

Aus der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen

Abteilung Kognitive Neurologie

**Putative synaptische Verbindungen zwischen
kortikalen Nervenzellen *in vivo***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Slabik, David Andreas

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Schwarz

2. Berichterstatter: Professor Dr. A Gharabaghi

Tag der Disputation: 06.05.2019

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Motivation	7
1.2	Neuroanatomische Grundlagen	8
1.2.1	Nervenzellen.....	8
1.2.2	Synapsen	10
1.3	Methodischer Überblick	12
1.4	Mikroskopie.....	15
1.5	Dekonvolution	16
1.6	Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Experimentdesign	19
2.2	Versuchstiere	19
2.3	Chemikalien	19
2.4	Materialien	21
2.5	Herstellung von Stammlösungen	21
2.6	Betäubung und Kraniotomie	24
2.7	Herstellung von Patch-Pipetten	26
2.8	Juxtasomale Aufzeichnung und Biocytin-Markierung	27
2.9	Transkardiale Perfusion, Fixation und Entfernung des Gehirns.....	31
2.10	Histologie.....	32
2.10.1	Schneiden des Gehirns.....	32
2.10.2	Cytochrom C Oxidase- und DAB-Färbung.....	33
2.10.3	Streptavidin, Alexa Fluor™ 488 conjugate-Färbung.....	36
2.10.4	Einbettung und Lagerung der Schnitte.....	36

2.11	Mikroskopie	37
2.11.1	Übersichtsbilder	37
2.11.2	Lichtmikroskopie	37
2.11.3	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	38
2.11.4	Nachscannen	38
2.12	Prozessieren der Bilddaten	39
2.13	3D Rekonstruktion	39
2.14	Bestimmung des Nervenzelltyps und Registrierung	41
2.15	Putative synaptische Verbindungen	42
2.15.1	Automatische Detektion	42
2.15.2	Manuelle Überprüfung	43
2.15.3	Statistik	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Überblick der Experimente	45
3.2	Abbildungen multipler Nervenzellen <i>in vivo</i>	45
3.3	3D Rekonstruktion	50
3.4	Bestimmung des Nervenzelltyps und Registrierung	65
3.5	Putative synaptische Verbindungen	68
3.5.1	Automatische Detektion	68
3.5.2	Manuelle Überprüfung	69
3.5.3	Prä- und postsynaptische Soma-Distanzen	73
3.5.4	Synaptischer Typ	76
3.5.5	Zelltyp-spezifische Kontakte	82
3.5.6	Axo-axonale Kontakte	92
3.6	<i>In vitro</i> vs. <i>in vivo</i>	92
4	Diskussion	94

4.1 <i>In vivo</i> Experimente	94
4.2 3D Rekonstruktion von Nervenzellen	95
4.3 Bestimmung des Nervenzelltyps und Registrierung	97
4.4 Putative synaptische Verbindungen	98
4.4.1 Automatische Detektion	98
4.4.2 Manuelle Überprüfung	98
4.4.3 Prä- und postsynaptische – Soma Distanzen	100
4.4.4 Synaptischer Typ	101
4.4.5 Zelltyp-spezifische Kontakte	103
4.5 <i>In vitro</i> vs. <i>in vivo</i>	104
4.6 Schlussfolgerung und Ausblick	105
5 Zusammenfassung	111
Referenzen	113
Erklärung zum Eigenanteil	120
Danksagung	121

1 Einleitung

1.1 Motivation

Die Anzahl und subzelluläre Verteilung synaptischer Verbindungen ist von grundlegender Bedeutung für das Verständnis neuronaler Signalverarbeitung. Die hierfür gebräuchliche Messmethode basiert auf elektrophysiologischer Ableitung zweier (oder mehrerer) Nervenzellen in akuten Hirnschnitten (*in vitro*). Diese Schnitte sind maximal 300 µm dick. Dadurch sind große Teile der Dendriten/Axone abgeschnitten. *In vitro* Paarableitungen liefern somit (i) ein unvollständiges Bild der synaptischen Verschaltung und (ii) sind auf nah beieinander liegende Zellen limitiert. Während meiner Doktorarbeit soll diese Methode daher auf das lebende Tier (*in vivo*) übertragen werden. Im Speziellen wird von zwei Zellen *in vivo* abgeleitet. Mittels Elektroporation werden diese dann mit Biocytin gefüllt. Nach Perfusion des Tieres und der Anfertigung histologischer Schnitte wird dem Biocytin mit Streptavidin ein fluoreszierendes Molekül beigefügt. Durch speziell entwickelte hochauflösende Mikroskopie- und automatisierte Bildverarbeitungsmethoden können dann Dendriten/Axone vollständig in 3D rekonstruiert werden. Auf diese Weise lassen sich putative synaptische Kontakte zweier Zellen (Überlappung dendritischer Dornen und axonaler Boutons) auffinden. Diese *in vivo* Strategie wird auf zwei Zelltypen in Schicht 4 und 5 des somatosensorischen Kortex der Ratte angewendet, welche in der Verarbeitung sensorischer Informationen der Tastaare eine zentrale Rolle spielen. Von besonderem Interesse ist, ob und wie die unterschiedlichen Zelltypen in dieser Schicht miteinander verbunden sind.

1.2 Neuroanatomische Grundlagen

1.2.1 Nervenzellen

Nervenzellen sind hoch-spezialisierte Zellen, die der Informationsübertragung dienen. Diese erfolgt im zentralen Nervensystem entweder chemisch oder elektrisch. Nervenzellen selbst unterscheiden sich in ihrer Größe, Form, Lokalisation, neurochemischer Spezifitäten und ihren Verknüpfungen untereinander. Sie bilden durch ihre Verbindungen zueinander Schaltkreise aus, die unterschiedliche Aufgaben im Gehirn ermöglichen. Es gibt Verschaltungen großer Gruppen von Nervenzellen einer Hirnregion, die mit einer anderen Gruppe an Nervenzellen einer anderen Hirnregion in Verbindung stehen (sog. „Makro-Schaltkreise“). Daneben existieren auch lokale Schaltkreise zwischen einzelnen Nervenzelltypen innerhalb einer Hirnregion (sog. „Mikro-Schaltkreise“).

Nervenzellen sind hoch-polarisierte Zellen. Das bedeutet, dass sie subzelluläre Strukturen mit hoch-spezialisierten Funktionen ausbilden. Insgesamt können so drei Hauptstrukturen einer Nervenzelle unterschieden werden (Hof *et al.*, 2014):

1. **Zellkörper (Soma, Perikaryon):** Er enthält den Nukleus und die wichtigsten zellplasmatischen Organellen (endoplasmatisches Retikulum, Neurofilamente).
2. **Dendriten:** Es handelt sich um einen oder mehrere Ausläufer des Zellkörpers, welche, je nach Zelltyp, Funktion und Lage, sehr spezifische Formen annehmen können. Es handelt sich um diejenigen Strukturen einer Nervenzelle, welche Informationen anderer Nervenzellen empfangen. Sie bilden damit den afferenten Teil der Signalübertragung. Die Dendriten einiger Nervenzelltypen besitzen zahlreiche kleine Ausstülpungen, sog. Dornfortsätze. Insbesondere große exzitatorische Pyramidenzellen weisen diese Ausstülpungen auf (vgl. Abb. 1). Sie haben eine durchschnittliche Größe von ca. 2 μm .

3. **Axon:** Ein einzelnes Axon verlässt den Zellkörper am Axonhügel, einer prominenten Ausbuchtung des Somas. Hier wird das Aktionspotential gebildet. Das Axon ist normalerweise sehr lang und kann zahlreiche Kollaterale ausbilden. Diese bilden Verknüpfungen mit zahlreichen benachbarten Zellen aus und/oder stehen als lange myelinisierte Projektionsaxone mit anderen Hirnarealen in Verbindung. Axone sind sehr dünn und weisen in ihrem Verlauf Verdickungen, sog. „Boutons“, auf (Abb. 1). Diese stehen

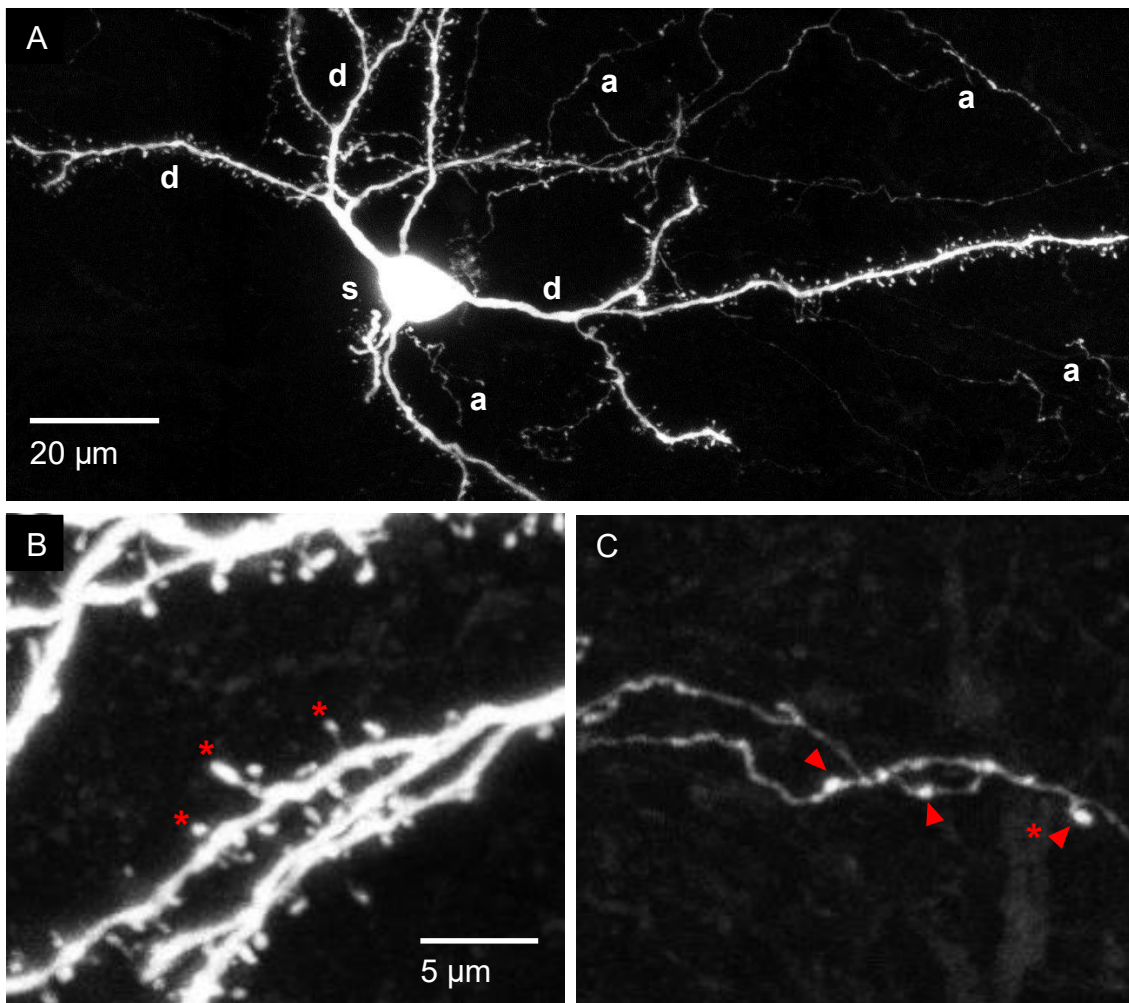


Abb. 1. Morphologische Komponenten einer Nervenzelle am Bsp. einer Schicht 4 Nervenzelle im Neokortex der Ratte. **A,** Übersicht einer Nervenzelle. Zahlreiche Dendriten (d) verlassen den Nervenzellkörper (s). Die feinen Strukturen im Hintergrund stellen die Axone (a) dar. **B,** Vergrößerung: Dicke Dendritenäste mit zahlreichen Ausstülpungen, den Dornfortsätzen (*). Die Dornenköpfe stehen dabei über einen schmalen Dornenhals mit dem Stamm des Dendriten in Verbindung. **C,** Vergrößerung: Dünne, unmyelinisierte Axone, welche typischerweise an ihrem kleineren Durchmesser von den Dendriten zu unterscheiden sind. In ihrem Verlauf finden sich Verdickungen, sog. „Boutons“ (Pfeilspitzen). *Pfeilspitze: Terminal-Bouton.

mit den Dendriten anderer Nervenzellen im Kontakt und dienen der Informationsübertragung. Sie bilden den efferenten Teil der Signalübertragung.

Dendriten und Axone sind über spezifische Elemente, den Synapsen, miteinander verknüpft und dienen der Signalübertragung zwischen zwei Nervenzellen.

1.2.2 Synapsen

Der Begriff „Synapse“ beschreibt einen morphologisch hoch-spezialisierten Kontakt zwischen zwei neuronalen Prozessen (Gray, 1959). Es handelt sich hierbei um sehr heterogene neuronale Elemente zur Signalübertragung, die sich anhand des Übertragungstyps (chemisch oder elektrisch), ihrer Funktion (exzitatorisch oder inhibitorisch), der beteiligten Rezeptoren (AMPA, Kainat, NMDA, Gaba_A, Gaba_B) oder der prä- und postsynaptischen Morphologie (Bouton, Dornfortsatz des Dendriten, etc.) einteilen lassen (Squire *et al.*, 2008). Auf präsynaptischer Seite befindet sich das Axon mit seiner typischen Verdickung, dem so genannten Bouton. Boutons werden in en-passant Boutons und terminale Boutons unterschieden. Erstere finden sich im Verlauf der Axonstrukturen. Terminale Boutons zweigen vom Hauptstamm des Axons ab und enden mit einem Bouton nach wenigen Mikrometern. Auf postsynaptischer Seite finden sich klassischerweise die Dendriten. Aber auch andere Strukturen der Nervenzelle können an einer synaptischen Verbindung beteiligt sein. Folgende synaptische Typen werden nach der postsynaptischen Zielstruktur unterschieden (Kandel and Siegelbaum, 2000):

Axo-dendritische Synapsen: Dieser Typ ist die häufigste Synapsenform. Dabei kann die Synapse entweder am Dornfortsatz oder am Stamm des Dendriten lokalisiert sein (Abb. 2 aus (LeVay, 1973)).

Axo-somatische Synapsen: Die postsynaptische Seite befindet sich auf dem Nervenzellkörper selbst. Inhibitorische Interneurone bilden typischerweise derartige Synapsen aus.

Axo-axonische Synapsen: Die postsynaptische Seite ist selbst ein Axon. Häufig findet sich die postsynaptische Seite am Axonhügel, dem Ort, an dem das Aktionspotential generiert wird.

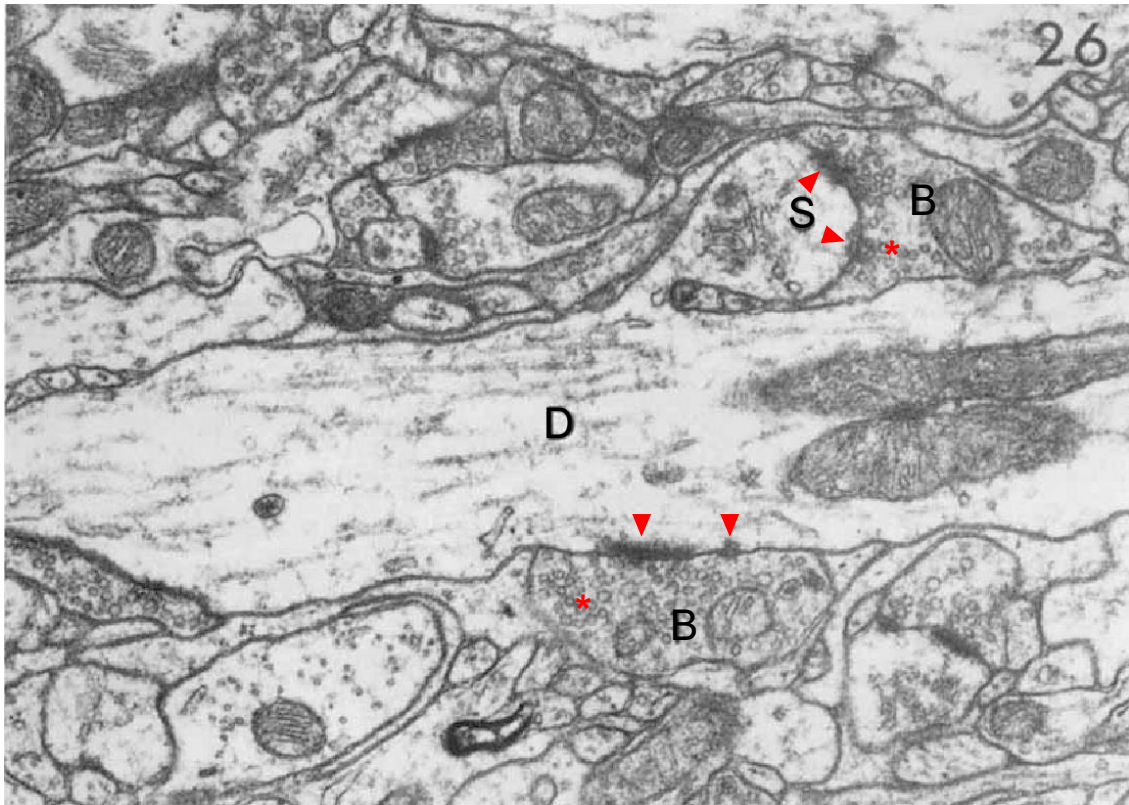


Abb. 2. Elektronenmikroskopische Aufnahme axo-dendritischer Synapsen zwischen Schicht 4 Nervenzellen im primären visuellen Kortex (Area 17) des Makaken (LeVay, 1973). In der Bildmitte befindet sich ein längst angeschnittener Dendritenstamm (D). An diesem ist ein Dornfortsatz (S) zu sehen. An beiden Strukturen werden Synapsen durch axonale Boutons ausgebildet (B). Innerhalb der Boutons finden sich zahlreiche Vesikel (*), in denen die Neurotransmitter abgespeichert sind. Auf der postsynaptischen Seite findet sich eine verdickte Membran, in der Ionenkanäle eingelagert sind.

Neben der Gliederung von Synapsen nach ihrer postsynaptischen Zielstruktur, lassen sich Synapsen auch nach morphologischen Kriterien in **Gray Typ 1** und **Gray Typ 2** Synapsen einteilen. Gray Typ 1 Synapsen finden sich dabei überwiegend an dendritischen Dornen und sind glutamaterg (exzitatorisch). Gray Typ 2 Synapsen finden sich vorwiegend an Zellsomata und sind sehr häufig GABAerg (inhibitorisch). Der synaptische Spalt an Gray Typ 1 Synapsen ist im Vergleich

zu Gray Typ 2 Synapsen breiter, prä- und postsynaptische Strukturen prominenter ausgebildet (Kandel and Siegelbaum, 2000).

Synaptische Signalübertragung: In den Boutons werden Neurotransmitter in Form von Vesikeln gespeichert. Diese werden beim Eintreffen eines Aktionspotentials durch Calciueinstrom in den etwa 20 nm breiten synaptischen Spalt entlassen (Hof *et al.*, 2014). Auf postsynaptischer Seite befindet sich eine durch eingelagerte Proteine verdickte Membran (PSD). Die hier befindlichen Ionenkanäle werden durch Neurotransmitter aktiviert, sodass es zum Einstrom von Ionen kommt. Bei diesen handelt es sich entweder um positiv geladene Natrium-Ionen oder negativ-geladene Chlorid-Ionen. Beide verändern durch ihre Ladung das Potential an der nachfolgenden Zellmembran und senden diese Potentialänderung (EPSP oder IPSP) in Richtung des Zellkörpers, dem Soma. Durch die Summation dieser Potentiale kann so erneut ein Aktionspotential am Axonhügel der postsynaptischen Zelle ausgelöst werden (Squire *et al.*, 2008).

Putative synaptische Verbindungen: Der Nachweis einer Synapse ist nur mittels elektronenmikroskopischer Darstellung zweifelsfrei möglich. Putative Synapsen sind lichtmikroskopisch detektierte Überlappungen zwischen präsynaptischen (Axon, Bouton) mit postsynaptischen Elementen (Dendriten, Dendritendorn). In diesen Bereichen können folglich Synapsen vorliegen.

1.3 Methodischer Überblick

Ende des 19. und zu Beginn des 20. Jahrhunderts konnte in Golgi-Anfärbungen von Hirnschnitten durch Ramón y Cajal die Komplexität der Verbindungen zwischen Nervenzellen bereits erahnt werden (Ramón y Cajal, 1909). Die Einführung der Elektronenmikroskopie ermöglichte es, erste Untersuchungen zu Synapsen und ihrer Morphologie durchzuführen (Gray, 1959; Jones and Powell, 1970). Qualitative und quantitative Untersuchungen zu kortikalen Nervenzellen und ihrer synaptischen Verbindungen folgten (Colonnier, 1968; LeVay, 1973). Die Einführung intrazellulärer Markiertechniken erlaubte es bald, einzelne Nervenzellen im lebenden Gehirn elektrophysiologisch gezielt zu untersuchen und ihre

Morphologie mittels Camera Lucida darzustellen (Barrett and Graubard, 1970; Kelly and van Essen, 1974). Gleichzeitig wurde mittels elektrischer Läsionen und daraus folgender axonaler Degeneration versucht, Axonterminalen an postsynaptischen Nervenzellen gezielt zu markieren und so die Anzahl synaptischer Verbindungen zwischen einzelnen Nervenzellen zu quantifizieren (Blackstad, 1975; Peters, White and Fairén, 1977; White and Rock, 1981).

