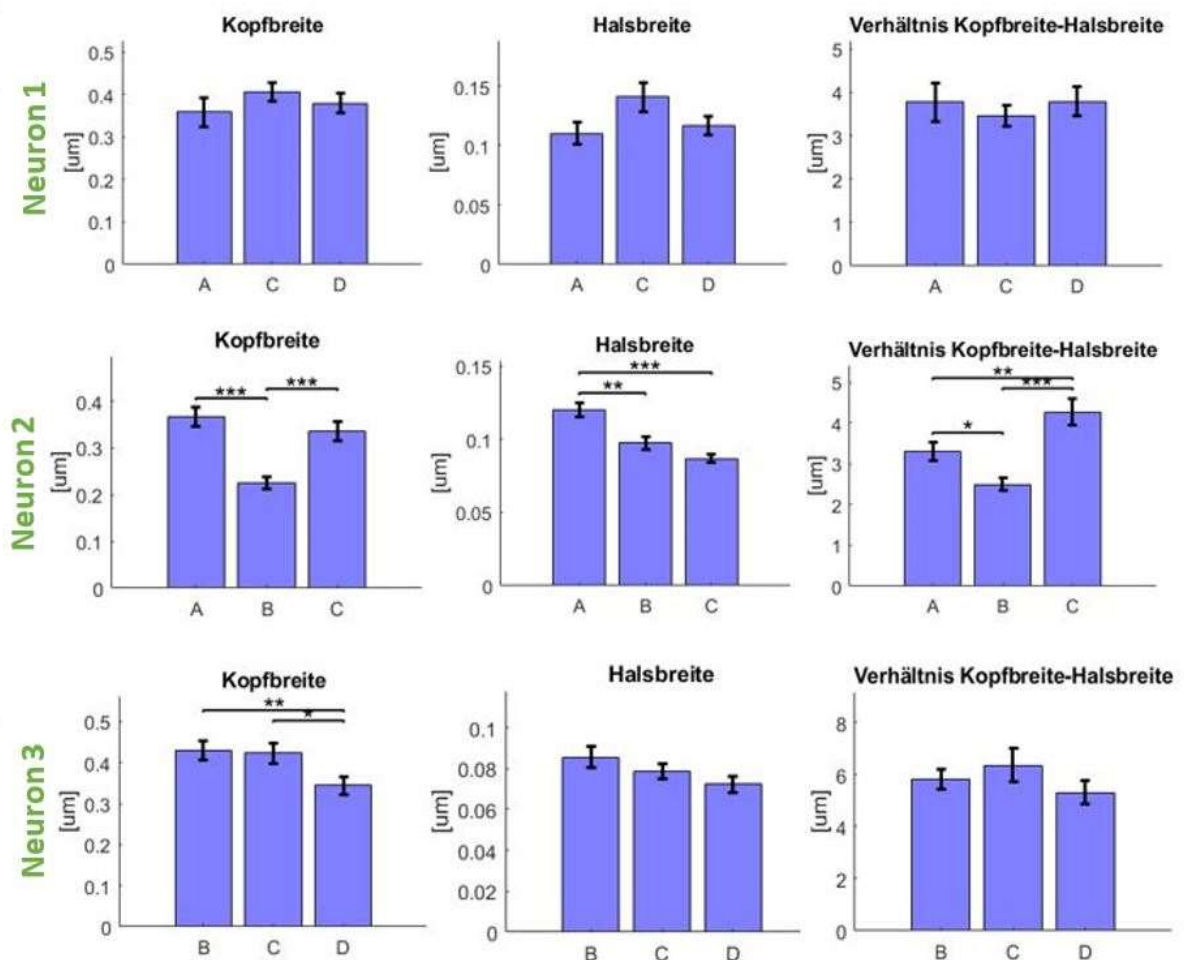


Abbildung 22: Die Merkmale der Dornen variieren auf verschiedenen Dendriten. Die Parameter der Dornen sind auf den Dendriten mancher Neurone signifikant unterschiedlich. Die Kopfbreite unterscheidet sich zwischen verschiedenen Dendriten. Die Halsbreite unterscheidet sich zwischen verschiedenen Dendriten. Das Verhältnis Kopfbreite zu Halsbreite unterscheidet sich zwischen verschiedenen Dendriten. Sternkodierung: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

So zeigt sich Neuron 2 (Abbildung 22, Neuron 2) hoch signifikant ($p \leq 0.001$) in der Kopfbreite zwischen Dendrit A zu B und B zu C. In der Halsbreite besteht ein hoch signifikanter Unterschied ($p \leq 0.001$) zwischen Dendrit A zu C und ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0.01$) zwischen Dendrit A zu B. Auch ergibt sich im Merkmal Verhältnis Kopfbreite-Halsbreite ein hoch signifikanter Unterschied ($p \leq 0.001$) zwischen Dendrit B zu C, ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0.01$) zwischen Dendrit A zu C und ein Unterschied ($p \leq 0.05$) zwischen Dendrit A zu B.