Um zu beantworten, ob sich auch mittels Lichtmikroskopie Synapsen zwischen Nervenzellen detektieren lassen, wurden nah beieinander liegende golgi-gefärbte Nervenzellen lichtmikroskopisch untersucht und rekonstruiert. Stellen, an denen sich Axone und Dendriten nahekamen, wurden elektronenmikroskopisch analysiert (Peters and Proskauer, 1980). Neben der Entdeckung axo-axonaler Synapsen und von Autapsen, also Synapsen, die von einem Axon und einem Dendriten der gleichen Zelle gebildet werden, konnten so 50% der lichtmikroskopisch detektierten Stellen als „echte“ Synapsen bestätigt werden.

Die Einführung von Biocytin als intrazellulären Nervenzellmarker ermöglichte die ausreichende Markierung mit einem Biomolekül und die gleichzeitige elektrophysiologische Messung dieser Zellen (Horikawa and Armstrong, 1988). Biocytin, ein Komplex aus Biotin (Vitamin B7) und Lysin, ist ein kleines und gut wasserlösliches Molekül und eignet sich damit gut für die Verwendung in schmalen Glaspipetten und die Aufnahme in Nervenzellen. Es verteilt sich sehr schnell über alle Strukturen der Zelle, sowohl in anterograder als auch retrograder Richtung. Dabei ist es nur wenig toxisch und wird von der Zelle kaum nach extrazellulär abgegeben (Nicholson and Kater, 1973). Mit Avidin, einem basischen Glykoprotein aus dem Hühnereiweiß, geht es eine sehr starke nicht-kovalente Bindung ein (Wright *et al.*, 1952). Avidin, oder das aus Bakterien stammenden Streptavidin, lässt sich mit Enzymen oder Fluoreszenzmarkern koppeln und ermöglicht so die Durchführung verschiedener histologischer Färbemethoden, wie der DAB-, Fluoreszenz- oder Schwermetallfärbungen.

Eine erste beeindruckende Studie, die putative synaptische Verbindungen von vollständig rekonstruierten Pyramidenzellen im visuellen Kortex untersucht, fin-

det Anfang der 90er statt. Hier werden mehrere Nervenzellen durch massive extrazelluläre Injektionen von Biocytin und anschließende Strompulse im Zielbereich der Axonprojektionen retrograd mit Biocytin markiert, rekonstruiert und auf Überlappungen von Axon- und Dendritenstrukturen untersucht (Kisvárdy and Eysel, 1992). Die putativen Synapsen werden zwar nicht im Elektronenmikroskop verifiziert, die Anzahl der Verbindungen zwischen den einzelnen Pyramidenzellen liegt aber mit 1 – 4 Kontakten sehr niedrig.

Mittels *in vitro* Paarableitungen und anschließende Biocytinmarkierungen wird alsbald versucht, physiologische Nervenzellableitungen mit der vollständigen Rekonstruktion von synaptisch verbundenen Nervenzellen zu verbinden (Deuchars, West and Thomson, 1994; Deuchars and Thomson, 1995a, 1995b; Thomson and Deuchars, 1997; Feldmeyer *et al.*, 1999).

Die Einführung einer *in vivo* Methode zur juxtazellulären elektrophysiologischen Aufzeichnung und Biocytin-Markierung mittels loser Patch Clamp-Technik ermöglicht nun auch die Untersuchung weit entfernter Axon-Projektionen einzelner Nervenzellen (Pinault, 1996). Mittels extrazellulär platzierter Patch-Pipette können elektrophysiologische Messungen an einer einzelnen Nervenzelle durchgeführt werden. Anschließend werden niedrige Strompulse appliziert (< 10 nA, 200 ms on/off) und die Zelle so mit Biocytin gefüllt.

Große Studien mit *in vivo* Einzellzellfüllungen und Rekonstruktionen versuchen anhand der Anzahl bestimmter Nervenzellen in bestimmten Schichten sowie morphologischen Parametern, wie z.B. der Dendritenlänge, Aussagen über synaptische Verbindungen dieser Zellen zu machen (Binzegger, 2004; Stepanyants, Hirsch and Martinez, 2008).

Die Verwendung konventioneller Lichtmikroskopie zur Untersuchung putativer synaptischer Verbindungen bleibt limitiert. Nur in der Hälfte der Fälle handelt es sich bei den detektierten Strukturen um „echte“ Synapsen (da Costa and Martin, 2011). Durch die Verwendung hoch-auflösender lichtmikroskopischer Techniken und anschließender linearer Dekonvolution lässt sie sich aber bis auf 90% stei-

gern (Schoonover *et al.*, 2014). Damit lassen sich anatomische Synapsen zwischen zwei Strukturen mittels lichtmikroskopischer Techniken mit hoher Treffsicherheit nachweisen.

Trotz aller Fortschritte bleibt die *in vivo* Biocytin-Markierung einzelner Nervenzellen technisch aufwendig. Die Erfolgsrate für die komplette Anfärbung aller Axon- und Dendritenstrukturen einzelner Nervenzellen liegt zwischen 30 – 40% (Narayanan *et al.*, 2014). Ein weiterer limitierender Faktor ist der sehr hohe zeitliche Aufwand für die Rekonstruktionen. Insbesondere die vollständigen Rekonstruktionen von Axonmorphologien, die mehrere Millimeter umfassen können und z.T. Nervenvolumina von mehreren Kubikmillimetern innervieren, stellen hier eine große Herausforderung dar. Die Akquisition der so generierten Daten ist eine weitere Herausforderung, da einzelne Nervenzellen mehrere Terabyte an Bilddaten erzeugen. So finden sich nur wenige systematische *in vivo* Studien, in denen eine große Anzahl von vollständig rekonstruierten Nervenzellen untersucht werden. Durch die Entwicklung verschiedener automatischer Detektions- und Rekonstruktionstechniken (Oberlaender, 2007) sowie verbesserter Software-Tools zum Proof-Editing der detektierten Strukturen (Dercksen, Hege and Oberlaender, 2014) konnte die Rekonstruktionsarbeit hier deutlich verbessert werden.

1.4 Mikroskopie

Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie ist ein hochauflösendes lichtmikroskopisches Verfahren, welches im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie bessere Auflösungen in lateraler und axialer Richtung ermöglicht. Im Unterschied zur konventionellen Lichtmikroskopie wird immer nur ein kleiner Gewebesausschnitt aufgenommen, der im Lichtfokus und damit konfokal liegt. Die höhere Auflösung wird durch die Verwendung einer Lochblende (Pin-Hole) erreicht. Dabei handelt es sich um eine variabel einstellbare Öffnung auf dem Weg von der Lichtquelle zum Objekt sowie zurück zum Detektor, die nur senkrecht zu ihr ein-

fallendes Licht durchlässt und schräg einfallende Lichtstrahlen, also Lichtstrahlen, die aus Bereichen außerhalb des Fokus stammen, verhindert. Als Lichtquelle dient ein Laser, der hoch-energetisches Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Anregung der an Proteine gebundenen Fluorophore ermöglicht. Durch die Anregung geben die Fluorophore Licht in Form von Photonen wieder ab. Diese emittierten Strahlen haben typischerweise eine höhere Wellenlänge und werden von einem Detektor, der einen Photomultiplier (PTM) enthält, aufgefangen. Anregungslicht und emittiertes Licht werden außerdem durch einen so genannten dichromatischen Spiegel voneinander getrennt. So erreicht das Anregungslicht ausschließlich den Objektträger und das emittierte Licht den Detektor. Die laterale Schrittlänge des Laserstrahls kann in x und y genau eingestellt werden, wie auch die Schrittlänge in axialer Richtung. So bekommt man einen optischen Schnitt mit einer sehr definierten optischen Auflösung.

1.5 Dekonvolution

Neben der Minimierung der Unschärfe durch die Verwendung spezieller optischer Techniken wie der Lochblende bei der Konfokal-Mikroskopie, besteht die Möglichkeit durch computer-basierte Verfahren die Unschärfe weiter zu reduzieren. Die Dekonvolution selbst ist ein mathematisches Verfahren zur Rekonstruktion von Bilddaten. Dabei wird zunächst angenommen, dass Bildinformationen durch die Verwendung mikroskopischer Medien wie Linsen und Detektoren verloren gehen. Es entsteht ein unscharfes, konvolutiertes Bild. Mittels Dekonvolutionsverfahren lassen sich diese Daten teilweise wiederherstellen. Hierfür wird auf die so genannte Punktspreizfunktion (*engl.*: point spread function = PSF) zurückgegriffen. Diese ist für jedes Medium, so auch jedes Mikroskop, spezifisch und muss im Vorfeld ermittelt werden. Das Ergebnis zeigt für gewöhnlich eine deutliche Zunahme der lateralen Bildschärfe und liefert so ein besseres Signal zu Rauschen-Verhältnis. Es existieren unterschiedliche Dekonvolutionsmethoden, welche mit linearen und nicht-linearen Algorithmen arbeiten. Dabei hat sich gezeigt, dass die Verwendung linearer Algorithmen für die Bearbeitung große Regionen

neuronalen Gewebes die geeignetste ist, da sie weniger anfällig für Fehlerberechnungen des Hintergrunds ist und schneller abläuft. So verbessert sich das Signal-zu-Rauschen Verhältnis und die Auflösung in den Bilddaten signifikant (Oberlaender *et al.*, 2009; Wang and Smith, 2012).

1.6 Zielsetzung

Die Methoden zur Untersuchung synaptischer Verbindungen von Nervenzellen *in vivo* sind technisch aufwendig und weisen zahlreiche Limitationen auf. So liefert z.B. die Golgi-Methode keine Informationen über die Elektrophysiologie von Nervenzellen, *in vitro* Techniken erlauben nur ein unvollständiges Bild der Nervenzellmorphologie und sind limitiert im Hinblick auf funktionelle Untersuchungen (z.B. sensorische Reizverarbeitung). Die Elektronenmikroskopie bietet eine hohe synaptische Auflösung, Untersuchungen großer Volumina von Nervengewebe bleiben aber beschränkt. Insbesondere Rekonstruktionen von vollständigen Axonmorphologien sind aufgrund des technischen und zeitlichen Aufwands unpraktikabel.

In meiner Doktorarbeit sollen diese Limitationen überwunden werden. Die Kombination von juxtazellulären Zelleitungen mit Biocytin-Markierung und anschließender hoch-auflösenden mikroskopischen Verfahren bietet dabei eine erfolgversprechende Kombination. So lassen sich elektrophysiologische Parameter von Nervenzellen auf der einen Seite mit den anatomischen Spezifitäten dieser Strukturen auf der anderen Seite verknüpfen. Folgende Schritte sollen im Speziellen durchgeführt werden:

1. *In vivo* juxtazelluläre Ableitung und Biocytin-Markierung von mindestens zwei nah beieinander liegenden Nervenzellen in Schicht 4 und 5 des somatosensorischen Kortex der Ratte in sequenzieller Technik, d. h. es werden mehrere Nervenzellen hintereinander aufgesucht und gefüllt. Die Qualität der Markierung soll dabei so hoch sein, dass die gesamte Axon- und Dendritenmorphologie mit ihren zugehörigen subzellulären Elementen (Boutons, Dendritendornen) sichtbar wird.

2. Die Histologie soll durch die Nutzung fluoreszenzgekoppelter Marker-Moleküle erweitert werden.
3. Die maximale Auflösung der Nervenzellstrukturen soll durch die Verwendung hoch-auflösender konfokaler Laser Scanning Mikroskopie erreicht werden.
4. Alle Nervenzellen sollen dreidimensional vollständig rekonstruiert und anschließend identifiziert werden.
5. Die Anzahl, Lokalisation und die prä- und postsynaptischen Soma-Entfernung putativer synaptischer Verbindungen zwischen zwei und mehreren rekonstruierten Nervenzellen soll ermittelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Experimentdesign

Es wird ein Mikromanipulator SM-6 Setup (Luigs & Neumann) verwendet. Das analoge Signal wird mit einem Axoclamp-2B Microelectrode Amplifier (Axon Instruments) verstärkt. Des Weiteren werden ein BNC-2090 (National Instruments) und ein Neuralynx Lynx-8 Amplifier A/D (NeuraLynx) verwendet. Als Software werden LabView 7.1 (National Instruments) und Lynx-8 (NeuraLynx) benutzt. Für LabView wird auf maßgeschneiderte Skripte zurückgegriffen (zur Verfügung gestellt von Dr. Randy M. Bruno).

2.2 Versuchstiere

Für die Experimente werden 27 Tage oder ältere männliche Wistar-Ratten (Charles River Laboratories) verwendet. Die Versuchstiere werden bei konstanten 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% gehalten.

Alle Experimente werden unter Einhaltung erforderlicher tierschutz- und versuchstierkundlicher Fachkenntnisse nach § 9 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.3 Chemikalien

Tab. 1. Übersicht aller verwendeten Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge.

Substanz	Summenformel	Reinheitsgrad	CAS-Nr.	Hersteller
3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochloridhydrat	$(\text{NH}_2)_2\text{C}_6\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_3(\text{NH}_2)_2 \cdot 4\text{HCl}$	≥ 96%	868272-85-9	Sigma-Aldrich
Ampuwa® Wasser für Injektionszwecke				Fresenius Kabi
Biocytin	$\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$	≥ 98%	576-19-2	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid Monohydrat	$\text{CaCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	≥ 99,9%	22691-02-7	Sigma-Aldrich

Cytochrom C aus Pferdeherz		≥ 95%	9007-43-6	Sigma-Aldrich
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	≥ 99%	10028-24-7	Sigma-Aldrich
Glycerol	$\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$	≥ 99%	56-81-5	Sigma-Aldrich
HEPES	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	≥ 99,5%	7365-45-9	Sigma-Aldrich
Isofluran, Forene® 100% (V/V)				Abbvie
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%				Fresenius Kabi
Kaliumchlorid	KCL	≥ 99,5%	7447-40-7	Sigma-Aldrich
Kaliumhydrogenphosphat	KH_2PO_4	ACS, ≥ 99%	7778-77-0	Sigma-Aldrich
Katalase aus Rinderleber		units/mg protein	9001-05-2	Sigma-Aldrich
Lidocain Hydrochlorid Monohydrat	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$		6108-05-0	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid	MgCl_2	≥ 98%	7786-30-3	Sigma-Aldrich
Mowiol® 4-88	$[-\text{CH}_2\text{CHOH}-]_n$		9002-89-5	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	NaCl	≥ 99,5%	7647-14-5	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	NaOH	ACS, ≥ 98%	1310-73-2	Sigma-Aldrich
Natriumhypochlorid Lösung	NaClO	4.00 - 4.99%	7681-52-9	Honeywell
Paraformaldehyd	$\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$		30525-89-4	Sigma-Aldrich
SlowFade Gold Antifade Mountant				Thermo Fisher Scientific
Streptavidin, Alexa Fluor 488 conjugate				Thermo Fisher Scientific
Triton™ X-100	$t\text{-Oct-C}_6\text{H}_4\text{-(OCH}_2\text{CH}_2)_x\text{OH}$, x= 9-10		9002-93-1	Sigma-Aldrich
Trizma® Base	$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	≥ 99,9%	77-86-1	Sigma-Aldrich
Urethan	$\text{NH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	≥ 99%	51-79-6	Sigma-Aldrich
Vectastain® ABC-HRP Kit				Vector Laboratories
Wasserstoffperoxid	H_2O_2	30%	7722-84-1	Carl Roth

2.4 Materialien

Tab. 2. Übersicht aller verwendeten Materialien in alphabetischer Reihenfolge.

Material	Hersteller
3M® Gase/Dämpfe und Partikelmaske 4277	3M
Bepanthen Augen- u. Nasensalbe	Bayer
Bo-Glaskapillaren mit Filament (L=75mm Da=2,0mm Wandstärke=0,5mm)	Hilgenberg
Bohrkopf H1S.104.010 VPE5	Komet Dental, Gebr. Bras-seler GmbH
Deckgläser 24 x 60mm #0	Thermo Fisher Scientific
Doppelseitige Rasierklingen	Personna
Einma-Injektionskanülen Sterican®, steril, 0,60 x 30 mm	B. Braun
Einweg-Kunststoffspritzen Omnifix®, 3 ml, steril	B. Braun
Eppendorf Microloader™, 20 µm	Eppendorf
Eppendorf Reaktionsgefäße 0,2 ml / 0,5 ml	Eppendorf
Immersionsöl Typ G n23e=1,450	Leica Microsystems
Klebeband	
Mikro-Kürette 1,5 mm	Fine Science Tools
Objektträger	Carl Roth
Paladur	Kulzer
Papierspitzen	Pluradent
Plastikbecher 100 ml	
Rotilabo®-Spritzenfilter, CME, steril, Poren-Gr.: 0,22 µm, ø außen: 33 mm	Carl Roth
Secure line® Surgical Skin Marker	Aspen Surgical
SFCA Membranfilter, Poren-Gr.: 0,2 µm	Thermo Fisher Scientific
Skalpellklingen, steril, Nr. 24	C. Bruno Bayha GmbH
Sterile Saugtupfer	Sugi
Sterile Saugtupfer mit Griff	Sugi
UHU® Sekunden Kleber, flüssig	UHU GmbH
Vaseline	Molyduval
Zellkulturschalen 35 x 10 mm, Polystyrol	Becton Dickinson Labware

2.5 Herstellung von Stammlösungen

Ansatz einer 0,2 molaren Phosphatpuffer-Lösung (PB): Es werden 5 L 0,2 M PB hergestellt. Diese wird später auf eine 0,1 M bzw. eine 0,05 M Lösung verdünnt. Zur Herstellung werden 27,6 g KH_2PO_4 und 142,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in einen Erlenmeyerkolben gefüllt. Dieser wird bis zur 5 L-Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wird die Lösung mittels Rührmixer gelöst.

Ansatz einer 1 molaren Natronlauge (NaOH): Es werden 1 g NaOH in 25 ml destilliertem Wasser gelöst.

Ansatz einer 4% Paraformaldehyd-Lösung (PFA): Zur Herstellung von 1 L 4% PFA werden zunächst 400 ml destilliertes Wasser auf 60 – 70°C vortemperiert. Unter dem Abzug und unter Verwendung einer Atemschutzmaske werden 40 g Paraformaldehyd in einen Plastikbecher abgemessen. Anschließend wird dieses im aufgeheizten Wasser unter Zugabe von 2 - 3 Tropfen 1 M NaOH gelöst.

Als nächstes werden 600 ml 0,2 M PB in ein 1 L Glasgefäß mit einem 0,2 µm Vakuum-Laborfilter gefiltert. hinterher wird die Formaldehydlösung gefiltert. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.

Ansatz einer Biocytin-Lösung:

Tab. 3. Substanzen zur Herstellung einer Biocytin-Lösung.

Substanz	Stoffmengenkonzentration [mmol/l]	Molare Masse [g/mol]	Konzentration [g/l]
NaCl	135	58,44	7,889
KCl	5,4	74,55	0,403
CaCl ₂ * H ₂ O	1,8	147,02	0,265
MgCl ₂	1	203,30	0,203
HEPES	5	238,30	1,192

Die einzelnen Substanzen werden abgewogen und in einem Erlenmeyerkolben mit 1 L Ampuwa® mittels Magnetrührer gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird durch Zugabe von 1 M NaOH auf 7,2 gebracht. In 1 ml der hergestellten Lösung werden 25 mg Biocytin mit einem Reagenzglasschüttler für 10 min. gelöst. An-

schließlich wird die Biocytin-Lösung mit einem 0,2 µm Spritzenfilteraufsatz gefiltert. Die Lösung wird zu je 25 µl auf 0,2 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei -20°C gelagert.

Ansatz einer 20% Urethan-Lösung: Zur Herstellung von 50 ml 20% Urethanlösung werden 10 g Urethan im Laborabzug in einen Messbecher abgefüllt. Anschließend wird mit Ampuwa® bis zur 50 ml-Marke aufgefüllt und durch vorsichtiges Schütteln gelöst. Am Ende sollten keine kristallinen Überschüsse zu sehen sein. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Ansatz einer 4% Lidocain-Lösung: Zur Herstellung von 100 ml 4% Lidocain-Lösung werden 4 g Lidocain in 100 ml Ampuwa® gelöst. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Ansatz einer 3,3'-Diaminobenzidin-Lösung (DAB): 3,3'-Diaminobenzidin ist eine sehr gesundheitsschädliche Chemikalie und muss daher unter hohen Eigenschutzmaßnahmen verarbeitet werden. Alle Schritte der Herstellung werden dazu unter dem Laborabzug durchgeführt. Des Weiteren werden eine Atemschutzmaske und geeignete Handschuhe getragen. DAB kann durch die Zugabe von Bleichmitteln, wie z.B. Natriumhypochlorid, neutralisiert werden. Dieses sollte in unmittelbarer Nähe zum Herstellungsprozesses bereitstehen.

Zunächst wird ein Wasserbad unter dem Laborabzug vorbereitet. Die Konzentration der hergestellten DAB-Lösung beträgt 75 mg/ml. Dafür werden 750 mg DAB in ein 50 ml Gefäß abgewogen. Anschließend wird die Substanz mit 10 ml Ampuwa® aufgefüllt. Auf dem Wasserbad wird das DAB nun gelöst und die entstandene Lösung auf 0,5 ml Reaktionsgefäße zu je 265 µl verteilt. Eine Lagerung erfolgt bei -20°C.