Neuron 3 lässt einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0.01$) in der Kopfbreite zwischen Dendrit B zu D, als auch einen Unterschied ($p \leq 0.05$) zwischen C zu D erkennen. In der Halsbreite und dem Verhältnis Kopfbreite-Halsbreite ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 22, Neuron 3). In Bezug zu Neuron 1 (Abbildung 22, Neuron 1) sind keine signifikanten Unterschiede in den Merkmalen erkennbar.

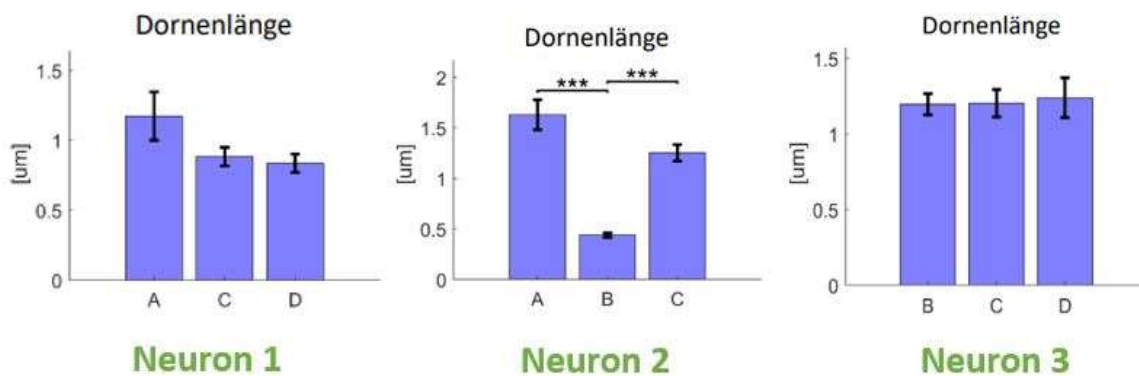


Abbildung 23: Vergleich der Länge der dendritischen Dornen innerhalb eines Neurons. Die Dornenlänge unterscheidet sich signifikant zwischen verschiedenen Dendriten von Neuron 2. Sternkodierung: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Auch im Merkmal der Dornenlänge lässt sich Neuron 2 wieder als hoch signifikant ($p \leq 0.001$) unterschiedlich zwischen Dendrit A zu B und B zu C darstellen (Abbildung 23, Neuron 2). Wohingegen Neuron 1 und 3 keine nennenswerten Unterschiede in diesem Merkmal aufweisen (Abbildung 23, Neuron 1 und 3).

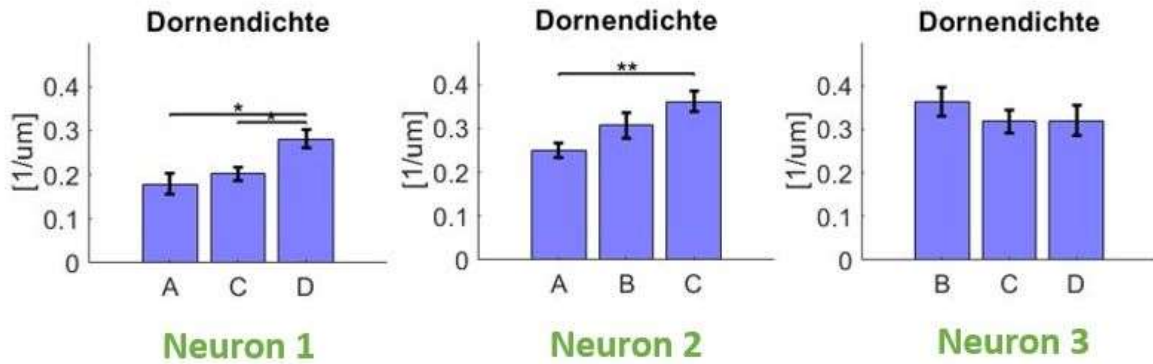


Abbildung 24: Vergleich der unterschiedlichen Dichte der dendritischen Dornen innerhalb eines Neurons. Die Dornendichte (lineare Dichte) unterscheidet sich signifikant zwischen verschiedenen Dendriten. Sternkodierung: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. Da nur jeder dritte Dorn verwendet wurde ist die tatsächliche Dornendichte dreimal so hoch.

Signifikante Unterschiede in der Dornendichte zeigen sich in Neuron 1 und 2. So liegt ein Unterschied in Neuron 1 von $p \leq 0.05$ zwischen Dendrit A zu D und C zu D vor (Abbildung 24, Neuron 1). Neuron 2 weist einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0.01$) zwischen Dendrit A zu C auf (Abbildung 24, Neuron 2). Wohingegen Neuron 3 keine signifikanten Unterschiede in der Dornendichte aufweisen kann (Abbildung 24, Neuron 3). Bei der Dornendichte ist zu beachten, dass nur jeder dritte Dorn berücksichtigt wurde. Somit ist die tatsächliche Dornendichte dreimal so hoch.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dendritische Dornen eine Dendritenspezifität aufweisen und nicht zufällig auf den Dendriten innerhalb der Zelle verteilt sind.

6 Diskussion

Das Ziel der Dissertation war der Nachweis einer Dendritenspezifität von Dornen auf einzelnen neuronalen Dendriten im Mausmodell. Grundlage hierfür war die detaillierte Analyse der Morphologie von insgesamt 570 dendritischen Dornen auf den einzelnen neuronalen Dendriten. Bei der Auswahl der Mauslinie wurden „Überschussmäuse“ aus einer ubiquitären Cre-Mauslinie verwendet, sodass im Sinne von „Replace“, „Reduce“, „Refine“, in diesem Fall „Reduce“, gehandelt werden konnte. Ein weiterer Aspekt bei der Auswahl der Mauslinie war, dass keine Auswirkungen auf die Morphologie zu erwarten waren. Mit Hilfe der hochauflösenden STED-Mikroskopie wurden komplette Dendriten mit ihren Dornen aufgenommen. Das Besondere war, dass nicht nur zufällige Ausschnitte verschiedener Dendriten aufgenommen und verglichen wurden, sondern komplette Dendriten als Ganzes. Dadurch war es möglich, nahezu komplette neuronale Dendriten abzubilden, was die Analyse und den Vergleich mehrerer Dendriten ermöglichte. Es konnte nicht nur festgestellt werden, dass die dendritischen Dornen in vier Formklassen eingeteilt werden können (Abbildung 18), sondern vor allem, dass die Verteilung dieser Dornklassen über die Dendriten hinweg nicht homogen ist, sondern die Dendriten eine spezifische Mischung der Dornenklassen aufweisen (Abbildungen 19, 20 und 21). Diese Individualität der einzelnen Dendriten zeigte sich auch in unterschiedlichen Merkmalen der Dornen. So zeigten sich Unterschiede in der Kopfbreite, der Halsbreite und dem Verhältnis Kopfbreite-Halsbreite von Neuron 2. Auch Neuron 3 zeigte Unterschiede in der Kopfbreite der dendritischen Dornen (Abbildung 22). Sie unterscheiden sich aber auch in Parametern, die weniger von möglichen Artefakten oder Aufnahme Fehlern abhängig sind. So zeigte sich Neuron 2 unterschiedlich in der Dornenlänge im Vergleich der untersuchten Dendriten (Abbildung 23). Auch die Dornendichte ist dendritenspezifisch. Es konnte gezeigt werden, dass sich Neuron 1 und 2 im Vergleich ihrer Dendriten in der Dornendichte unterscheiden (Abbildung 24).

Die Anzahl der Gruppeneinteilungen der dendritischen Dornen entspricht weitgehend mit der üblichen Einteilung in „dünne“, „pilzförmige“, „dicke“ und „Filopodien“ überein (Benavides-Piccione, 2013). Eine Studie am Reptilien- bzw. Schildkrötenmodell veröffentlichte eine Gruppeneinteilung in fünf verschiedene Klassen, die sie „Stocky“, „Dwarf“, „Club-like“, „Balanced“ und „Delicate“ nennen (Knobloch, 2023).

Die Einteilung der Dornen in Gruppen wurde in dieser Dissertationsarbeit durch hierarchisches Clustering vorgenommen.