Ansatz einer Mowiol-Lösung: 6,0 g Glycerol wird in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und 2,4 g Mowiol® 4-88 beigemischt. Mittels Magnetrührer wird das Gemisch nun in langsamer Geschwindigkeit für eine Stunde gelöst. Es werden 6 ml destilliertes Wasser hinzugegeben und abermals für 2 Stunden gelöst. Danach erfolgt die Zugabe von 12 ml 0,2 M Tris/HCL mit pH 8,5. Das Ganze wird nun unter Rühren für 15 min. auf 50°C erhitzt. Als nächstes wird die Lösung in einem Glasröhrchen für 15 min. herunterzentrifugiert (5000 x g, 10°C). Die Lösung wird auf 1 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei -20°C gelagert.

2.6 Betäubung und Kraniotomie

Nach Wiegen (zwischen 100 – 200g) wird das Versuchstier mit Isofluran in 2-3% O₂ betäubt. Anschließend erfolgt die intraperitoneale Injektion von 20% Urethan-Lösung (1,6 – 1,7g/kg) mit einer 3 ml Einweg-Kunststoffspritze und Einmal-Injektions-Kanüle (0,60 x 30 mm) in den unteren linken Quadranten des Abdomens. Die korrekte intraperitoneale Lage kann durch leichtes Zurückziehen des Spritzenkolbens überprüft werden. Dabei sollte kein Blutrückfluss zu sehen sein. Bei richtiger Lage baut sich ein Unterdruck in der Spritze auf. Nach erfolgter Injektion wird das Tier für 20 min. von Licht und Geräuschen abgeschirmt. Danach wird die Narkosetiefe durch das Testen auf Reflexe überprüft. Dazu werden Lid, Kornea und äußerem Gehörgang berührt. Mit einer Pinzette wird in den Zwischenzehenraum gekniffen. Hier sollen die Reflexe ausgefallen sein. Außerdem wird auf spontane Barthaarbewegungen geachtet. Falls Reflexe bestehen sollten, erfolgt eine zusätzliche Urethan-Injektion von 10% der ursprünglich verabreichten Dosis. Das Tier wird erneut in ruhiger Umgebung belassen und die Reflexe noch einmal getestet.

Bei ausreichender Narkosetiefe wird das Tier auf mehreren Lagen weichen Papiers, welches um ein elektrisches Wärmepolster gewickelt ist, gelagert. Nun wird eine rektale Sonde mit ausreichend Vaseline rektal eingeführt. Vorher wird der Enddarm durch leichten Druck auf diesen von dort noch befindlichen Kotresten befreit, um eine optimale Temperaturmessung zu gewährleisten. Die Sonde wird

nun mittels Klebeband am Schwanz des Tieres fixiert, um ein Verlagern der Sonde zu verhindern. Die Körpertemperatur des Tieres wird nun durchgehend gemonitort und zwischen 37,0 und 38,0 °C konstant gehalten. Die exakte Beobachtung der Temperatur ist vor allem zu Beginn wichtig, da es während des Aufheizens des Wärmepolsters schnell zu starken Temperaturanstiegen im Tier kommt. Später halten sich rapide Temperaturschwankungen für gewöhnlich in Grenzen. Der Kopf des Tieres wird in einer speziell angefertigten stereotaktischen Halterung vorsichtig fixiert. Die Augen des Tieres werden mit Bepanthen® - Augensalbe (Bayer) vor Austrocknung und Lichtschädigung geschützt.

Die Kopfhaut wird geschoren. Anschließend erfolgt die Lokalanästhesie mittels subkutaner Injektion von ca. 1 – 2 ml 4% Lidocain. Nach 3 min wird die Kopfhaut mit einer Schere entfernt. Der Schädel wird mit destilliertem Wasser ausreichend gesäubert. Mittels Mit einer 1,5 mm Mikro-Kürette (Fine Science Tools) erfolgt die Abschabung verbliebener Reste, sodass der Knochen vollständig vom Gewebe befreit ist. Es erfolgt eine abschließende Reinigung mit 70% Ethanol.

Die Mikro-Kürette wird nun in 3% H₂O₂ (Carl Roth) getaucht und die Sagital- und die Koronarnaht leicht bekratzt. So werden die Nähte für eine folgende Abmessung sichtbar. Unter mikroskopischer Kontrolle wird ein Punkt 2,5 mm kaudal von Bregma auf der Sagitalnaht markiert. Davon wird ein Punkt 5,5 mm lateral links-hemisphärisch abgemessen. Die stereotaktische Halterung wird zur anderen Seite gekippt um einen guten Zugangsweg zur Kraniotomie zu bekommen. Mit einem kleinen Handbohrer wird nun um die Zielcoordinate eine etwa 2,5 x 2,5 mm große Fläche des Schädelknochens ausgedünnt. Dazu wird ein 1,0 mm Rund-Bohrkopf (Komet Dental / Gebr. Brasseler GmbH) verwendet. Die Umdrehungsgeschwindigkeit beträgt in etwa 20 – 30 x1000min⁻¹. Die Ausdünnung erfolgt vorsichtig und mit nur wenig Druck. Auftretende Blutungen werden durch Umstellung der Umdrehungsrichtung gestoppt. Zwischendrin wird die Knochenfläche und der Bohrkopf mit 0,9 NaCl abgekühlt. Diese Prozedur erfolgt solange, bis die darunter verlaufenden Blutgefäße durch den Knochen hindurch sichtbar werden. Außerdem kann die Ausdünnung des Knochens mit einer feinen Pinzette überprüft werden. Der Knochen sollte sich hierbei leicht eindrücken lassen. Nun erfolgt eine erneute Messung des lateralen Punktes. Jetzt wird eine

Fläche von ca. 0,5 x 0,5 mm um diesen Punkt eingezeichnet. Die Eröffnung des ausgedünnten Schädelknochens erfolgt mit einem Skalpell (sterile Klinge Nr. 24, C. Bruno Bayha GmbH). Die Schnitttechnik ist dabei wie folgt: Zunächst werden zwei gegenüberliegende Seiten vorsichtig und mit wenig Druck durchtrennt, anschließend wird die dritte Seite leicht angeschnitten und die vierte Seite durchtrennt. Über die dritte Seite kann nun das Knochenfragment weggeklappt und entfernt werden. Die darunter liegende Dura wird mit ausreichend 0,9% NaCl gereinigt. Dazu werden feine Papierspitzen verwendet. Die Ränder der Kraniotomie werden mit einem Markierstift gekennzeichnet.

Der Übergang vom knöchernen Schädel zur Haut wird mit flüssigem Sekundenkleber fixiert (UHU GmbH). Dabei sollte kein Kleber in die Nähe der Kraniotomie gelangen. Anschließend wird über dem Sekundenkleber eine etwa 5 mm hohe, runde Kammer mit Prothesenkunststoff (Paladur®) aufgebaut und zur Aushärtung gebracht. Die stereotaktischen Befestigungselemente an Ohren und Schnauze werden gelockert und refixiert. Die entstandene Experimentkammer mit 0,9% NaCl gefüllt.

2.7 Herstellung von Patch-Pipetten

Die Pipetten werden kurz vor Experimentbeginn hergestellt, da eine Lagerung der Pipetten zu Auflagerungen von Staubpartikeln führt und so den Experimentablauf beeinflussen kann. Zunächst wird eine Patch Pipette mittels Pipettenpuller der Marke Sutter Instrument (Model P-1000) hergestellt. Für die Pipettenherstellung werden Borosilikat-Kapillaren mit Filament (Hilgenberg) mit folgenden Maßen verwendet: Länge 75 mm, Außendurchmesser 2,0 mm, Wandstärke 0,5 mm. Wichtig ist dabei das Herstellen eines bestimmten Pipettendesigns. Die Herstellung der optimalen Pipette kann am Pipettenpuller mit verschiedenen Parametern, wie Geschwindigkeit, Temperatur, etc. entsprechend in Form eingestellt werden. Das Ziel ist eine Pipettenspitze mit einem Innendurchmesser von ca. 1,0 – 1,5 μm herzustellen. Der Messwiderstand bei dieser Pipette liegt dann normalerweise zwischen 3 – 7 M Ω . Der Innendurchmesser der Pipettenspitze ist für die

spätere Färbequalität von entscheidender Bedeutung (Narayanan *et al.*, 2014). So größer der Innendurchmesser, desto besser ist die Anfärbung bei gleichzeitig kürzeren Stimulationszeiten. Allerdings liegt hier die Herausforderung darin, die Nervenzelle während des Stimulationsvorgangs stabil zu halten. Kleinere Pipetteninnendurchmesser führen zu stabileren Füllungsereignissen, die Füllungszeit dieser Zellen ist aber länger. Außerdem sollte auf eine möglichst glatt abgeschlossene Pipettenspitze geachtet werden. Jegliche Unregelmäßigkeiten oder abstehende Reste führen im späteren Verlauf zur Problemen während der Zellfüllung. Die Länge der Spitze beträgt für die folgenden Experimente ca. 2000 μm bei einem möglichst konstanten Innendurchmesser von nicht mehr als 75 μm . Für Experimente in höher gelegenen Kortexschichten können kürzere Pipetten verwendet werden. Wichtig ist nur, dass der Durchmesser der Pipette im Bereich der Dura nicht mehr als 75 μm beträgt. Jede erzeugte Pipette wird unter einem Mikroskop mittels Messlineal in 20x und in 100x überprüft. Nach Auffüllen mit Biocytin muss darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen in der Pipette verbleiben. Ebenso dürfen keine Staubpartikel oder sonstigen Partikel vorhanden sein, da sich diese im Bereich der Pipettenspitze absetzen und zu Problemen bei der späteren Messung und Füllung der Nervenzellen führen.

2.8 Juxtasomale Aufzeichnung und Biocytin-Markierung

Die Experimente werden nach folgendem Schema durchgeführt:

1. **Vorbereitung:** Die Pipette wird in einen Mikromanipulator eingespannt, der in einem Winkel von 34° zur Sagitalebene des Tieres steht und damit einen senkrechten Einfallwinkel zum Barrel-Kortex, speziell zur D2-Kolumne, darstellt. Die Experimentierkammer wird mittels Saugspitzen von der 0,9% NaCl-Lösung geleert und die Kraniotomie soweit wie möglich trocken getupft. Anschließend erfolgt eine gute Ausleuchtung des Bereichs. Die eingespannte Glaspipette wird nun soweit heruntergefahren, dass sie kurz oberhalb der Kraniotomie lokalisiert ist. Zum Eindringen wird eine Stelle aufgesucht, in der keine prominenten Blutgefäße verlaufen.

Nun wird die Pipette in sehr langsamer Geschwindigkeit und unter mikroskopischer zu Hilfenname bis auf die Dura gefahren, sodass diese ein bisschen nachgibt. Diese Stelle wird zunächst als Nullposition gespeichert. Nun wird die Pipette ca. 100 -150 μm zurückgefahren. Die Experimentierkammer wird wieder mit 0,9% NaCl-Lösung aufgefüllt, die Beleuchtung und das Mikroskop aus dem Arbeitsbereich entfernt. Eine Kupferplatte zur elektronischen Abschirmung des Versuchsaufbaus wird in der Nähe der Pipette aufgestellt. Sämtliche elektronischen Geräte werden aus dem Experimentierbereich entfernt, um ein klares elektrisches Signal von der Pipette zu bekommen. Die Experimentierelektronik wird gestartet und in der Experimentierkammer vorsichtig eine Erdungselektrode angebracht. Der Verstärker wird im Bridge-Modus eingestellt (das bedeutet Current Clamp). Der Offset des Amplifiers wird auf Null gestellt. Zur Signaldarstellung wird die LabView Software Version verwendet.

2. **Messung von Pipettenwiderstand:** Der Widerstand vor der Pipette wird gemessen, indem positive Strompulse der Stärke 1 nA in 200 msek An/Aus-Intervallen ausgesendet werden. Durch kompensieren des Widerstands bis auf die Nulllinie kann nun der Widerstand vor der Pipette abgelesen und notiert werden.
3. **Auffinden der Dura:** Um eine Blockierung der Pipette zu vermeiden wird ein positiver Druck von 10 mbar auf die Pipette gesetzt. Zu hoher Druck sollte vermieden, da dadurch Nervenzellen innerhalb des Gehirns aus dem Weg geschoben werden. Die Pipette wird nun in 2 μm -Schritten in Richtung Dura gebracht. Dabei werden positive Strompulse der Stärke 1 nA in 200 msek An/Aus-Intervallen verwendet. Die Pipette wird so lange heruntergefahren, bis es zu einem Anstieg des Widerstands vor der Pipette kommt. Hier beginnt die Dura und die Position wird als neue Nullposition vermerkt. Unter positiven Strompulsen wird nun die Dura durchbrochen, wobei es zu einem sehr starken Widerstandanstieg kommt. Ist die Dura passiert, kommt es zu einem plötzlichen Abfall des Widerstands. Dies erfolgt nach ca. 250 μm . Die Strompulse werden ausgeschaltet und es können nun spontane Oszillationen im Signal beobachtet werden.

4. **Platzieren der Pipette:** Die Pipette wird vorsichtig in eine Tiefe von ca. 800 - 850 μm vorgefahren. Hier beginnt das Suchen von einzelnen Nervenzellen. Der positive Druck in der Pipette wird abgelassen und einige Minuten abgewartet. Die elektrische Kapazität wird am Verstärker nun ein wenig erhöht.
5. **Auffinden einer Nervenzelle:** Es werden Strompulse von 1 nA und 200 msek An/Aus-Intervallen gestartet. Der Widerstand vor der Pipette wird nun kompensiert. Die Pipette wird nun in 2 μm -Schritten gesenkt. Dabei wird auf eine Zunahme des Widerstands vor der Pipette geachtet. Sobald dies geschieht, werden die Strompulse ausgeschaltet und es wird abgewartet, ob sich positive Aktionspotentiale zeigen. Ist dies der Fall, hat man eine Nervenzelle gefunden. Es kann aber durchaus vorkommen, dass sich auch ohne gemessene Aktionspotentiale eine Nervenzelle vor der Pipette befindet. Andererseits führen Blutgefäßen vor der Pipette typischerweise zu einem deutlichen Widerstandsanstieg. Die Pipette wird nun soweit genähert, bis ein Widerstand von ca. 30 $\text{M}\Omega$ erreicht ist.
6. **Messung der elektrischen Aktivität:** Die elektrische Aktivität der Nervenzelle wird nun in 250 Blöcken zu je 500 msek aufgezeichnet. Danach wird durch manuelles Bewegen der Barthaare getestet, ob die Nervenzelle auf diesen Stimulus reagiert. Die Ableitungsqualität hängt dabei vom Durchmesser der Pipettenspitze und der Höhe des vor der Pipette gemessenen Widerstands ab. Je kleiner der Durchmesser und je höher der Widerstand, desto besser ist die Ableitungsqualität.
7. **Elektroporation und Biocytin-Markierung:** Die mV-Skala wird bis 15 mV hochgesetzt. Positive Strompulse von 1 nA und 200 msek An/Aus-Intervallen werden ausgesendet. Die Pipette wird um 4 – 6 μm gesenkt. Die elektrische Kapazität vor der Pipette wird etwas aufgedreht. Nun werden die Strompulse in 0,1 nA-Schritten langsam gesteigert. Dabei müssen die Aktionspotentiale der Nervenzelle beobachtet werden. Die Strompulse werden bis auf maximal 6,5 nA gesteigert. Kommt es währenddessen nicht zur Öffnung der Nervenzelle, werden die Strompulse ausgeschaltet

und auf den Ausgangswert gestellt. Anschließend wird die Pipette unter positiven Strompulsen noch einmal um 4 – 6 μm gesenkt und die Strompulse in 0,1 nA-Schritten erhöht. Kommt es zu einer Öffnung der Nervenzellmembran, kann eine Zunahme der Aktionspotentiale während den An-Phasen der Strompulse beobachtet werden. Jetzt muss die Stromstärke der Pulse sehr schnell auf 1 nA reduziert werden, um eine Überfrachtung der Nervenzelle mit Natriumionen zu vermeiden. Die Aktionspotentiale selbst verändern sich bei Öffnung der Membran in typischer Weise. Die Breite des Aktionspotentials nimmt zu. Gleichzeitig nimmt die Hyperpolarisation des Potentials ab oder verschwindet vollständig. Je nach Anzahl der Aktionspotentiale über einem Stimulationsblock wird die Stromstärke angepasst. Kommt es zu einem starken Anstieg der Aktionspotentialdichte, sodass einzelne Aktionspotentiale nicht mehr auszumachen sind, ist die Zelle überstimuliert. Die Stromstärke sollte erniedrigt oder ausgestellt werden. Nimmt die Anzahl der Aktionspotentiale über den Stimulationsblöcken ab und/oder kehrt eine Hyperpolarisation zurück, kann die Stromstärke gesteigert werden. Letztendlich wird durch diese Anpassungsvorgänge die Zellmembran der Nervenzelle über einen längeren Zeitraum offengehalten. Gleichzeitig werden Widerstandsschwankungen vor der Zellmembran durchgehend ausgeglichen. Optimale Füllungszeiten für eine hochqualitative Darstellung der Dendriten und vor allem der Axone einzelner Nervenzellen betragen mindestens 5 min., besser 10 min.

8. **Erholung der Nervenzelle:** Nach Beendigung der Füllung werden die Strompulse ausgeschaltet, die elektrische Kapazität wird auf Null gestellt. Die Pipette wird einige Mikrometer zurückgefahren, aber so belassen, dass noch Aktionspotentiale der Nervenzelle beobachtet werden können. Die Erholungsphase der Nervenzelle dauert für gewöhnlich einige Minuten und ist dann erreicht, wenn die Aktionspotentiale wieder ihre ursprüngliche Form angenommen haben, also typischerweise eine niedrigere Frequenz zeigen und eine Hyperpolarisation zu sehen ist.
9. **Biocytin-Markierung weiterer Nervenzellen:** Die Pipette wird in langsamer Geschwindigkeit auf eine Tiefe von 500 μm zurückgesetzt. Hier wird

die Position nun um 20 - 50 μm in X- und/oder Y-Richtung verschoben. Daraufhin wird die Pipette erneut gesenkt und der Füllungsvorgang wiederholt. Das Prozedere wird für mindestens drei Nervenzellen wiederholt.

10. **Beendigung des Experiments:** Abschließend wird die Pipette in langsamer Geschwindigkeit bis auf 150 μm oberhalb der Dura gefahren. Liegt die Pipette außerhalb des Gehirns, kann der Verstärker ausgeschaltet werden und die Pipette aus dem Mikromanipulator entfernt werden.

2.9 Transkardiale Perfusion, Fixation und Entfernung des Gehirns

Nach Beendigung des Experiments wird der Kopf des Versuchstieres aus der stereotaktischen Fixierung gelöst. Nun wird unter regelmäßigem Monitoring des Tieres ca. 60 Minuten abgewartet. Diese Zeit wird für eine ausreichende Verteilung des Biocytins über die Strukturen der Nervenzelle benötigt.

Zur Perfusionsvorbereitung wird das Tier rücklings an den Pfoten mittels Klebestreifen fixiert. Die Perfusion erfolgt mit 0,9% NaCl-Lösung zum Auswaschen des Blutes und anschließender gekühlter 4% Paraformaldehyd-Lösung. Beide Lösungen werden nun in einer dafür vorgesehenen Pumpe vorbereitet. Es erfolgt die Eröffnung des Peritoneums mit Schere und Pinzette durch eine laterale Schnitttechnik nach rostral bis zum Erreichen des Thorax. Die inneren Organe, insbesondere die Leber sollen nicht geschädigt werden. Nach Erreichen des Thorax wird das Diaphragma nun quer eröffnet und das Perikard sichtbar. Die Eröffnung des gesamten Thorax erfolgt durch laterale hohe Rippenschnitte. Anschließend erfolgt die Eröffnung und das Wegschieben des Perikards mit kleiner Schere und Pinzette. Das Schlauchsystem der Pumpe wird bis zur Injektionsnadel am Ende mit 0,9% NaCl-Lösung durchspült. Luftblasen sollen vermieden werden. Nun wird die Injektionsnadel im Bereich der Herzspitze im linken Ventrikel platziert. Bei richtiger Lokalisation der Nadel kommt es zu einem pulsierenden Rückstrom von Blut in das Schlauchsystem. Nun wird das rechte Atrium mittels kleiner Schere eröffnet. In langsamer Pumpgeschwindigkeit wird nun das Blut des Tieres durch

die physiologische Kochsalzlösung ausgetauscht. Die verbliebene Blutmenge und die damit abhängige Dauer dieses Vorgangs wird anhand der Färbung der Leber beurteilt. Bei ausreichender Blutleere ist die Leber gelb-abgeblasst. Nun wird das Tier mittels 4% Paraformaldehydlösung fixiert. Dabei kann die Geschwindigkeit der Pumpe leicht erhöht werden. Die ausreichende Qualität der Fixierung wird durch manueller Testung der Steifheit von den Endgliedern des Tieres beurteilt. Als nächstes erfolgt die Dekapitation. Der eröffnete Rückenmarkskanal wird in Richtung Gehirn mittels Schere bis kurz vor Gehirn eingeschnitten. Nun kann der hintere Schädel mit Kleinhirn durch seitliche Schnitte vom Großhirn abgetrennt werden. Linke und rechte Schädeldecke werden mittels Pinzette vorsichtig abgehoben und die Dura sehr vorsichtig entfernt. Das Gehirn kann nun unbeschädigt entnommen werden und wird in einem Gefäß mit 4% PFA-Lösung für ca. 12 Std. bei 4°C aufbewahrt. Anschließend erfolgt ein Austausch mit 0.05 M PB-Lösung.

2.10 Histologie

Die histologische Aufarbeitung der Gehirne erfolgt nach 5 -7 Tagen. Hier hat sich die endogene Peroxidase-Aktivität innerhalb des Gewebes soweit reduziert, dass eine starke Anfärbung des Hintergrunds vermieden wird.