Es ermöglicht eine genauere Analyse und könnte somit neue Informationen über synaptische Dornen liefern. Clustering identifiziert ähnliche Formen von Objekten, wobei die verschiedenen Formklassen durch die Struktur der Daten bestimmt werden. Verschiedene Cluster-Algorithmen liefern unterschiedliche Ergebnisse für denselben Datensatz, was die Interpretation der Daten stark beeinflussen kann. Die Clustering-Ansätze sollten weiterentwickelt werden, um in Zukunft die Untersuchung von dendritischen Dornen hinsichtlich Funktion und Struktur zu erleichtern. So könnten die dendritischen Dornen auch im Hinblick auf mögliche Pathologien untersucht werden (Pchitskaya, 2020). Im Gegensatz zur üblichen Einteilung konnten jedoch mehr Details, insbesondere die Halsregion der Dornen, besser beurteilt werden (Abbildung 18). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass hier mit hochauflösender STED-Mikroskopie gearbeitet worden ist, anstelle der klassischen Zwei-Photonen-Mikroskopie. Die Unterschiede in der Größe und Form der Dornen könnten Auswirkungen auf die synaptische Funktion haben. Die Unterschiede in der Form der Dornen verändern die elektrischen und biochemischen Eigenschaften (Harris, 1988) und könnten somit die synaptische Stärke bestimmen (Araya, 2014). Unterschiede in der Form der Dornen könnten sich auch auf die synaptischen Verbindungen auswirken und somit die Stärke der Verbindungen zwischen verschiedenen Synapsen stark beeinflussen (Borczyk, 2019).

Des Weiteren sind die verschiedenen Dornentypen nicht zufällig über alle Dendriten eines Neurons verteilt, sondern unterliegen einer Dendritenspezifität (Abbildungen 19, 20 und 21). Die Dornzusammensetzung unterscheidet sich in einigen Zellen zwischen den Dendriten derselben Zelle, aber nicht in allen Zellen. Dazu ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Zellen zu erkennen. Eine spezifische Zusammensetzung der dendritischen Dornen auf jedem Dendriten wurde als grobe Einteilung für basale und apikale Dendriten von Pyramidenzellen veröffentlicht (Benavides-Piccione, 2013). Des Weiteren liegt eine Studie über die Morphologie von dendritischen Dornen im Schildkrötenmodell vor, in der gezeigt werden konnte, dass die Dornenmorphologie dendritenspezifisch ist (Knobloch, 2023). Die Form der Dornen ist entscheidend für ihre elektrischen/synaptischen Eigenschaften (Araya, 2014). Das Dornvolumen korreliert stark mit der Größe der postsynaptischen Dichte (Schikorski, 1999). Der Dornenhals spielt auch eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Kalziumdynamik (Holthoff, 2002). So kann der Dornenhals die Ausbreitung von Kalzium in den benachbarten dendritischen Schaft einschränken (Alvarez, 2007). In der vorliegenden Studie weisen die beobachteten Dendriten einen bestimmten Satz von Dornentypen auf. Dies könnte auf eine mögliche Spezialisierung einzelner Dendriten zur Informationsverarbeitung hinweisen (Larkum, 2008).

Einige Dendriten sind mit besonders vielen und/oder längeren Dornen versehen (Abbildungen 23 und 24). Dies könnte darauf hindeuten, dass diese Dendriten ein größeres Volumen an möglichen synaptischen Eingängen abtasten. Dass die Dornendichte eine besondere Rolle spielt, zeigt eine Studie an HE-Mäusen (hepatische Enzephalopathie). Diese zeigt, dass eine verminderte Dichte dendritischer Dornen mit kognitiven Beeinträchtigungen einhergeht (Chen, 2023).

Neben der statischen Morphologie gibt es zahlreiche Studien, die sich mit der Dynamik dendritischer Dornen befassen. So liegt vor, dass Dornen sehr dynamisch sein können und sich innerhalb von Minuten bis Stunden reversibel zwischen dünnen und pilzförmigen Morphologien verändern können (Dunaevsky, 1999). Einige Dornen erscheinen und verschwinden, andere bestehen mindestens einen Monat. Große Dornen bestehen meist Wochen bis Monate, während kleine Dornen vergänglich sind (Holtmaat, 2005). So könnte die Morphologie der einzelnen dendritischen Dornen ein Indiz sowohl über die Stabilität, als auch über die Stärke der Synapsen sein.