2.10.1 Schneiden des Gehirns

Das Schneiden der Gehirne erfolgt in zu den Barrel-Kolumnen tangentialer Schnittrichtung. Dazu wird eine umkonstruierte 24-Well-Titerplatte mit angebrachtem Bodennetz vorbereitet und mit 0,05 M PB aufgefüllt.

Das Gehirn wird aus dem Puffer genommen und auf Filterpapier platziert. Nun wird das Gehirn entlang der Mittellinie mit einem Skalpell geteilt, Kleinhirnüberreste werden entfernt. Die Linke Hemisphäre wird mit einer Pinzette auf eine

dünn mit Sekundenkleber beschichtete und drehbare Plattform gelegt und vorsichtig angedrückt. Anschließend wird der Sekundenkleber durch Übergießen mit 0,05 M PB zur sofortigen Aushärtung gebracht.

Die Plattform mit dem Gehirn wird nun in einem auf einem schwingungsgedämpften Tisch platzierten Vibratom (Leica VT 1000 S, Leicabiosystems) eingespannt. Die Schnittebene soll einen Winkel von 45° zur Sagitalebene des Gehirns betragen. Damit liegt die Schnittebene orthogonal zum Barrel-Kortex. In dieser Schnitttechnik ist dieser besonders sichtbar und anfärbbar. Für das Vibratom werden doppelseitige Rasierklingen (Personna® Double Edge Razor Blades) benutzt.

Für die durchgeführten Experimente wird eine Schnittdicke von 100 µm für die anschließende DAB-Färbung und 50 µm für die Streptavidin Alexa Fluor-Färbung gewählt. Bei dem hier verwendeten Vibratom wird eine Frequenz von 6 und eine Geschwindigkeit von 6 – 6,5 eingestellt. Wichtig ist, dass die ersten Schnitte immer mit einer möglichst langsamen Geschwindigkeit gemacht werden, da das Gewebe besonders zu Beginn beschädigt wird. Der Schneidemodus wird auf kontinuierlich gesetzt und dafür eine Start- und Stop-Marke gewählt. Der Schnitt sollte möglichst zentral über der Hemisphäre ansetzen. Dazu kann die Plattform in der entsprechenden Position eingestellt werden.

Insgesamt werden 24 Schnitte mit einer Schnittdicke von 100 µm angefertigt, 48 Schnitte für die 50 µm dicken Schnitte. Damit wurde eine Gesamtdicke von 2,4 mm abgedeckt.

Die Schnitte werden mittels feinem Pinsel in die Titerplatte übertragen. Anschließend kann das Gewebe bei 4°C gelagert werden.

2.10.2 Cytochrom C Oxidase- und DAB-Färbung

Mittels Cytochrom C Oxidase- und die DAB-Färbung werden die 100 µm-Schnitte angefärbt. Beide histologische Prozeduren erfolgen hintereinander. Die Cytochrom C Oxidase-Färbung dient dabei der Anfärbung der Barrel-Kolumnen. Die

DAB-Färbung führt durch eine Oxidation mit Wasserstoffperoxid zu einer dunkelbraunen Anfärbung der mit Biocytin beladenen Nervenzellen.

Cytochrom C Oxidase-Färbeprotokoll: Zum Waschen der Schnitte wird ein Laborrüttler benutzt. Der 6. – 11. Schnitt wird dazu in eine separate Well-Titerplatte übertragen.

Folgende Schritte werden nun durchgeführt:

1. Waschen der Schnitte 5 x 5 min. in 0,05 M PB mittels Laborrüttler.
2. Herstellung von 40 ml einer Cytochrom C-Lösung: 40 ml 0,05 M PB in einem Messzylinder abfüllen. 265 µl der vorgefertigten DAB-Lösung in warmem Wasser auftauen lassen. 8 mg Cytochrom C und 8 mg Katalase in einem Glasbehältnis abwiegen. Eine 250 ml Glasflasche mit einem sterilen Vakuum-Laborfilter für Flüssigkeiten und Vakuumpumpe bereitstellen. Etwas von dem abgefüllten PB in das Glasgefäß zum Cytochrom C und der Katalase dazugeben und auflösen. Die aufgelöste Menge wird mit dem übrigen PB und DAB über dem Laborabzug gefiltert. Die vorgefertigte Lösung wird nun in einem Wärmeschrank für 20 – 25 min. auf 37°C vortemperiert.
3. Inkubation der Schnitte für ca. 60 min. bei 37°C.
4. Waschen der Schnitte 2 – 3 x mit 0,05 M PB. Neutralisation des DAB-Abfalls mit Natriumhypochlorid.

DAB-Färbeprotokoll: Die DAB-Färbung erfolgt folgendermaßen:

1. Waschen der Schnitte 5 x 5 min. mit 0,05 M PB mittels Laborrüttler.
2. Herstellung einer Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Lösung (ABC-Lösung): 9,5 ml 0,05 M PB werden mit jeweils einem Tropfen Reagenz A und Reagenz B des Vectastain® ABC-HRP Kits versehen. Dann werden 0,5 ml 10% Triton X-100-Lösung hinzugegeben. Dieser Schritt wird ca. 30 min.

- vor Inkubation der Schnitte durchgeführt. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.
3. Herstellung einer 3% H₂O₂-Lösung: 4 ml einer 30% H₂O₂-Lösung werden mit 36 ml 0,05 M PB in einem Plastikbecher verdünnt.
 4. Inkubation der Schnitte in H₂O₂-Lösung für 20 min. mittels Laborrüttler bei Raumtemperatur. Die Dauer der Inkubation hängt von dem Alter des Tieres ab. Jüngere Tiere haben eine höhere endogene Peroxidase-Aktivität, sodass dieser Schritt eher 25 – 28 min. beträgt.
 5. Ca. 10 min. vor Schluss von Schritt 4. wird die ABC-Lösung zur Vorbereitung der Inkubation auf Well-Titerplatten mit je 400 µl/Well verteilt.
 6. Waschen der Schnitte 6 x 6 min. mit 0,05 M PB mittels Laborrüttler.
 7. Übertragen der Schnitte in die ABC-Lösung. Die Schnitte verbleiben für ca. 12 Std. gekühlt bei 4°C; alternativ ist eine Inkubation für 4 Std. bei Raumtemperatur möglich.
 8. Die Schnitte werden zurück transferiert und 5 x 10 min. mit 0,05 M PB mittels Laborrüttler gewaschen.
 9. DAB-Färbung: 40 ml 0,05 M PB, 13,4 µl 30% H₂O₂-Lösung und 265 µl DAB-Lösung werden vorbereitet. Die Flüssigkeiten werden in der o.a. Reihenfolge in eine 250 ml Glasflasche mit einem sterilen Vakuum-Laborfilter gefiltert mit Vakuumpumpe gefiltert. Die gefilterte Lösung muss unverzüglich in die Well-Titerplatten zur Inkubation der Schnitte gegeben werden, da das Wasserstoffperoxid die DAB-Lösung schrittweise inaktiviert. Die Inkubation dauert bis zu einer Stunde. Entscheidend ist ein ausreichender Farbumschlag der Schnitte.
 10. Waschen der Schnitte 2 – 3 x mit 0,05 M PB. Der DAB-Abfall wird mit Natriumhypochlorid neutralisiert.
 11. Waschen der Schnitte 5 x 5 min. mit 0,05 M PB mittels Laborrüttler.

2.10.3 Streptavidin, Alexa Fluor™ 488 conjugate-Färbung

Die 50 µm-Schnitte werden wie folgt angefärbt:

1. Streptavidin Alexa Fluor™ 488 conjugate 1 mg Pulver (ThermoFischer Scientific) wird in 1 ml 0,1 M PB gelöst. Die so gelöste Menge wird anschließend auf 50 µl/Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf) aufgeteilt und zur Langzeitlagerung bei -20°C im Kühlschrank gelagert.
2. Die Schnitte werden 5 x in 0,1 M PB gewaschen.
3. Die Schnitte werden mit 5 µg/ml Streptavidin + 0,3 % Triton X-100 in 0,1 M PB für 3 Std. inkubiert. Dabei werden 330 µl/Schnitt verwendet.
4. Die Schnitte werden 6 x in 0,1 M PB gewaschen.

2.10.4 Einbettung und Lagerung der Schnitte

Für die Einbettung der Schnitte wird die Arbeitsfläche sorgfältig von Staub und Schmutz mit 70% Alkohol gereinigt. Mittels feinem Spritzenfilter (Rotilabo®-Spritzenfilter, CME, steril, Poren-Gr.: 0,22 µm, ø außen: 33 mm) wird 0,05 M PB in eine kleine Kunststoff-Zellkulturschale (35 x 10 mm, Polystyren, Becton Dickinson Labware) gefüllt. Ein feiner Haarpinsel wird gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Einbettung der Schnitte werden Objektträger (Carl Roth) und Deckgläser der Stärke #0 (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Als Medium für die DAB-gefärbten Schnitte werden 330 µl Mowiol/Objektträger benutzt, für die Streptavidin Alexa Fluor-gefärbten Schnitte SlowFade™ Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific). Die Fixierung der mit SlowFade™ eingebetteten Deckgläser auf dem Objektträger erfolgt mit handelsüblichem klarem Nagellack.

Die Objektträger werden zunächst mit 70% Alkohol gereinigt. Das Einbetten beginnt mit dem letzten und größten Schnitt, da die anatomischen Strukturen hier makroskopisch erkennbar sind und sich die darüber liegenden kleineren Schnitte

so besser ausrichten lassen. Die Schnitte werden in den mit Puffer befüllten Petrischalen noch einmal gründlich gewaschen und dann auf die Objektträger übertragen. Die Lagerung der Objektträger erfolgt lichtgeschützt bei 4°C.

2.11 Mikroskopie

Für das mit DAB gefärbte Gewebe wird ein gewöhnliches Lichtmikroskop verwendet. Für die Fluoreszenz-Schnitte wird ein konfokales Laser Scanning Mikroskop benutzt. Für beide Färbeverfahren werden Übersichtsbilder in 4x-Vergrößerung angefertigt. In dieser Vergrößerung lassen sich die Barrel-Kolumnen und die Lage der angefärbten Nervenzellen beurteilen.

2.11.1 Übersichtsbilder

Für die Aufnahme wird ein Olympus BX51 Mikroskop mit motorisierter Plattform und 4x-Objektiv verwendet. Die Bilder werden mittels QICAM Fast Camera (QImaging Ltd.) und OASIS-4i-Controller (Objective Imaging Ltd.) aufgenommen. Die Akquirierung der Daten erfolgt mit der Surveyor V7.0.0.1-Software. Für die Übersichtsbilder wird eine Mosaikmustervorlage aus 17 x 9 Kacheln und einer Schrittgröße von $x=3200,05$ x $y=2390,96$ μm benutzt. Die Auflösung der Aufnahme beträgt in $x=2,355$ und in $y=2,355$ μm .

2.11.2 Lichtmikroskopie

Die Aufnahme der 100 μm -DAB-gefärbten Schnitte erfolgt wie in 2.11.1 mit einem 100x-Immersions-Objektiv (1.4 NA). Die Scanfeldgröße wird an die zu scannenden Strukturen angepasst. Die Auflösung beträgt in $x=0,184$, in $y=0,184$ μm , in $z=0,5$ μm .

2.11.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Es wird ein Leica TCS SP5 II, HCX PL APO mit motorisierter Plattform verwendet. Die Akquirierung der Daten erfolgt mittels zugehöriger Leica-Software. Folgende Parameter werden benutzt: Z-stack: Z-wide; Format: 1024x1024; Geschwindigkeit: 8000 Hz; Vergrößerungsfaktor: 2,5; Line-Average: 8; Frame-Average: 1; Rotation: 1.6; Laser: Argonlaser bei 30%. Ein Tropfen vom Immersionsöl Typ G mit $n_{23}^e=1,450$ wird auf dem zu scannenden Schnitt aufgetragen. Mittels 20x-Objektiv und Fluoreszenzauflicht wird der Zielbereich (Zellsoma) aufgesucht. Eine Orientierung in darunter und darüber liegenden Schnitten erfolgt anhand großer, quer angeschnittener Blutgefäße und den Hauptdendriten.

Ein Wellenlängenspektrum von 495 – 550 nm wird eingestellt und auf ein 63x-Objektiv gewechselt. Ein Gain von 10 – 20% und eine Laser-Power von 30 – 40% werden verwendet, um eine optimale Darstellung von Boutons und Dendritendornen zu bekommen.

Mittels Matrix-Screener Funktion (Single selected Mosaic) wird eine 10% Überlappung der Aufnahmebilder eingestellt. Die Positionen der unteren rechten und oberen linken Ecke des aufzunehmenden Gewebeabschnitts werden eingegeben, sodass letztendlich die Größe für die abzufahrende Bildfläche 800 x 800 μm beträgt. In axialer Richtung wird eine Schrittgröße von $z=0,5 \mu\text{m}$ verwendet. Die Auflösung beträgt in $x=0,092$ und in $y=0,092 \mu\text{m}$. Eine Pin-Hole-Größe von 55,76 μm wird verwendet.

2.11.4 Nachscannen

Erst nach der Bildaufnahme und im anschließenden Rekonstruktionsprozess zeigt sich, dass Axonstrukturen an den Bildrändern abgeschnitten wurden. So sind an diesen Stellen Nachscans nötig. Hierfür wird eine Musterscanvorlage verwendet, anhand derer sich der Verlauf fehlender Strukturen und damit der noch zu machenden Nachscans verfolgen lässt.

2.12 Prozessieren der Bilddaten

Für das Prozessieren der Bilddaten wird auf eine automatische Pipeline zurückgegriffen, welche neben einer linearen Dekonvolution zu 8-bit Grauwerte-Bildern eine automatische Detektion von Nervenzellstrukturen durchläuft (Oberlaender, 2007).

2.13 3D Rekonstruktion

Die 3D Rekonstruktion der Nervenzellen erfolgt mit der *AmiraZIB Edition 2016.33/2017.23* (Thermo Fischer Scientific), einer interaktiven 3D Visualisierungssoftware (Dercksen, Hege and Oberlaender, 2014). Die Nervenzellstrukturen werden als so genannte *SpatialGraph*-Daten repräsentiert, was dem „Skelett“ der Nervenzellstrukturen entspricht. Die 3D Rekonstruktion wird dabei in folgende Schritte unterteilt:

1. **Überprüfung:** Die automatisch detektierten Strukturen werden mittels Abgleich des zugehörigen Projektionsbildes auf Richtigkeit überprüft. Falsch detektierte Strukturen werden entfernt, korrekt detektierte Strukturen miteinander verbunden.
2. **Erste Zuordnung:** Die detektierten Strukturen werden basierend auf den Bilddaten den Kategorien „*Axon*“ und „*Dendrit*“ zugeordnet. Dabei können beide Strukturen mittels zugehörigem Projektionsbild klar voneinander unterschieden werden (Einleitung, siehe Abb. 1). Dendriten sind typischerweise dicker und es finden sich zahlreiche kleine runde Strukturen um sie herum, welche über dünne Äste mit der Hautstruktur in Verbindung stehen. Dabei handelt es sich um die dendritischen Dornen. Axone hingegen sind sehr dünn und weisen in ihrem Verlauf knopfartige Verdickungen auf, die so genannten Boutons. Ist eine Struktur nicht eindeutig zuordbar, wird sie als „*Unbekannt*“ gekennzeichnet. Diese kann später, d.h. nach dem Zusammensetzen der gesamten Nervenzellstruktur, eindeutig zugeordnet werden.

3. **Ausrichtung:** Die rekonstruierten Strukturen der einzelnen Schnitte werden in einer dreidimensionalen Umgebung so über- und untereinander angeordnet, dass sich die Strukturen in den Schnitten in ihrem Verlauf fortsetzen. Dabei wird mit der Soma-Ebene begonnen. Von dort aus lassen sich die darunter und darüber gelegenen Ebenen anschließen. Die Orientierung erfolgt zunächst an der Ausrichtung der prominenten Dendritenäste. Später werden überwiegend die Verläufe der Axone als Orientierung gewählt. Um die teilweise entstandenen Verzerrungen der Hirnschnitte und der daraus folgenden Verzerrungen in den Rekonstruktionen rückgängig zu machen, wird der Transformations-Editor verwendet. Mit dessen Hilfe lassen sich Rotation und Skalierung entlang aller drei Achsen verändern.
4. **Überprüfung der Ausrichtung und zweite Zuordnung:** Dieser sehr zeitaufwendige und arbeitsintensive Schritt ist für eine korrekte Zuordnung der Strukturen zu ihren zugehörigen Nervenzellen von entscheidender Bedeutung. Für die Axone werden die Axon-Initialsegmente einer Nervenzelle aufgesucht. Von hier aus wird die Axonstruktur bis in die Peripherie über alle Schnitte hinweg verfolgt und die einzelnen Struktursegmente der zugehörigen Nervenzelle zugeordnet. So wird bspw. für die erste Nervenzelle in *Nervenzelle_1_Axon* und *Nervenzelle_1_Dendrit* eingeteilt. Für weitere Nervenzelle wird analog vorgegangen. Finden sich im Verlauf uneindeutige Stellen, d.h. Bereiche in denen sich sehr viele Axone verschiedener Nervenzellen eng beieinander verlaufen und so nicht eindeutig zuzuordnen sind, werden die Bildrohdaten hinzugezogen und jede einzelne Struktur separat in ihrem Verlauf überprüft. Ggf. wird die Rekonstruktion korrigiert. Die Überprüfung der Bilddaten erfolgt mit *Fiji* (Schindelin *et al.*, 2012). Nur auf diese Weise können alle Axon- und Dendritenstrukturen ihren zugehörigen Nervenzellen zweifelsfrei zugeordnet werden.
5. **Zusammensetzen:** Abschließend werden die korrekt kategorisierten Strukturen Schicht um Schicht miteinander verbunden, sodass am Ende die vollständige Nervenzellmorphologie jeder einzelnen Nervenzelle vor-

handen ist. D.h. für jede einzelne Nervenzelle ist die vollständige Dendriten- und Axonmorphologie als dreidimensionales *SpatialGraph*-Objekt mit allen räumlichen Koordinaten abrufbar.

2.14 Bestimmung des Nervenzelltyps und Registrierung

Die Bestimmung des einzelnen Nervenzelltyps erfolgt anhand der Lage und der Anatomie einzelner Zellbestandteile.

Lokalisation: Die experimentelle Aufzeichnungstiefe (Pia-Soma Distanz gemessen mit Patch-Pipette) gibt bereits einen ersten Hinweis auf den entsprechenden Nervenzelltyp. Durch die Schichtung des Neokortex und seiner bekannten Grenzen kann auf den entsprechenden Nervenzelltyp geschlossen werden. In der granulären Schicht 4 des somatosensorischen Kortex der Ratte befinden sich z.B. 3 verschiedene Nervenzelltypen: Pyramidenzelle, Sternpyramidenzelle, dornige Sternpyramidenzelle. Die Zellkerne dieser Zellen liegen typischerweise zwischen 500 – 1000 μm tief (Staiger *et al.*, 2004). Die infragranuläre Schicht 5 beinhaltet zwei verschiedene Nervenzelltypen: breit-gebüschelte und schmal-gebüschelte Pyramidenzellen (Wise and Jones, 1977). Unterschieden wird anhand der Verzweigungen des Apikaldendriten der einzelnen Nervenzellen. Bei ersterem Zelltyp kommt es zu sehr ausgeprägten Aufzweigungen des Apikaldendriten, wenn sich dieser der Pia nähert. Letzterer zeigt praktisch keine Aufzweigungen seines Apikaldendriten. Die Lage der Zellkerne von Schicht 5-Zellen liegt typischerweise zwischen 1000 -1500 μm .

Anatomische Kriterien: Für eine Klassifikation der einzelnen Nervenzellen werden neben der Soma-Lage anatomische Parameter verglichen. Dabei wird insbesondere die Dendritenmorphologie einer Nervenzelle (Anzahl der Dendriten, Dendritenlänge, Länge von Apikal- und Basaldendriten, Volumen der Dendriten, Anzahl der dendritischen Verzweigungen, etc.) untersucht und damit der zugehörige Nervenzelltyp ermittelt (Oberlaender *et al.*, 2012). Axonparameter wie die Gesamtlänge und das Volumen sind weitere Kriterien für die Klassifikation einzelner Nervenzelltypen.

Registrierung: Alle Nervenzellen werden in ein geometrisch standardisiertes Modell von vS1 der Ratte eingefügt. Dieses 3-D Modell basiert auf den exakten anatomischen Daten von Pia, weißer Substanz und 24 Barrel-Kolumnen aus 12 Wistar Ratten Gehirnen. Der Ursprung des Koordinatensystems liegt hierbei in Schicht 4 des D2-Barrels (Egger *et al.*, 2012). Mittels Registrierung können Schnittrichtung und Schneideartefakte herausgerechnet werden und Nervenzellen unterschiedlicher Lokalisationen miteinander verglichen werden.

2.15 Putative synaptische Verbindungen

Als putative synaptische Verbindungen werden lichtmikroskopisch detektierte Kontaktstellen zwischen Axonen und Dendriten bezeichnet, in denen es zu sichtbaren Überlappungen beider Strukturen innerhalb eines Voxels (92 x 92 x 500 nm) kommt. Bei diesen Kontaktstellen kann es sich um eine echte Synapse handeln. Die Überlappungen selbst werden zusätzlich auf das Vorhandensein prä- und postsynaptischer Elemente untersucht, also Boutons auf axonaler Seite und Dendriten bzw. ihre Dornfortsätze.

2.15.1 Automatische Detektion

Die manuelle Überprüfung der gesamten Dendriten- und Axonmorphologie auf mögliche Überlappungen prä- und postsynaptischer Elemente ist aufwendig. So wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit ein Programm entwickelt, das all diejenigen Bereiche zwischen zwei einzelnen Nervenzellen detektieren sollte, in denen sich Dendriten und Axone in einem Abstand von 0 - 4 μm nahekommen. In einem nächsten Schritt werden die zu diesen Bereichen gehörigen Bilddaten extrahiert und auf eine Größe von 10 x 10 μm beschnitten mit der Kontaktstelle im Zentrum. Anschließend werden diese Stellen manuell auf das Vorhandensein einer putativen Synapse überprüft. Der 4 μm -Abstand ist das Ergebnis einer Untersuchung verschiedener Abstandswerte beider Strukturen auf das Vorhandensein putativer synaptischer Verbindungen. So werden bis zu einem Abstand von

4 μm alle putativen Synapsen zwischen zwei Nervenzellen berücksichtigt. Wird der Abstand größer, werden keine weiteren Überlappungen zwischen Axonen und Dendriten detektiert (Smyth, 2015). Abb. 3 zeigt exemplarisch die Funktionsweise der automatischen Detektion. Dabei ist ein Ausschnitt des Axons einer Nervenzelle und des Dendriten einer anderen Nervenzelle zu sehen. In grün sind diejenigen Stellen markiert, in denen sich Axon und Dendrit bis zu 4 μm voneinander entfernt liegen.

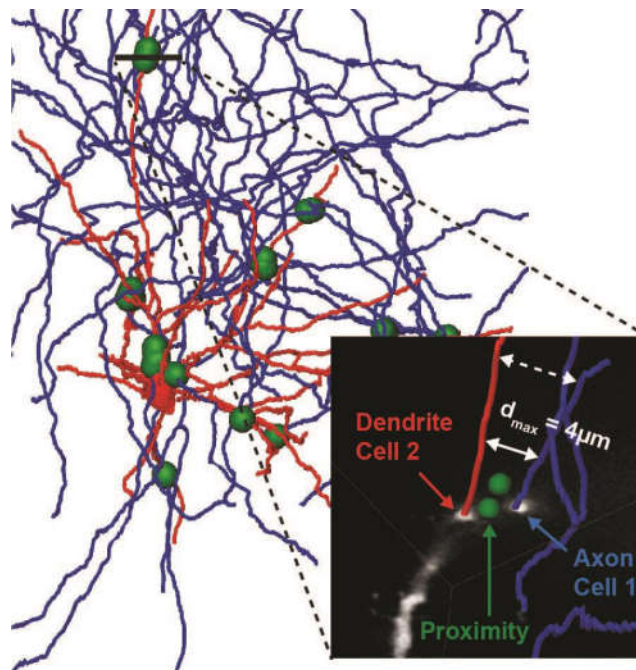


Abb. 3. Funktionsweise der automatischen Detektion. Blau = Axone Nervenzelle 1, Rot = Dendrit Nervenzelle 2, Grüne Punkte = Bereiche, in denen sich Axon und Dendrit innerhalb von 4 μm genähert haben. Rechter unterer Bildrand: Vergrößerter Bildausschnitt mit Dendrit und Axon.

2.15.2 Manuelle Überprüfung

Alle automatisch detektierten Stellen werden manuell auf das Vorhandensein einer Kontaktstelle überprüft. Dabei werden nur diejenigen Stellen markiert, bei denen es innerhalb eines Voxels (92 x 92 x 500 nm) zu einer Überlappung von Axon- und Dendritensignalen kommt. Diese Stelle wird als putativer Kontakt gewertet.

Zusätzlich wird untersucht, ob ein eindeutig nachweisbares Bouton an der Kontaktbildung beteiligt ist. Diese Stelle wird gesondert gewertet (putativer Kontakt mit Bouton), weil er am ehesten das Kriterium einer putativen Synapse erfüllt (vgl. Einleitung).

In einem weiteren Schritt wird zwischen der jeweiligen synaptischen Zielstruktur unterschieden, also ob der Kontakt an einem dendritischen Dorn, dem Dendritenstamm oder dem Soma selbst zu sehen ist.

2.15.3 Statistik

Die statistischen Auswertungen der Datensätze und die Erstellung der Graphiken erfolgen unter zu Hilfenahme von Excel (Microsoft) und MatLab 6.5.1.

3 Ergebnisse

3.1 Überblick der Experimente

Es wurden 76 Experimente durchgeführt. Die Versuchstiere hatten dabei ein Alter von 27 bis 50 Tagen, das Gewicht der Tiere lag zwischen 96 und 284 g. 46 Experimente wurden mit der DAB-Färbemethode gefärbt, 30 Experimente mittels Streptavidin-Alexa Fluor. 29 Versuche waren erfolgreich, d.h. es wurde mindestens eine Nervenzelle in sehr hoher Qualität angefärbt. Axon- und Dendritenstrukturen sowie subzelluläre Elemente (dendritische Dornen, Boutons) waren dabei gut sichtbar. 15 dieser Experimente hatten eine sehr hohe Anfärbequalität von mindestens zwei Nervenzellen. Die maximale Anzahl angefärbter Nervenzellen in einem einzelnen Experiment betrug bis zu 6 Nervenzellen.

3.2 Abbildungen multipler Nervenzellen *in vivo*

4x-Übersichtsbilder: Die Hirnschnitte wurden zunächst in 4x-Vergrößerung aufgenommen. Abb. 4 zeigt die Aufnahme eines tangential zum Barrel-Kortex erfolgten Hirnschnitts in einer Tiefe von etwa 0,8 mm zur Pia. Die Barrel-Kolumnen zeigten sich als oval-runde Aufhellungen im Gewebe mit Eigenfluoreszenz. Der Barrel-Kortex repräsentiert diejenigen Nervenzellen, welche für die Prozessierung sensorischer Informationen einzelner Tastaare an der Schnauze der Ratte zuständig sind. Daneben wird eine mit Biocytin markierte Nervenzelle im Gamma-Barrel des somatosensorischen Kortex gezeigt.

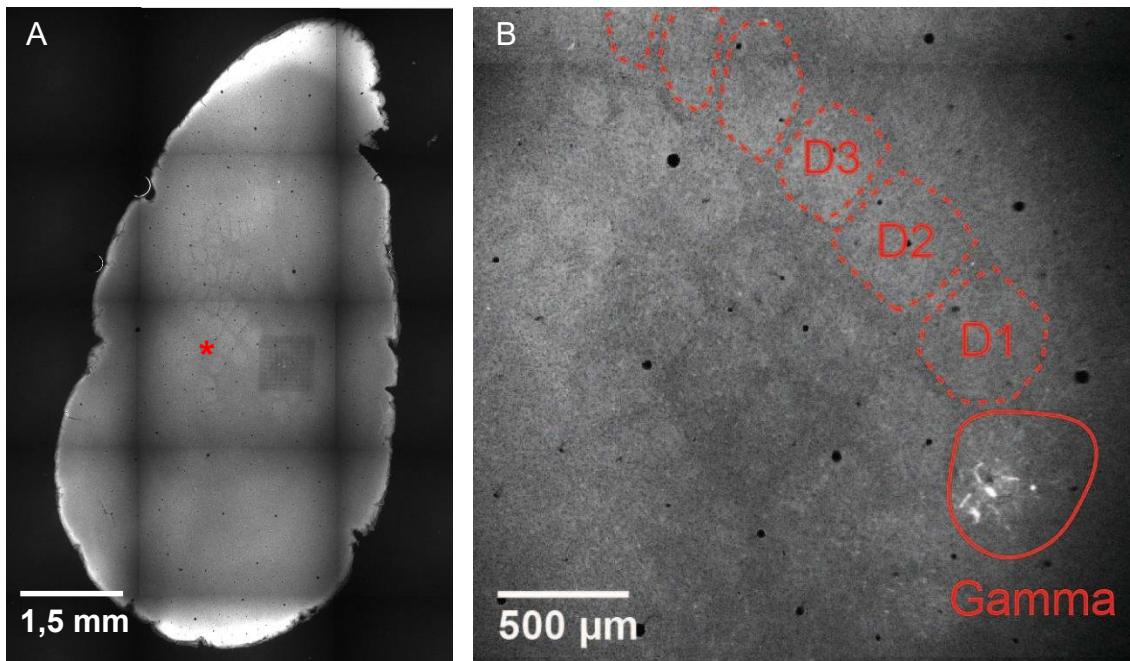


Abb. 4. Lokalisation der mit Biocytin markierten Nervenzellen im Barrel-Kortex der Ratte. **A**, 4x-Übersichtsaufnahme eines Tangentialschnittes mit Darstellung des Barrel-Kortex (*). Der Schnitt liegt in einer Tiefe von ca. 0,8 mm von der Pia entfernt. Die typische kolumnare Reihung der Barrels ist hier bereits gut zu erkennen. **B**, Nahaufnahme der Barrel-Region. Gestrichelte Linie: Die aufgereihten Barrel-Kolumnen der D-Reihe. Durchgezogene Linie: Die Gamma-Barrel Kolumne. Bei den dickeren weißen Strukturen handelt es sich um die angeschnittenen Dendriten einer mit Biocytin markierten Nervenzelle. Die weißen Haarlinien sind Biocytin-markierte Axonstrukturen.

Vergleich von konventioneller Lichtmikroskopie und konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie: Abb. 5 zeigt die Gegenüberstellung einer konventionell DAB-gefärbten Aufnahme mittels Lichtmikroskop gegenüber der Aufnahme einer mit Streptavidin-Alexa Fluor gefärbten Nervenzelle mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie. Der Streptavidin-gefärbte Schnitt zeigt im Gegensatz zur DAB-Färbung kein Hintergrundsignal. In der Nahaufnahme der Streptavidin-gefärbten Nervenzelle lassen sich Dendriten und Axone deutlich voneinander abgrenzen. Die Dornfortsätze der Dendriten sind im Vergleich zur DAB-gefärbten

Nervenzelle klar und scharf zu erkennen. Der Dendritendornhals, das ist die Verbindung des Dendritendornköpfchens zum Dendritenstamm ist ausschließlich in der Streptavidin-gefärbten Nervenzelle klar zu erkennen.

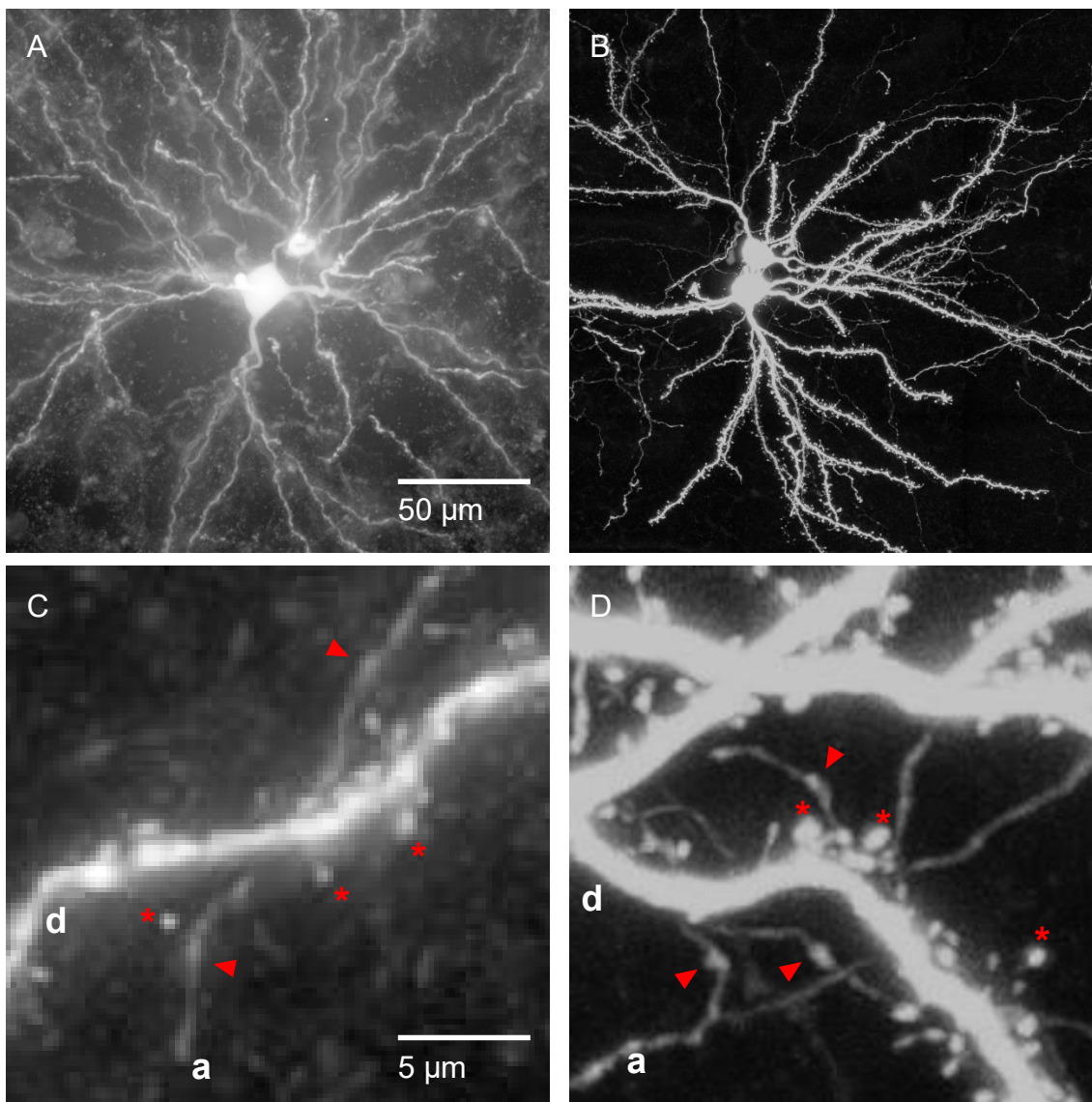


Abb. 5. Vergleich von DAB-Färbung und Streptavidin-Alexa Fluor Färbung. A, DAB-Soma-Region, B, Streptavidin-Alexa Fluor Soma-Region. A, B, Zwischen beiden Färbungen fällt das deutlich stärkere Hintergrundsignal der DAB-Färbung auf. C, D, DAB-Färbung (C) und Streptavidin-Färbung (D) vergrößert. Dendriten (d) und Axone (a) sind zu sehen. An den Dendriten sind dendritische Dornen (*) und an den Axonen Boutons (Pfeilspitzen) deutlich erkennbar.

Bildaufnahme mittels Laser-Scanning Mikroskopie: Für die anschließenden Rekonstruktionen und die Untersuchung auf putative Kontaktstellen wurden ausschließlich die Streptavidin-Alexa Fluor gefärbten Schnitte verwendet. Insgesamt wurden 7 Experimente vollständig mittels Laser-Scanning Mikroskopie eingescannt. Im Durchschnitt waren dazu 79 Scans pro Experiment inklusive Nachscans nötig. Das mittlere Scanvolumen pro Experiment betrug 2,52 mm³ (Tab. 4).

Tab. 4. Anzahl benötigter Scans/Nachscans pro Experiment und Scanvolumen.

Experiment	Scans	Nachscans	Scan-Volumen [10 ⁹ μm ³]
1	42	0	1,34
2	31	36	2,14
3	32	208	7,68
4	20	0	0,64
5	31	4	1,12
6	27	0	0,86
7	39	82	3,87
∅	32	47	2,52

Abb. 6 zeigt die Projektionsbilder von zwei Soma-Ebenen unterschiedlicher Tiefen aus drei Experimenten. Die Biocytin-Markierung der einzelnen Nervenzellen ist ähnlich stark ausgeprägt. Die Nervenzellen lagen in einer Tiefe von 700 – 1050 μm von der Pia entfernt.

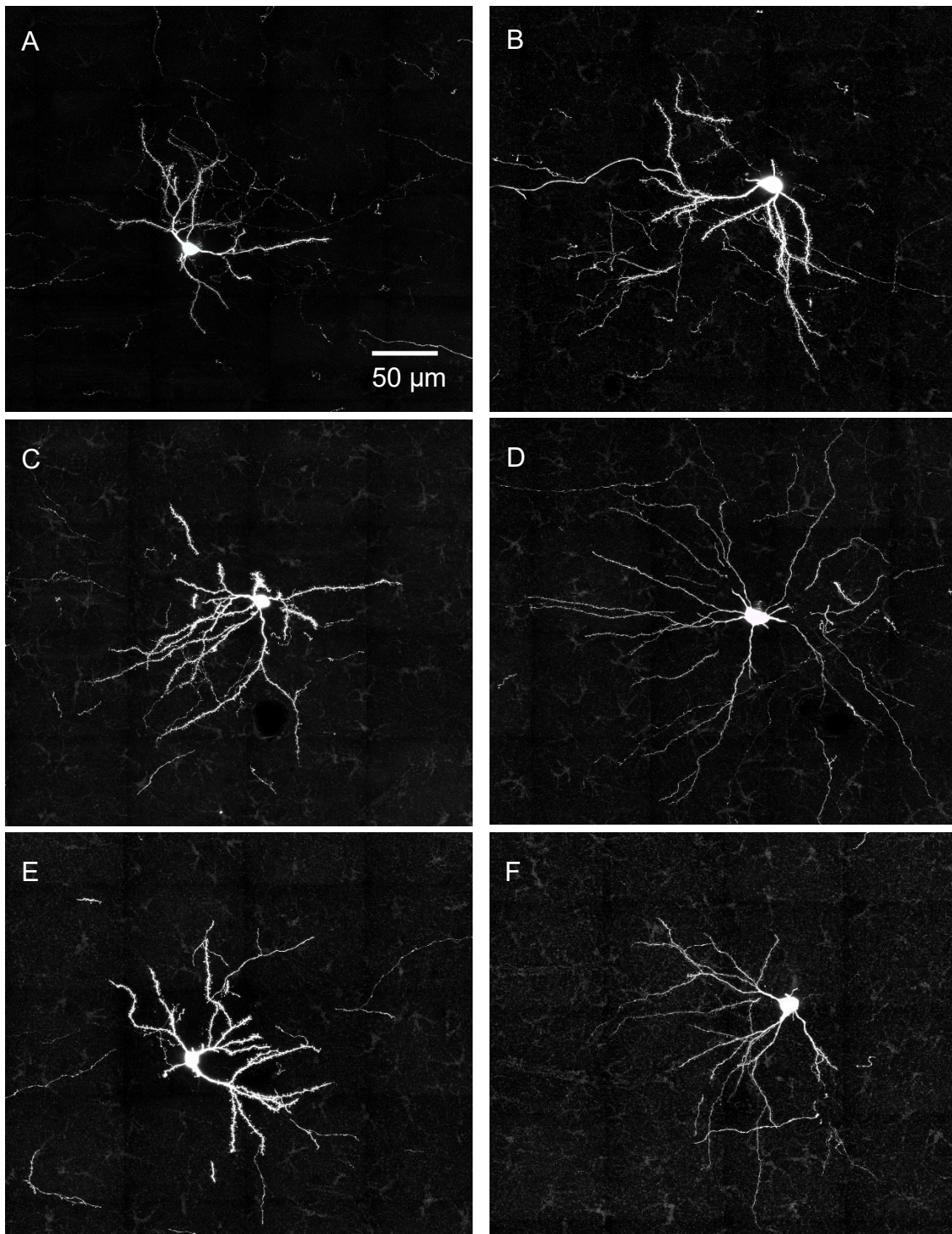


Abb. 6. Max-Z-Projektionsbilder von 3 mittels Biocytin markierter Nervenzellpaare. **A,B**, Experiment 1: Nervenzelle A liegt in einer Tiefe von etwa 700 μm , Nervenzelle B in einer Tiefe von ca. 900 μm . **C,D**, Experiment 2: Nervenzelle C liegt in einer Tiefe von etwa 800 μm , Nervenzelle D liegt in einer Tiefe von ca. 1050 μm . **E,F**, Experiment 3: Nervenzelle E liegt in einer Tiefe von ca. 700 μm , Nervenzelle F liegt in einer Tiefe von ca. 1050 μm .

3.3 3D Rekonstruktion

3D Rekonstruktion multipler Nervenzellen: 5 der 7 eingescannten Experimente wurden vollständig rekonstruiert. Die 3D Bilddaten wurden dazu mit der Neuromorph-Pipeline prozessiert (Oberlaender *et al.*, 2009). Die Rekonstruktion der Daten erfolgte mit der 3D-Visualisierungssoftware *AmiraZIBEdition 2016.33/2017.23* (Dercksen, Hege and Oberlaender, 2014).

In einem Experiment fanden sich zwei Nervenzellen, in 3 Experimenten 3 Nervenzellen und im letzten Experiment 6 angefärbte Nervenzellen. Insgesamt wurden 17 Nervenzellen aus 5 Experimenten vollständig rekonstruiert. 15 Nervenzellen hatten dabei eine sehr hohe Anfärbequalität, 3 Nervenzellen waren nur schwach gefärbt. Hier konnte nur die vollständige Dendritenmorphologie und Teile der Axonmorphologie rekonstruiert werden. Subzelluläre Elemente wie Dendritendornen und Boutons wurden nicht gesehen.

Abb. 7 – 16 zeigen die vollständigen Rekonstruktionen aller Nervenzellen. In Tab. 5 – 9 wurden wesentliche anatomische und elektrophysiologische Parameter der einzelnen Nervenzellen zusammengefasst. Im Mittel füllten die Nervenzellen pro Experiment ein Volumen von $5,47 \text{ mm}^3$ aus. Dabei waren die Zellkerne im Schnitt $132 \text{ }\mu\text{m}$ voneinander entfernt. Alle untersuchten Nervenzellen lagen in einer experimentell gemessenen Tiefe (Pia-Soma Distanz) von $813 - 1219 \text{ }\mu\text{m}$ (Mittelwert $951 \text{ }\mu\text{m}$). Alle untersuchten Nervenzellen lagen im gleichen Barrel. 9 Nervenzellen lagen in E1, 5 Nervenzellen in E2 und 3 in D1.