Auch die Funktion könnte im Zusammenhang mit der statischen Morphologie der Dornen stehen. So wurden spezifische Veränderungen in der Morphologie der dendritischen Dornen beobachtet, wenn die Synapsenstärke reduziert wurde (Lang, 2004). Bisherige Daten deuten darauf hin, dass eine dynamische Verringerung des Dornenhalswiderstands einen lokalen Anstieg der synaptischen Leitfähigkeit kompensieren kann.

Es existieren Studien darüber, dass die Anomalien der Dornenmorphologie mit Erkrankungen des menschlichen Gehirns, einschließlich geistiger Verwirrtheit und neurodegenerativer Erkrankungen in Verbindung stehen kann (Fiala, 2002).

Darüber hinaus können morphologische Veränderungen mit Lernparadigmen bis hin zum hormonellen Status korreliert sein (Comery, 1996). Auch die Größe des Dorns scheint eine Rolle zu spielen. Die Vergrößerung des Dorns drückt mit muskelähnlicher Kraft auf die präsynaptische Endplatte und verstärkt so die Substanzfreisetzung und wirkt als mechanische Kraft (Kasai, 2023).

Die einzigartige Form der dendritischen Dornen könnte eine Struktur darstellen, die als biochemisches, elektrisches und mechanisches Kompartiment dient (Harris, 1988; Harris, 1989; Yuste, 1995; Yuste, 2000; Nusser, 2001).

Die STED-Mikroskopie ist nach wie vor eine einzigartige Methode für die Bildgebung von Hirngeweben.

Die STED-Technologie kann nicht nur dynamische, hochauflösende Bilder, z.B. von nicht-neuronalen Prozessen liefern (Steffens, 2021), sondern löst auch neuronale Strukturen mit hohem Kontrast auf (Rangaraju, 2019). Dennoch sollte diese hochauflösende Mikroskopietechnik vor allem im Zusammenhang mit lebendem Hirngewebe eingesetzt werden, um die Erforschung im Bereich der neurologischen Erkrankungen weiter anzutreiben. Außerdem könnte die STED-Mikroskopie Videoaufnahmen von lebenden Zellen und deren dendritischen Dornen ermöglichen. Allerdings treten bei der STED-Technologie auch gewisse Limitationen auf. Die Aufnahme großer Bildfelder unter Verwendung der Einzelpunktabtastung erfordert einen erheblichen Zeitaufwand, was die Anwendung dieses Verfahrens zur Untersuchung rascher biologischer Prozesse begrenzt (Bergmann, 2015). Unter anderem sollte die Entwicklung der theoretischen Auflösung auch unter weniger idealen optischen Bedingungen vorangetrieben werden, sodass es auch in dickeren Zellen und Geweben zu einer guten Auflösung kommen kann (Prakash, 2022). Darüber hinaus ist insbesondere der Abregungslaser der STED-Technologie hochenergetisch. Dadurch werden Gewebe und Farbstoffe hohen Belastungen ausgesetzt, die zu einem Photobleaching führen könnten (Oracz, 2017).

Ein wichtiger Schritt dieser Arbeit für die Darstellung der Zellen am STED-Mikroskop war die zuvor erfolgte Füllung der Neurone unter Zuhilfenahme der Patch-Clamp-Technik. Diese Technik ermöglichte es, sogenannte „single-cell“-Aufnahmen (Bildgebung einer einzelnen Zelle) der Neurone anzufertigen (Abbildung 15). Mit Hilfe dieser Technik wurde die Membranregion der Zelle angesaugt und durch einen Saugstoß zum Platzen gebracht, ohne dass die Abdichtung zum Neuron verloren ging. Auf diese Weise konnte die Substanz in die Zelle eingebracht werden (Neher, 1992). Vorteil an dieser Arbeitsweise ist das „sparse-labeling“ (Markierung einzelner Zellen). Somit konnte nur eine Zelle befüllt und später unter dem STED-Mikroskop eine exakte „single-cell“-Aufnahme angefertigt werden. Nachteilig an der Patch-Clamp-Technik ist der immense Zeitaufwand und die niedrige Erfolgsrate beim Befüllen der Zellen.

Ein denkbarer nächster wissenschaftlicher Schritt, der sich an diese Dissertationsarbeit anschließen könnte, besteht darin, die Morphologie in Verbindung mit der dynamischen Verteilung von Calciumströmen an lebenden Hirnschnittpräparaten unter Verwendung des STED-Mikroskops zu untersuchen. Dadurch wäre es möglich, sowohl die Morphologie als auch die Dynamik im direkten Zusammenhang zu betrachten.

Zusammenfassend wird hier über eine detaillierte Analyse der Morphologie der Dornen und erstmalig über die Dendritenspezifität von dendritischen Dornen an einzelnen neuronalen Dendriten am Säuger- beziehungsweise Mausmodell berichtet.

7 Literaturverzeichnis

Alvarez V, A, & Sabatini, B, L. Anatomical and Physiological Plasticity of Dendritic Spines. *Annual Review of Neuroscience*. 2007. 30: 79-97.

Amos W, B, & White, J, G. How the Confocal Laser Scanning Microscope entered Biological Research. *Biology of the Cell*. 2003. 95: 335-342.

Araya R, Vogels, T, P, & Yuste, R. Activity-dependent dendritic spine neck changes are correlated with synaptic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2014. 111: E2895-E2904.

Arellano J, I, Benavides-Piccione, R, DeFelipe, J, & Yuste, R. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front. Neurosci*. 2007. 1: 131-143.

Ballesteros-Yanez I, Benavides-Piccione, R, Elston, G, N, Yuste, R, & DeFelipe, J. Density and morphology of dendritic spines in mouse neocortex. *Neuroscience*. 2006. 138: 403-209.

Benavides-Piccione R, Fernaud-Espinosa, I, Robles, V, Yuste, R, & DeFelipe, J. Age-based comparison of human dendritic spine structure using complete three-dimensional reconstructions. *Cerebral Cortex*. 2013. 23: 1798-1810.

Bergmann F. Closing in on video-rate STED nanoscopy. *Nature Methods*. 2015. 12: 173.

Boergens K. M, Berning, M, Bocklisch, T, Bräunlein, D, Drawitsch, F, Frohnhof, J, Herold, T, Otto, P, Rzepka, N, Werkmeister, T, Werner, D, Wiese, G, Wissler, H, & Helmstaedter, M. webKnossos: efficient online 3D data annotation for connectomics. *Nature Methods*. 2017. 14: 691-694.

Borczyk M, Sliwinska, M, A, Caly, A, Bernas, T, & Radwanska, K. Neuronal plasticity affects correlation between the size of dendritic spine and its postsynaptic density. *Scientific Reports*. 2019. 9: 1693.

Chen M, Yuxin, J, Xueling, L, Jiong, L, Chunyi, T., Huijie, Z, Xiaobing, G, Guangyin, Y, Guoqing, G, & Zhang, J. Enriched environment ameliorates learning and memory deficits in hepatic encephalopathy mice by restoration of the structure of dendrites and dendritic spines. *ScienceDirect, Brain Research*. 2023. 1804.

Comery T, A, Stamoudis, C, X, Irwin, S, A, & Greenough, W, T. Increased Density of Multiple-Head Dendritic Spines on Medium-Sized Spiny Neurons of the Striatum in Rats Reared in a Complex Environment. *Neurobiology of Learning and Memory*. 1996. 66: 93-96.

Cremer C. Lichtmikroskopie unterhalb des Abbe-Limits. Lokalisationsmikroskopie. *Physik in unserer Zeit*. 2011. 42: 21-29.

DeFelipe J, & Farinas, I. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology*. 1992. 39: 563-607.

Denk W, & Horstmann, H. Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLOS Biology*. 2004. 2: e329.

Dunaevsky A, Tashiro, A, Majewska, A, & Yuste, R. Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *PNAS*. 1999. 96: 13438-13443.

Fiala J, C, Spacek, J, & Harris, K, M. Dendritic Spine Pathology: Cause or Consequence of Neurological Disorders? *Brain Research Reviews*. 2002. 39, 29-54.

Frederik P, M, Stuart, M, C, A, Bomans, P, H, H, Busing, W, M, Burger, K, N, J, & Verkleij, A, J. Perspective and limitations of cryo-electron microscopy. *Journal of Microscopy*. 1991. 161: 253-262.

Harris K, & Stevens, J. Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *The journal of Neuroscience*. 1988. 8: 4455-4469.

Harris K, & Stevens, J. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with references to their biophysical characteristics. *The Journal of Neuroscience*. 1989. 9: 2982-2997.

Hayashi Y, & Majewska, A, K. Dendritic spine geometry: functional implication and regulation. *Neuron*. 2005. 46, 529-532.