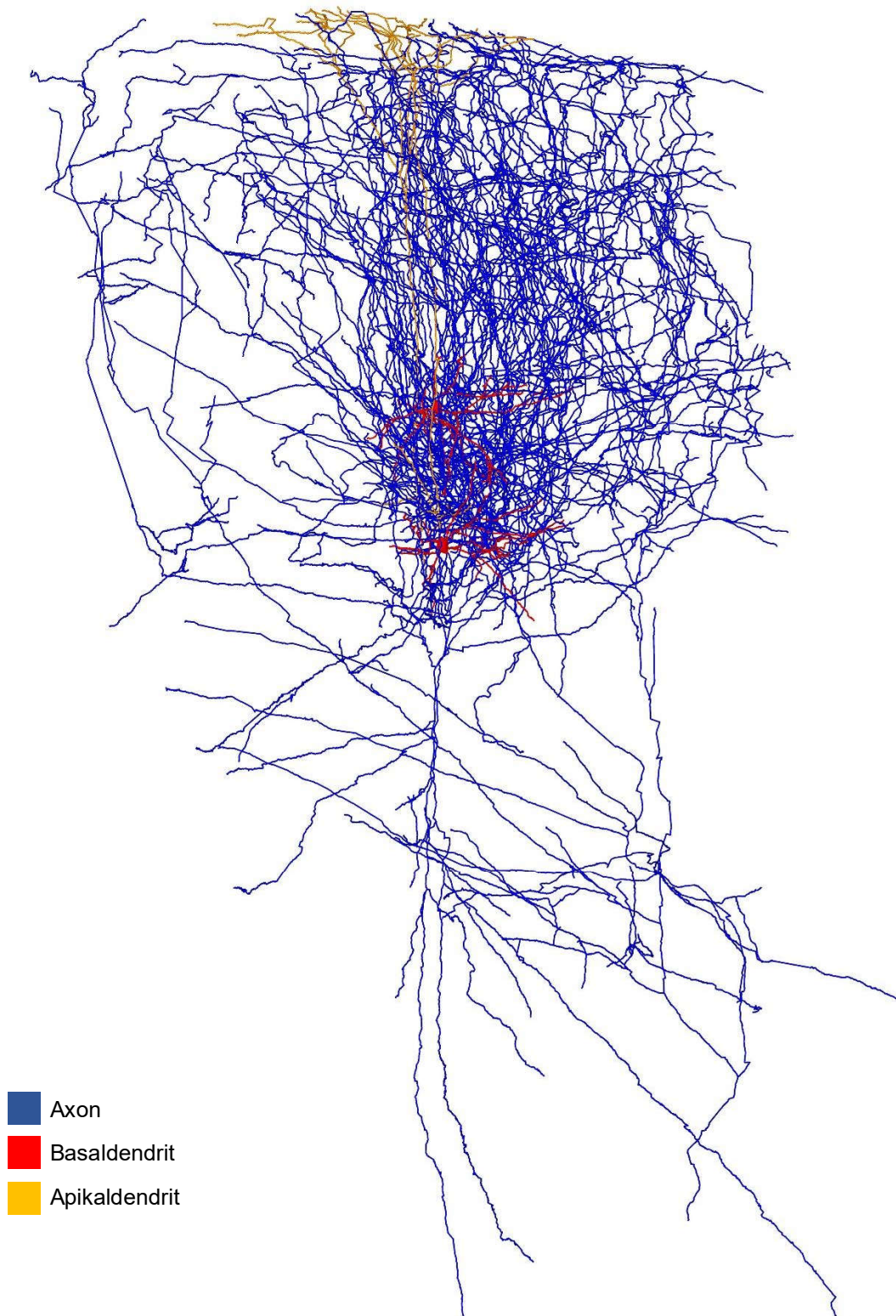


Abb. 7. Experiment 1: 3D Rekonstruktion von 3 Nervenzellen. Die einzelnen Nervenzellen befinden sich in Schicht 4 und 5. Farbschema: Blau = Axon, Rot = Basaldendrit, Gelb = Apikaldendrit.

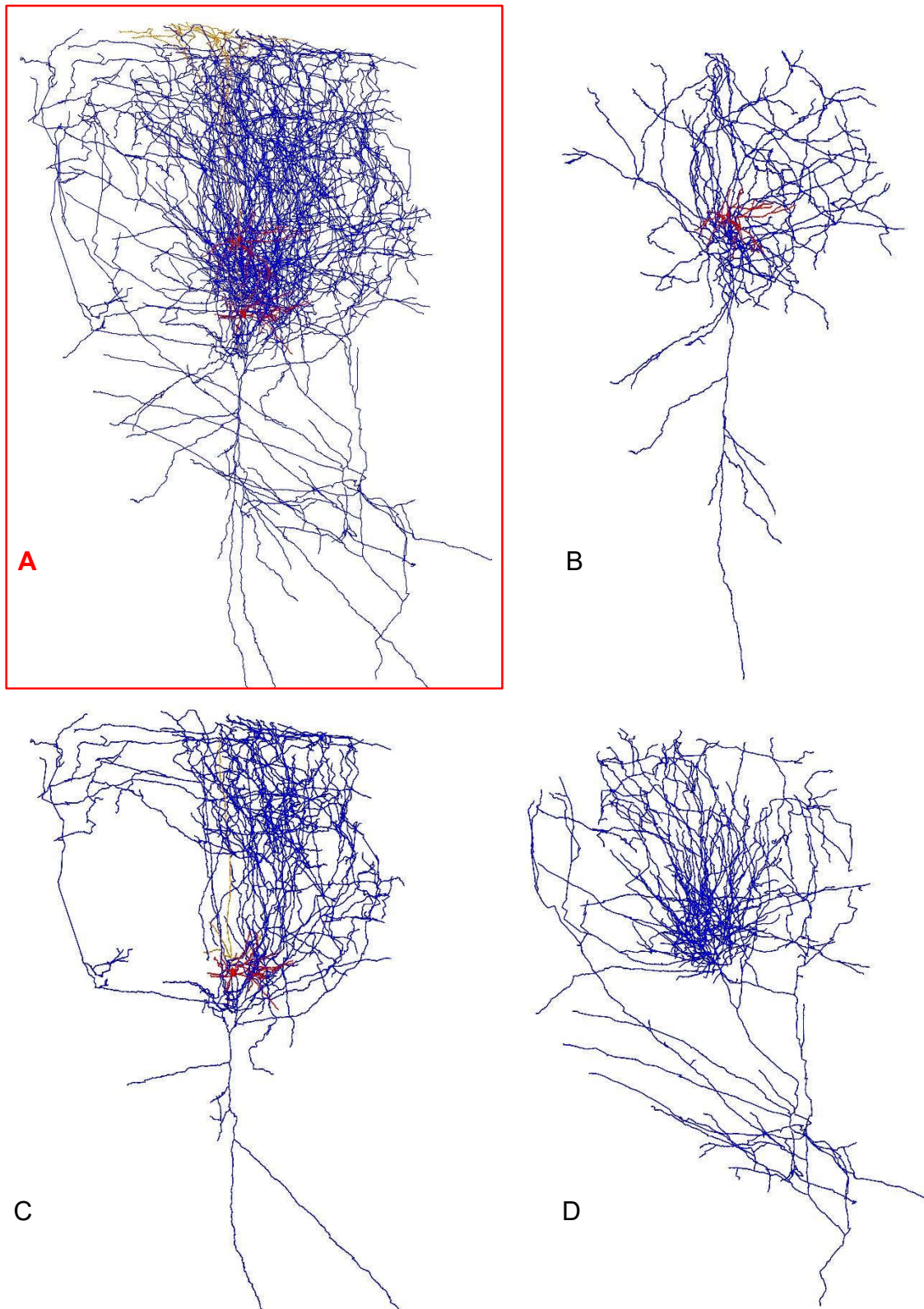


Abb. 8. Experiment 1: 3D Rekonstruktionen der einzelnen Nervenzellen. **A**, 3D Rekonstruktion des Gesamtexperiments. Farbschema: Blau = Axon, Rot = Basaldendrit, Gelb = Apikaldendrit. **B**, Schicht 4 dornige Sternpyramidenzelle. **C**, Schicht 5 schmal-gebüschelte Pyramidenzelle. **D**, Axon einer Nervenzelle aus dem Nucleus ventralis posteriomedialis (Thalamus).

Tab. 5. Experiment 1: Anatomische und elektrophysiologische Parameter der einzelnen Nervenzellen. L4 ss = Schicht 4 dornige Sternpyramidenzelle, L5 st = Schicht 5 schmal-gebüschelte Pyramidenzelle, VPM-Axon = Axon einer Nervenzelle aus dem Nucleus ventralis posteromedialis (Thalamus).

Nervenzelle	1	2	3	Gesamt
Aufzeichnungstiefe [μm]	893	1193		
Barrel	E1	E1		
Spontanfrequenz [Hz], anästhesiert	0,28	0,51		
Alle Dendriten:				
Länge [μm]	2998	4776		7774
Verzweigungen	26	20		
Volumen [$10^7 \mu\text{m}^3$]	0,99	5,97		
Apikaldendrit:				
Länge [μm]		1349		
Verzweigungen		2		
Volumen [$10^7 \mu\text{m}^3$]		2,17		
Basaldendrit:				
Länge [μm]		3427		
Verzweigungen		18		
Volumen [$10^7 \mu\text{m}^3$]		1,41		
Axon:				
Länge [mm]	42,88	82,46	68,05	193,37
Verzweigungen	140	313	291	
Volumen [$10^9 \mu\text{m}^3$]	1,94	3,39	2,16	
Gesamte Nervenzelle				
Volumen [$10^9 \mu\text{m}^3$]	1,95	3,39	2,16	3,59
Anfärbequalität	hoch	hoch	hoch	
Typ	L4 ss	L5 st	VPM	
Intersomatische Distanz [μm]				
Zelle 1 zu		198	X	

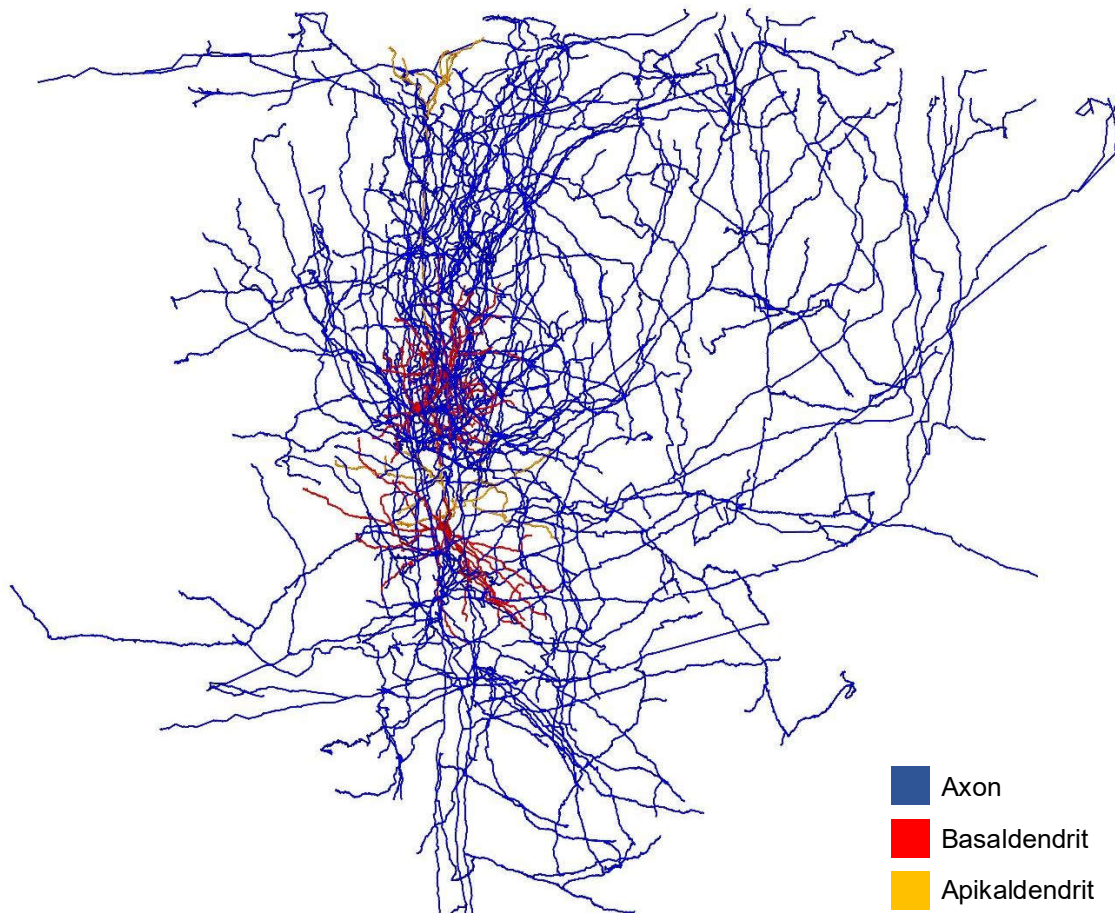


Abb. 9. Experiment 2: 3D Rekonstruktion von 3 Nervenzellen. Die einzelnen Nervenzellen befinden sich in Schicht 4 und 5 des Barrel-Kortex. Farbschema: Blau = Axon, Rot = Basaldendrit, Gelb = Apikaldendrit.

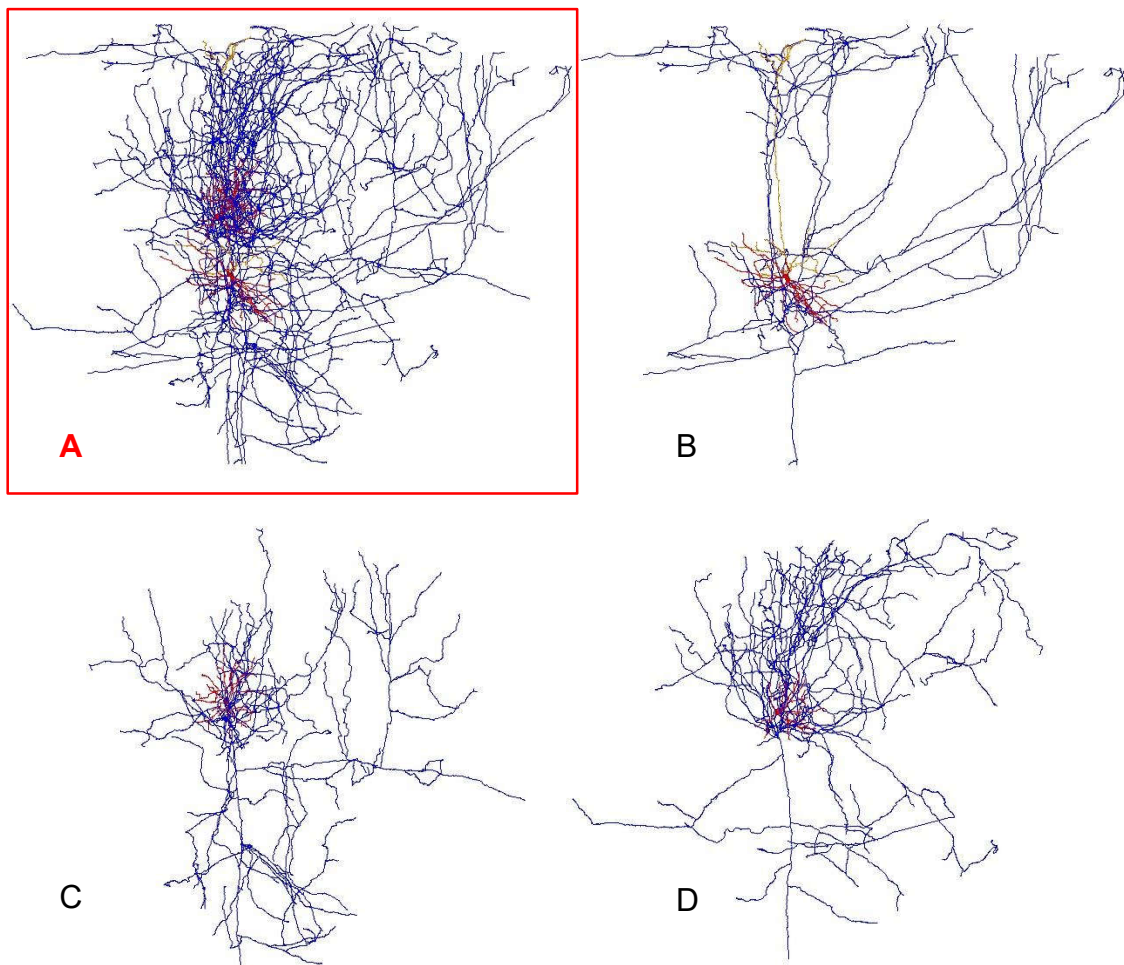


Abb. 10. Experiment 2: 3D Rekonstruktionen der einzelnen Nervenzellen. **A**, 3D Rekonstruktion des Gesamtexperiments. Farbschema: Blau = Axon, Rot = Basaldendrit, Gelb = Apikaldendrit. **B**, Schicht 5 breit-gebüschelte Pyramidenzelle. **C**, Schicht 4 Sternpyramidenzelle. **D**, Schicht 4 Sternpyramidenzelle.

Tab. 6. Experiment 2: Anatomische und elektrophysiologische Parameter der einzelnen Nervenzellen. L5 tt = Schicht 5 breit-gebüschelte Pyramidenzelle, L4 sp = Schicht 4 Sternpyramidenzelle, L4 ss = Schicht 4 dornige Sternpyramidenzelle X = Kein Zahlenwert vorhanden.

Nervenzelle	1	2	3	Gesamt
Aufzeichnungstiefe [μm]	1138	817	886	
Barrel	E1	E1	E1	
Spontanfrequenz [Hz], anästhesiert	1,39	0,92	X	
Alle Dendriten:				
Länge [μm]	9592	3835	3124	16551
Verzweigungen	39	28	27	
Volumen [$10^7 \mu\text{m}^3$]	25,18	1,5	1,03	
Apikaldendrit:				
Länge [μm]	4286	1482		
Verzweigungen	20	10		
Volumen [$10^7 \mu\text{m}^3$]	12,23	0,56		
Basaldendrit:				
Länge [μm]	5306	2353		
Verzweigungen	19	18		
Volumen [$10^7 \mu\text{m}^3$]	5,48	0,83		
Axon:				
Länge [mm]	42,89	46,78	61,57	151,24
Verzweigungen	145	193	185	
Volumen [$10^9 \mu\text{m}^3$]	3,14	1,92	2,79	
Gesamte Nervenzelle				
Volumen [$10^9 \mu\text{m}^3$]	3,14	3,18	2,79	3,8
Anfärbequalität	hoch	hoch	hoch	
Typ	L5 tt	L4 sp	L4 ss	
Intersomatische Distanz [μm]				
Zelle 1 zu		72	269	
Zelle 2 zu			214	

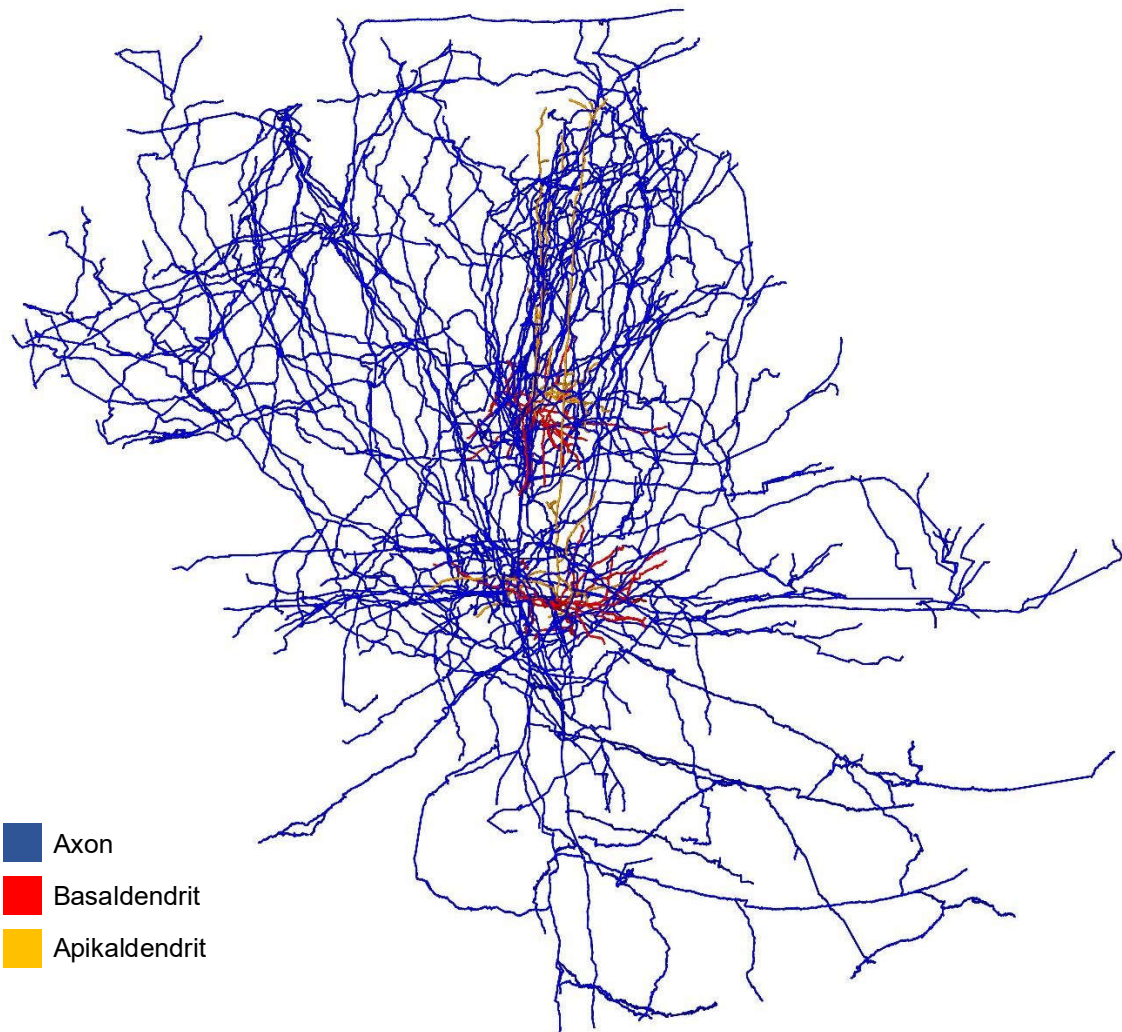


Abb. 11. Experiment 3: 3D Rekonstruktion von 3 Nervenzellen. Die einzelnen Nervenzellen befinden sich in Schicht 4 und 5 des Barrel-Kortex. Farbschema: Blau = Axon, Rot = Basaldendrit, Gelb = Apikaldendrit.

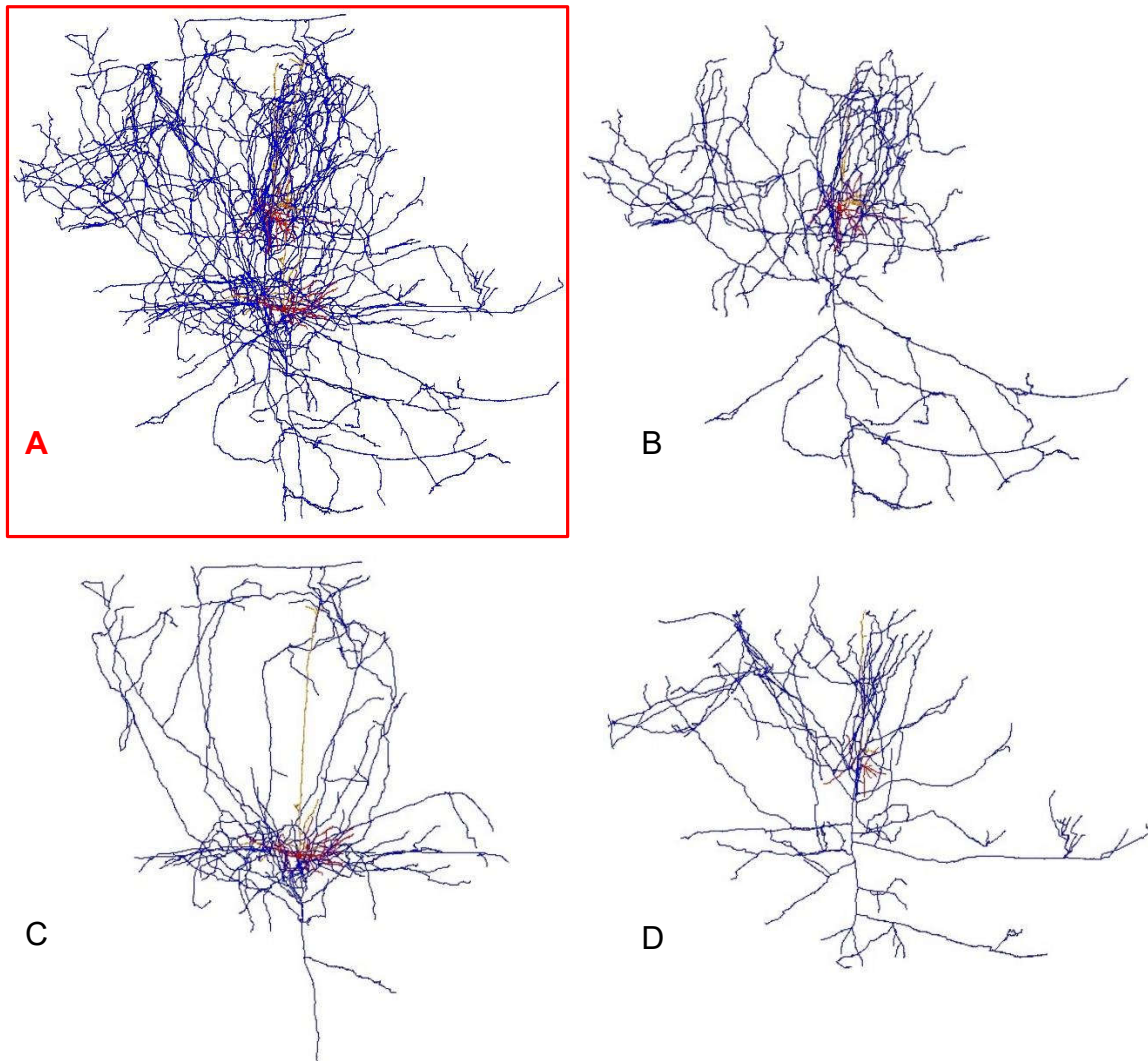


Abb. 12. Experiment 3: 3D Rekonstruktionen der einzelnen Nervenzellen. A, 3D Rekonstruktion des Gesamtexperiments. Farbschema: Blau = Axon, Rot = Basaldendrit, Gelb = Apikaldendrit. **B**, Schicht 4 Sternpyramidenzelle. **C**, Schicht 5 schmal-gebüschelte Pyramidenzelle. **D**, Schicht 4 Sternpyramidenzelle. Die Anfärbung dieser Nervenzelle war schwach.

Tab. 7. Experiment 3: Anatomische und elektrophysiologische Parameter der einzelnen Nervenzellen. L4 sp = Schicht 4 Sternpyramidenzelle, L5 st = Schicht 5 schmal-gebüschelte Pyramidenzelle. X = Kein Zahlenwert vorhanden. Beachte: Die Anfärbequalität von Zelle 3 war niedrig.

Nervenzelle	1	2	3	Gesamt
Aufzeichnungstiefe [µm]	813	1124	813	
Barrel	E1	E1	E1	
Spontanfrequenz [Hz], anästhesiert	0,12	0,62	X	
Alle Dendriten:				
Länge [µm]	3620	5680	1585	10885
Verzweigungen	27	27	10	
Volumen [$10^7 \mu\text{m}^3$]	3,45	10,49	2,32	
Apikaldendrit:				
Länge [µm]	1453	2200	857	
Verzweigungen	12	11	7	
Volumen [$10^7 \mu\text{m}^3$]	0,7	7,09	0,39	
Basaldendrit:				
Länge [µm]	2168	3480	728	
Verzweigungen	15	16	3	
Volumen [$10^7 \mu\text{m}^3$]	1,09	1,31	0,45	
Axon:				
Länge [mm]	55,9	37,18	33,36	126,44
Verzweigungen	170	153	138	
Volumen [$10^9 \mu\text{m}^3$]	2,21	1,43	1,78	
Gesamte Nervenzelle				
Volumen [$10^9 \mu\text{m}^3$]	2,21	1,43	1,78	2,65
Anfärbequalität	hoch	hoch	niedrig	
Typ	L4 sp	L5 st	L4 sp	
Intersomatische Distanz [µm]				
Zelle 1 zu		286	20	
Zelle 2 zu			273	

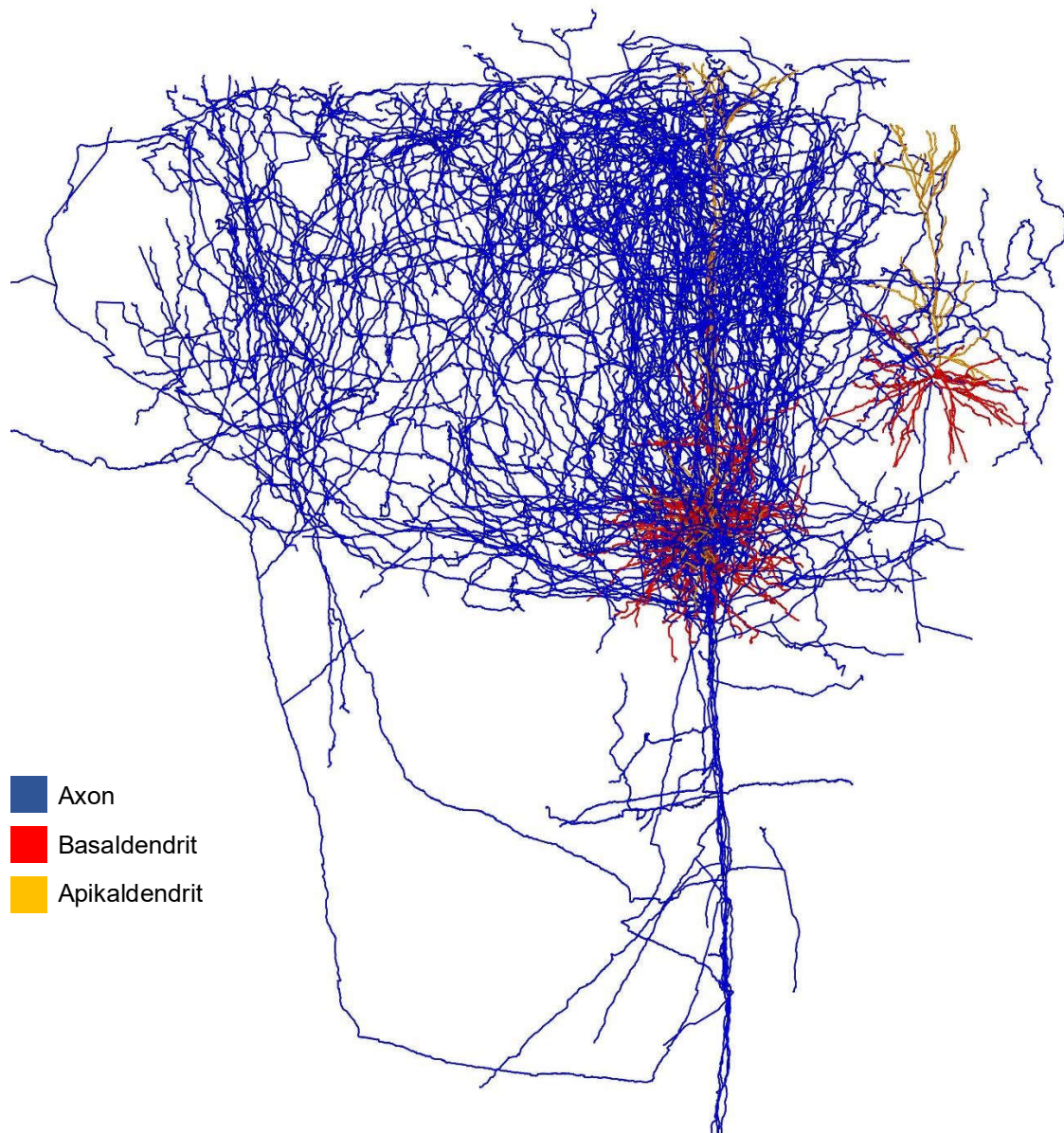


Abb. 13. Experiment 4: 3D Rekonstruktion von 6 Nervenzellen. Die einzelnen Nervenzellen befinden sich in Schicht 3, 4 und 5 des Barrel-Kortex. Farbschema: Blau = Axon, Rot = Basaldendrit, Gelb = Apikaldendrit.

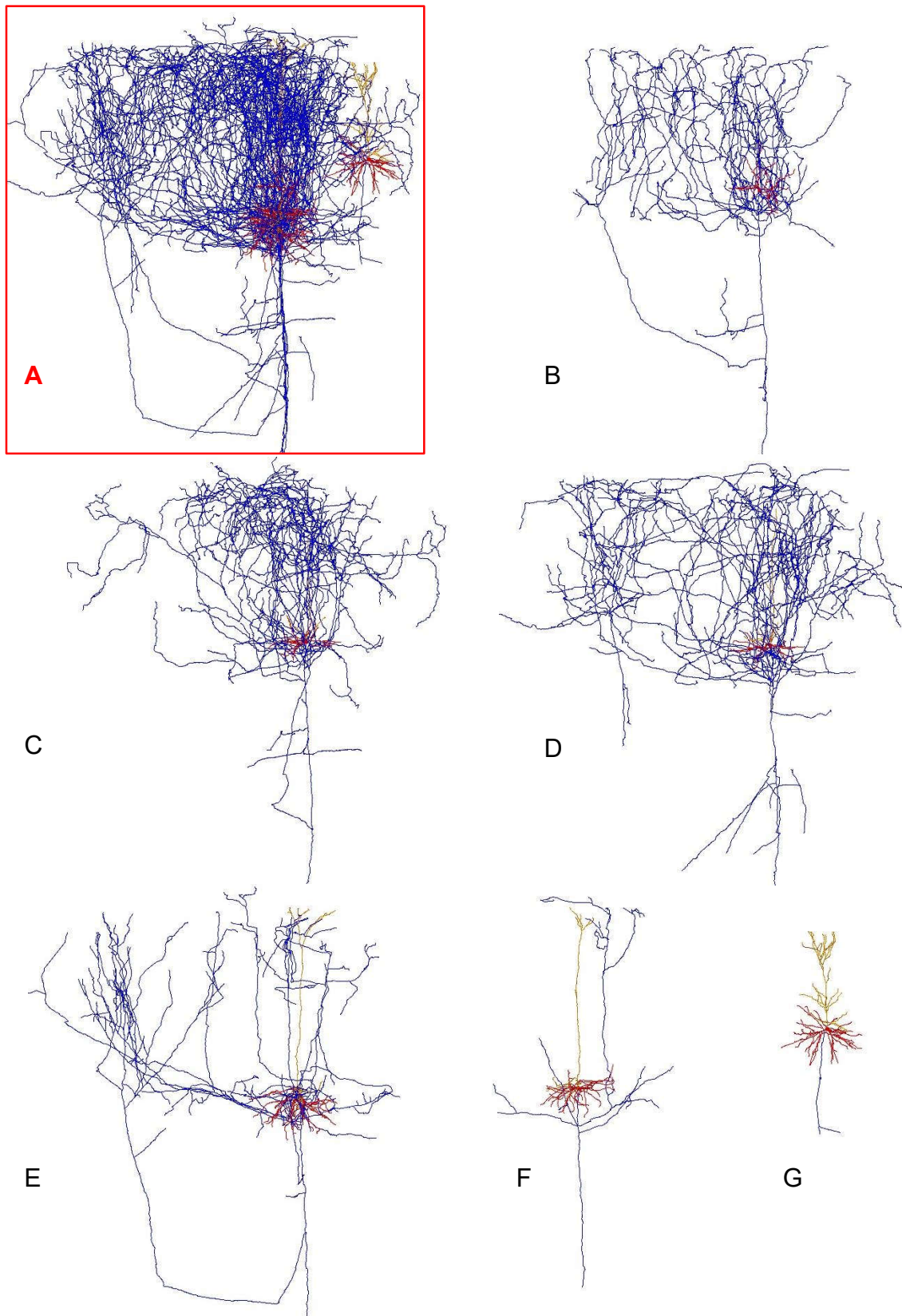


Abb. 14. Experiment: 3D Rekonstruktionen einzelner Nervenzellen. **A**, 3D Rekonstruktion des Gesamtexperiments. Farbschema: Blau = Axon, Rot = Basaldendrit, Gelb = Apikaldendrit. **B - D**, Schicht 4 Sternpyramidenzellen. **E, F**, Schicht 5 schmal-gebüschelte Pyramidenzellen. **G**, Schicht 3 Pyramidenzelle.

Tab. 8. Experiment 4: Anatomische und elektrophysiologische Parameter der einzelnen Nervenzellen. L4 sp = Schicht 4 Sternpyramidenzelle, L5 st = Schicht 5 schmal-gebüschelte Pyramidenzelle, L3 py = Schicht 3 Pyramidenzelle. X = Kein Zahlenwert vorhanden. Beachte: Die Anfärbequalität von Zelle 5 und 6 war niedrig.

Nervenzelle	1	2	3	4	5	6	Gesamt
Aufzeichnungstiefe [µm]	851	X	1012	X	X	X	
Barrel	E2	E2	E2	E2	E2	E1	
Spontanfrequenz [Hz], anästhesiert	0,06	X	0,02	X	X	X	
Alle Dendriten:							
Länge [µm]	3580	4146	4352	10535	7330	9542	39485
Verzweigungen	21	25	22	54	43	56	
Volumen [10 ⁷ µm ³]	2,28	5,03	8,66	19,2	13,08	8,87	
Apikaldendrit:							
Länge [µm]	890	960	1384	3383	2213	4010	
Verzweigungen	5	5	5	20	11	24	
Volumen [10 ⁷ µm ³]	0,67	1,3	2,81	6,66	5,77	3,24	
Basaldendrit:							
Länge [µm]	2691	3186	2968	7152	5118	5533	
Verzweigungen	16	20	17	34	32	32	
Volumen [10 ⁷ µm ³]	1,6	1,4	1,67	3,8	2,12	2,56	
Axon:							
Länge [mm]	67,09	100,11	118,72	47,28	7,4	0,66	341,25
Verzweigungen	184	244	349	159	20		
Volumen [10 ⁹ µm ³]	1,83	4,19	6,38	4,75	1,14	0,01	
Gesamte Nervenzelle							
Volumen [10 ⁹ µm ³]	1,83	4,19	6,38	4,75	1,14	0,15	6,85
Anfärbequalität	hoch	hoch	hoch	hoch	mittel	niedrig	
Typ	L4 sp	L4 sp	L4 sp	L5 st	L5 st	L3 py	
Intersomatische Distanz [µm]							
Zelle 1 zu		105	116	179	140	681	
Zelle 2 zu			22	78	41	737	
Zelle 3 zu				65	31	731	
Zelle 4 zu					44	766	
Zelle 5 zu						739	

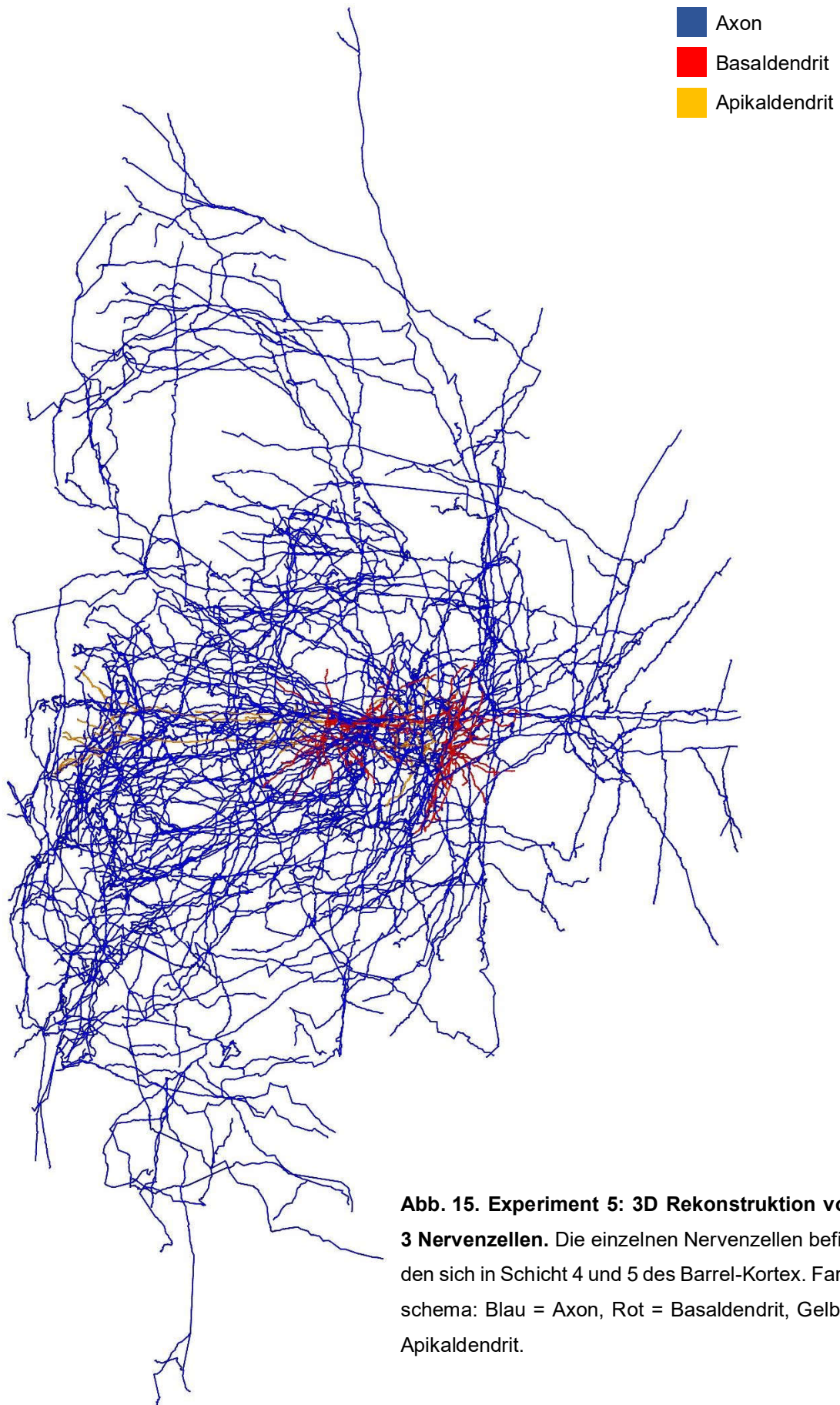


Abb. 15. Experiment 5: 3D Rekonstruktion von 3 Nervenzellen. Die einzelnen Nervenzellen befinden sich in Schicht 4 und 5 des Barrel-Kortex. Farbschema: Blau = Axon, Rot = Basaldendrit, Gelb = Apikaldendrit.