Hell S, W, & Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*. 1994. 19: 780-782.

Heuser J, E. The origins and evolution of freeze-etch electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy*. 2011. 60: 3-29.

Holthoff K, Tsay, D, & Yuste, R. Calcium dynamics of spines depend on their dendritic location. *Neuron* 33. 2002. Bde. 33: 425-437.

Holtmaat A, J, G, D, Trachtenberg, J, T, Wilbrecht, L, Shepherd, G, M, Zhang, X, Knott, G, W, & Svoboda, K. Transient and Persistent Dendritic Spines in the Neocortex In Vivo. *Neuron*. 2005. 45: 279-291.

Hurbain I, & Sachse, M. The future is cold: cyro-preparation methods for transmission electron microscopy of cells. *Biology of the Cell*. 2011. 103: 405-447.

Jones E, G, & Powell, T, P, S. Morphological variation in the dendritic spines of the neocortex. *J. Cell. Sci.* 1969. 5: 509-529.

Kasai H, Ucar, H, Morimoto, Y, Eto, F, & Okazaki, H. Mechanical transmission at spine synapses: Short-term potentiation and working memory. *Current Opinion in Neurobiology*. 2023. 80.

Kellogg D. A quick guide to light microscopy in cell biology. *MBoC Technical Perspective*. 2016. 27: 219-420.

Knobloch J, A, Laurent, G, & Lauterbach, M, A. STED microscopy reveals dendrite-specificity of spines in turtle cortex. *Progress in Neurobiology*. 2023. 231: 102541.

Laissue P, P, Alghamdi, R, A, Tomancak, P, Reynaud, E, G, & Shroff, H. Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging. *Nature Methods*. 2017. 14: 657-661.

Lang C, Barco, A, Zablow, L, & Zakharenko, S, S. Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation. *PNAS*. 2004. 101(47), 16665-16670.

Larkum M, E, & Nevian, T. Synaptic clustering by dendritic signalling mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*. 2008. 18: 321-331.

Lauterbach M, A. Finding, defining and breaking the diffraction barrier in microscopy - a historical perspective. *Optical Nanoscopy*. 2012. 1: Artikelnummer: 8.

Lauterbach M. Fast STED Microscopy. Reproduced with permission. Dissertation. 2009.

Neher E, & Sakmann, B. Die Erforschung von Zellsignalen mit der Patch-Clamp-Technik. *Spektrum der Wissenschaft*. 1992. 1: 48-56.

Neher E, & Sakmann, B. The Patch Clamp Technique. *Scientific American*. 1992. 266: 44-51.

Nimchinsky E. A, Sabatini, B. L, & Svoboda, K. Structure and Function of Dendritic Spines. *Annual Review of Physiology*. 2002. 64: 313-353.

Nusser Z, Naylor, D, & Mody, I. Synapse-specific contribution of the variation of transmitter concentration to the decay of inhibitory postsynaptic currents. *Biophysical Journal*. 2001. 80:1251-1261.

Oracz J, Westphal, V, Radzewicz, C, Sahl, S. J, & Hell, S, W. Photobleaching in STED nanoscopy and its dependence on the photon flux applied for reversible silencing of the fluorophore. *Scientific Reports*. 2017. 7: 11354.

Pchitskaya, E, & Bezprozvanny, I. Dendritic Spines Shape Analysis - Classification or Clusterization? Perspective. *Front. Synaptic Neurosci*. 2020. 12: Artikelnummer: 31.

Peddie C, J, & Collinson, L, M. Exploring the third dimension: Volume electron microscopy comes of age. *Micron*. 2014. 61: 9-19.

Penzes P, Cahill, M, E, Jones, K, A, VanLeeuwen, J, & Woolfrey, K, M. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *nature neuroscience*. 2011. 14: 285-293.

Peters A, & Kaiserman-Abramof, I, R. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Developmental Dynamics*. 1970. 127: 321-355.

Petty H, R. Fluorescence microscopy: Established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology. *Microscopy Research & Technique*. 2007. 70: 687-709.

Polzer C. Zweifarbigen-Zweiphotonen STED-Mikroskopie. Dissertation. 2019. 1: 15-18.

Prakash K, Diederich, B, Heintzmann R, & Schermelleh, L. Super-resolution microscopy: a brief history and new avenues. *The Royal Society Publishing*. 2022. A380: 20210110.

Preibisch S, Saalfeld, S, & Tomancak, P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics*. 2009. 25: 1463-1465.

Ramón y Cajal, S. Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev. Trim. Histol. Norm*. 1888. 1: 1-10.

Rangaraju V, Lauterbach, M, A, & Schuman, E, M. Spatially stable mitochondrial compartments fuel local translation during plasticity. *Cell*. 2019. 176: 73-84. e15.

Renz M. Fluorescence microscopy - A historical and technical perspective. *Cytometry Part A*. 2013. 83: 763-889.

Reuss M, Engelhardt, J, & Hell, S, W. Birefringent device converts a standard scanning microscope into a STED microscope that also maps molecular orientation. *Optics Express*. 2010. 18: 1049-1058.

Schikorski T, & Stevens, C, F. Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 1999. 96: 4107-4112.

Schwenk F, Baron, U, & Rajewsky, K. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Research*. 1995. 23: 5080-5081.

Segal M. Dendritic spines and long-term plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*. 2005. 6: 277-284.

Sieber J, J, & Schué, A. STED-Mikroskopie. *Lebendzellbeobachtung jenseits der Beugungsgrenze*. *Optik & Photonik*. 2010. 5: 36-39.

Sieber J, J, & Schué, A. STED-Mikroskopie. *Lebendzellbeobachtung jenseits der Beugungsgrenzen*. *Optik & Photonik*. Copyright Wiley-VCH GmbH. Reproduced with permission. 2010. 5: 36.

Song L, Hennink, E, J, Young, I, T, & Tanke, H, J. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*. 1995. 68: 2588-2600.

Sorra K, E, Harris, K, M. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*. 2000. 10: 501-511.

Steffens H, Mott, A, C, Li, S, Wegner, W, Svehla, P, Kan, V, W, Y, Wolf, F, Liebscher, S, & Willig, K, I. Stable but not rigid: Chronic in vivo STED nanoscopy reveals extensive remodeling of spines, indicating multiple drivers of plasticity. *Science Advances*. 2021. 7: eabf2806.

Vaughn J, E. Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system. *Synapse*. 1989. 3: 255-285.

Wang Y, Xu, R, Luo, G, & Wu, J. Three-dimensional reconstruction of light microscopy image sections: present and future. *Frontiers of Medicine*. 2015. 9: 35-45.

Willig K, I, Keller, J, Bossi, M, & Hell, S, W. STED microscopy resolves nanoparticle assemblies. *New Journal of Physics*. 2006. 8.

Yuste R, & Denk, W. Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature*. 1995. 375: 682-684.

Yuste R, Majewska, A, & Holthoff, K. From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nature Neuroscience*. 2000. 3: 653-659.

Yuste R. Dendritic Spines. *Massachusetts Institute of Technology*. 2010. 1: 1-7.

Zhang J, Davidson, R, M, Wei, M, & Loew, L, M. Membrane Electric Properties by Combined Patch Clamp and Fluorescence Ratio Imaging in Single Neurons. *Biophysical Journal*. 1998. 74: 48-53.

8 Danksagung

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Jun.-Prof. Dr. Marcel Lauterbach für das Thema der Arbeit und für die hervorragende Betreuung bedanken. Jun.-Prof. Dr. Marcel Lauterbach überzeugt nicht nur mit einer großen Gelehrtheit, sondern auch durch ein großes Herz für seine Doktoranden. Er ermutigte und förderte mich in der Zeit der Experimente.

Dank gilt auch der kompletten AG Lauterbach, die mir bei der Durchführung meiner Experimente mit Rat zur Seite gestanden hat. Ihr habt mich sehr freundlich aufgenommen und meine Zeit dort verschönert.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. David Stevens bedanken, der mir mit Rat und Tat während der Patch-Clamp-Versuche zur Seite gestanden hat.

Schließlich möchte ich mich bei Tobias Dancker aus der AG Lauterbach bedanken. Auch gilt Dank an Herr Ahmad Lotfinia aus der AG Lauterbach, dass er mir in der Funktion als zuständige Person für das Töten nach §4 Absatz 3 des Tierschutzgesetzes, das Mausmaterial nach der Tätigkeit der cervicalen Dislokation zur Verfügung gestellt hat und mir bei Fragen zur Seite gestanden hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei der gesamten Physiologie bedanken für die schöne Zeit und all die guten Gespräche und Tipps.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Lebensgefährten, die mich emotional in dieser Zeit unterstützt haben.

9 Lebenslauf