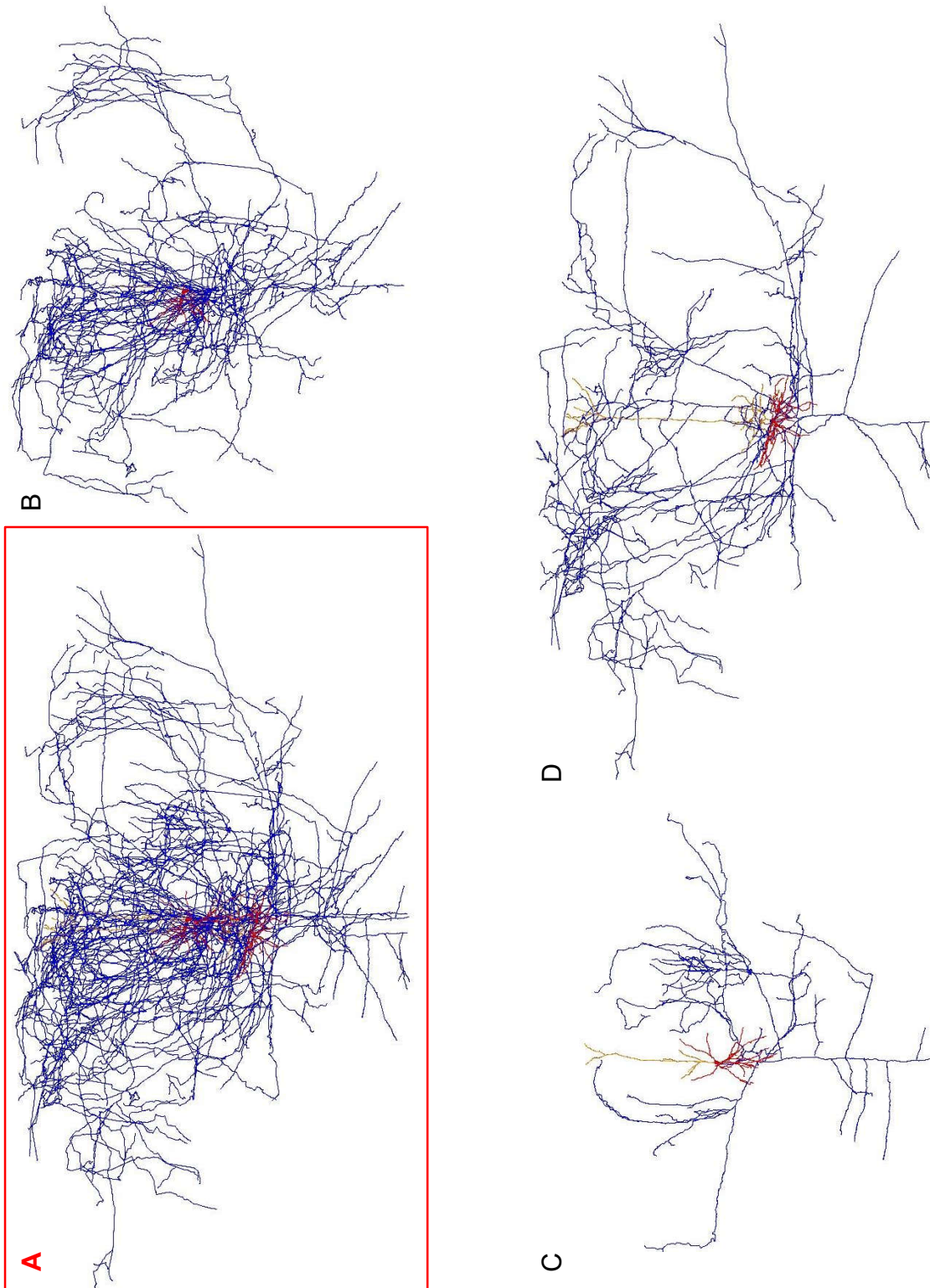


Abb. 16. Experiment: 3D Rekonstruktionen einzelner Nervenzellen. **A**, 3D Rekonstruktion des Gesamtexperiments. Farbschema: Blau = Axon, Rot = Basaldendrit, Gelb = Apikaldendrit. **B**, Schicht 4 dornige Sternpyramidenzelle. **C**, Schicht 3 Pyramidenzelle. **D**, Schicht 5 schmal-gebüschelte Pyramidenzelle.

Tab. 9. Experiment 5: Anatomische und elektrophysiologische Parameter der einzelnen Nervenzellen. L4 ss = Schicht 4 dornige Sternpyramidenzelle, L3 py = Schicht 3 Pyramidenzelle, L5 st = Schicht 5 schmal-gebüschelte Pyramidenzelle.

Nervenzelle	1	2	3	Gesamt
Aufzeichnungstiefe [μm]	875	875	1219	
Barrel	D1	D1	D1	
Spontanfrequenz [Hz], anästhesiert	0,78	X	1,68	
Alle Dendriten:				
Länge [μm]	4417	4628	10523	19568
Verzweigungen	28	29	44	
Volumen [$10^7 \mu\text{m}^3$]	2,08	5,39	14,88	
Apikaldendrit:				
Länge [μm]		1154	4502	
Verzweigungen		5	23	
Volumen [$10^7 \mu\text{m}^3$]		1,13	8,21	
Basaldendrit:				
Länge [μm]		3474	6021	
Verzweigungen		24	21	
Volumen [$10^7 \mu\text{m}^3$]		2,13	2,69	
Axon:				
Länge [mm]	125,3	26,67	88,67	240,64
Verzweigungen	353	69	228	
Volumen [$10^9 \mu\text{m}^3$]	5,14	2,88	10,3	
Gesamte Nervenzelle				
Volumen [$10^9 \mu\text{m}^3$]	5,14	2,94	10,3	10,47
Anfärbequalität	hoch	hoch	mittel	
Typ	L4 ss	L3 py	L5 st	
Intersomatische Distanz [μm]				
Zelle 1 zu		25	241	
Zelle 2 zu			216	

3.4 Bestimmung des Nervenzelltyps und Registrierung

Für jede einzelne Nervenzelle wurden Dendriten- und Axonparameter (Länge, Volumen, Dendritenbaumverzweigungen, etc.) manuell extrahiert. Mittels dieser Daten und den experimentell gemessenen Pia-Soma Distanzen wurde der einzelne Nervenzelltyp bestimmt. Als Grundlage für die hier verwendete Einteilung wurde die Klassifikation von Nervenzellen im somatosensorischen Kortex der Ratte verwendet (Oberlaender *et al.*, 2012; Narayanan *et al.*, 2015).

2 Nervenzellen wurden als Schicht 3 Zellen, 9 Nervenzellen als Schicht 4 Zellen und 6 Nervenzellen als Schicht 5 Zellen eingeordnet. Daneben fand sich das vollständige Axon einer Nervenzelle aus dem Nucleus ventralis posteriomedialis (VPM).

Registrierung: Nach manueller Klassifikation wurden alle multiplen Nervenzell-Experimente mit den Daten von Nervenzellen aus Einzelzell-Experimenten abgeglichen. Für diese Klassifikation wurden für alle Experimente die Barrel-Kolumnen sowie die Konturen von Pia und weißer Substanz für jeden Gewebeschnitt digital rekonstruiert und mit den 3D-Modellen der zugehörigen Nervenzellen in ein Standard-Barrel Modell von vS1 der Ratte eingefügt (Egger *et al.*, 2012). Abb. 17 zeigt dies anhand einer Zellmorphologie exemplarisch. Die Konturen bildeten

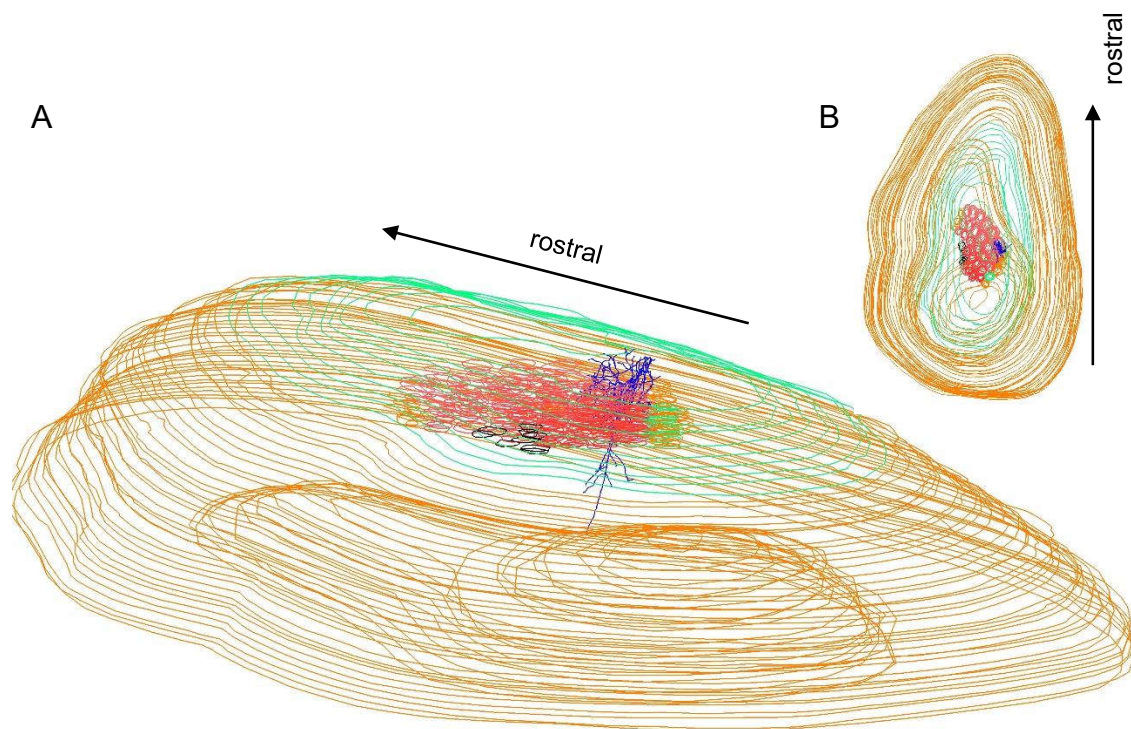


Abb. 17. Rekonstruktion von Pia, weißer Substanz und der Barrel Kolumnen zur Registrierung einzelner Zellmorphologien aus Experiment 1. A, 3D-Ansicht: Eine Nervenzelle (blau = Axon) aus Experiment 1 wurde in die Rekonstruktion eines Teils der linken Hemisphäre eingefügt. Der Barrel-Kortex (rot) ist gut sichtbar. B, Draufsicht auf das rekonstruierte Modell mit Blick auf den zentral gelegenen Barrel_kortex (rot).

den geometrischen Rahmen alle Nervenzellmorphologien mit den Zellmorphologien aus anderen Einzelzellexperimenten zu vergleichen. Dabei wurden allein Dendritenparameter und die Zelllokalisierung berücksichtigt. Abb. 18 zeigt die Ergebnisse für supragranuläre und Schicht 5 Zellen separat.

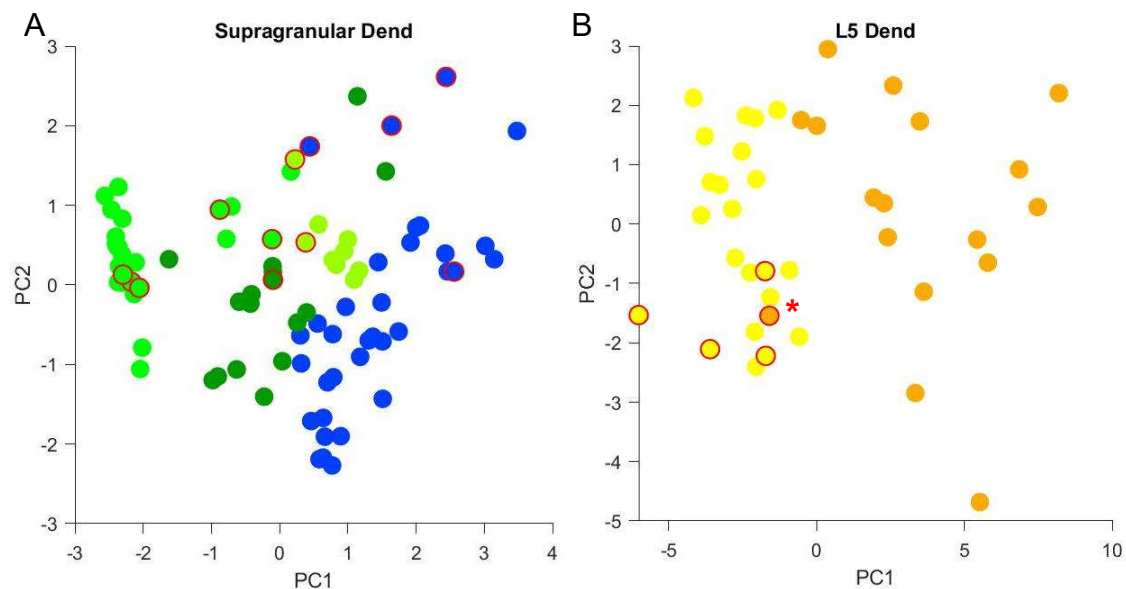


Abb. 18. Vergleich von Dendritenparametern aus Einzelzell-Experimenten und multipel angefärbten Nervenzell-Experimenten (rot umrandet): **A**, Supragranuläre Dendriten: Grün = Schicht 4 Zellen, Blau = Schicht 3 Zellen. **B**, Schicht 5 Dendriten: Gelb = Schicht 5 schmal-gebüschelte Pyramidenzelle, orange = Schicht 5 breit-gebüschelte Pyramidenzelle. *: Eine Nervenzelle, die als Schicht 5 breit-gebüschelte Pyramidenzelle klassifiziert wurde, liegt im Cluster der Schicht 5 schmal-gebüschelten Pyramidenzellen.

13 der 17 Nervenzellen (76,5%) entsprachen nach Vergleich mit den Einzelzell-Experimenten den vorher manuell klassifizierten Nervenzelltypen. 2 Schicht 4 Sternpyramidenzellen wurden als Schicht 4 dornige Sternpyramidenzellen eingeordnet, 2 Schicht 4 Sternpyramidenzellen als Schicht 4 Pyramidenzellen und eine weitere Schicht 4 Sternpyramidenzelle als Schicht 3 Pyramidenzelle. Eine Schicht 5 Nervenzelle wurde als Schicht 3 Nervenzelle klassifiziert.

Somit wurden abschließend 5 Schicht 4 dornige Sternpyramidenzellen, 2 Schicht 4 Pyramidenzellen, eine Schicht 4 Sternpyramidenzelle, 4 Schicht 3 Pyramidenzellen, 4 Schicht 5 schmal-gebüschelte Pyramidenzellen und eine Schicht 5 breit-gebüschelte Pyramidenzelle klassifiziert. 2 der als Schicht 3 klassifizierten Pyramidenzellen lagen in Schicht 4, eine in Schicht 5.

3.5 Putative synaptische Verbindungen

Alle rekonstruierten Nervenzellen lagen innerhalb eines Barrels und waren 20 – 268 μm voneinander entfernt. Bei diesen Zellen handelte es sich ausschließlich um Schicht 4 und Schicht 5 Zellen. Eine Schicht 3 Nervenzelle aus Experiment 4 lag in einem benachbarten Barrel und hatte eine mittlere Entfernung von 731 μm zu allen anderen Nervenzellen. 16 der 18 rekonstruierten Nervenzellen wurden für die Untersuchung putativer Kontakte verwendet. Nervenzelle 3 aus Experiment 3 und Nervenzelle 6 aus Experiment 4 wurden aufgrund niedriger Anfärbequalitäten nicht verwendet. In Experiment 1 wurde nur das vorhandene Axon der VPM-Zelle in die Auswertung eingeschlossen. Bei Nervenzelle 5 aus Experiment 4 wurden nur die Dendriten in die Analyse eingeschlossen, da das Gesamtaxon dieser Nervenzelle aufgrund der niedrigen Anfärbequalität nicht vollständig war. Insgesamt fanden sich so 34 Nervenzellpaare, die weiter untersucht wurden.

3.5.1 Automatische Detektion

Mittels automatischer Detektion wurden alle Bereiche, in denen sich Axone und Dendriten der einzelnen Nervenzellen nahekamen, automatisch detektiert. Es wurden so 2467 Stellen zwischen Axonen und Dendriten gefunden. Abb. 19 zeigt die Anzahl aller automatisch detektierten Stellen für 34 Zellpaare. Es wurden 0 – 380 Stellen zwischen zwei Zellen gefunden, d.h. in einigen Zellpaaren kamen sich Axon der einen Zelle und Dendrit der anderen Zelle nicht nah genug. Im Mittel fanden sich pro Zellpaar 73 Stellen, in denen sich Axon und Dendrit in einem Abstand von 4 μm nahekamen.

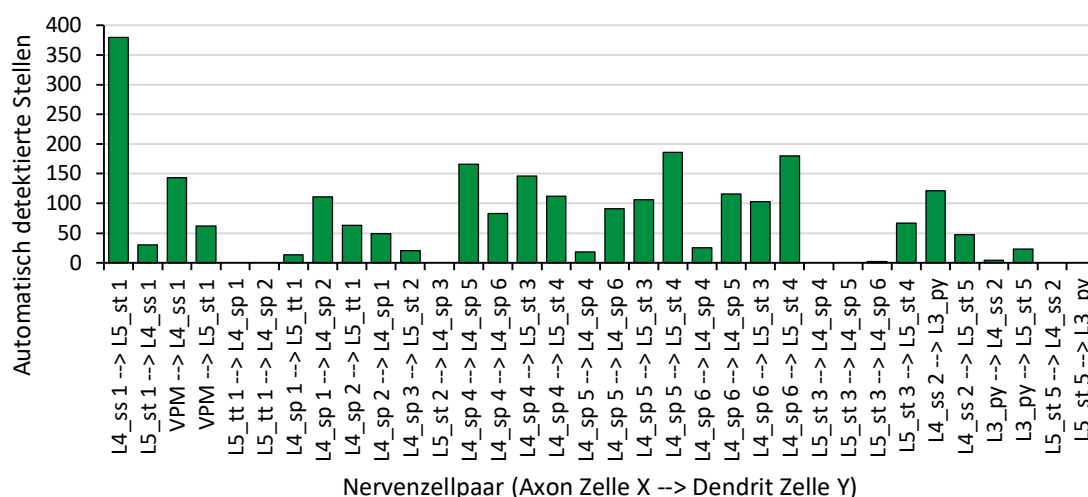


Abb. 19. Automatisch detektierte Stellen für 34 Zellpaare: Es wurden zwischen 0 – 380 Stellen zwischen einzelnen Zellpaaren detektiert.

3.5.2 Manuelle Überprüfung

Alle automatisch detektierten Stellen wurden anschließend mithilfe der konfokalen Bilddaten manuell auf putative Kontakte untersucht. Dabei wurden diejenigen Stellen als Kontaktstellen gewertet, bei denen es zu einer Überlappung von Axonen und Dendriten innerhalb eines Voxels (92 x 92 x 500 nm) kam. Abb. 20 zeigt

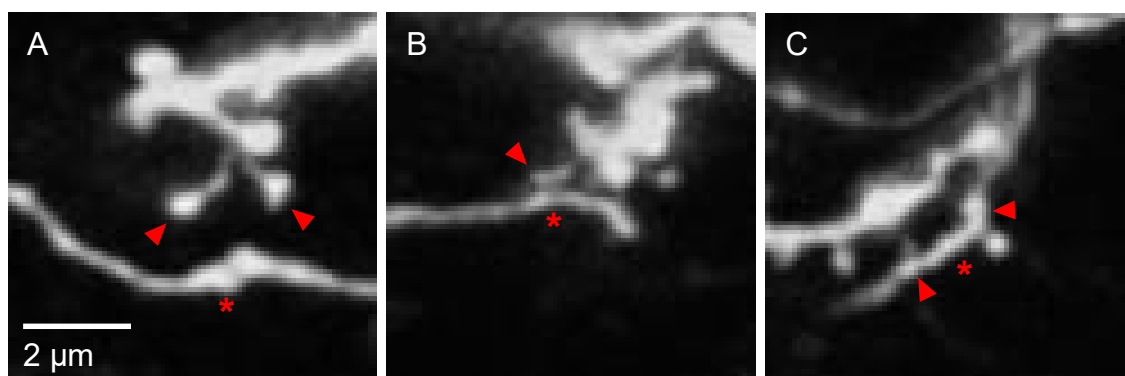


Abb. 20. Beispiele für die manuelle Überprüfung automatisch detektierter Stellen: **A**, Beispiel für eine automatisch detektierte Stelle ohne Kontakt. Die Dendritendornen (Pfeilspitzen) sind vom vorbeiziehenden Axon (*) weit entfernt. **B**, Beispiel für einen grenzwertigen Kontakt. Ein Dendritendorn (Pfeilspitze) berührt ein vorbeiziehendes Axon (*). Die Stelle wurde als Kontakt gewertet. **C**, Beispiel für einen eindeutigen Kontakt. Zwei dendritische Dornen (Pfeilspitzen) liegen auf dem vorbeiziehenden Axon (*).

automatisch detektierte Stellen, in denen es zu keiner Kontaktbildung kam, sowie eine grenzwertige und eine eindeutige Kontaktbildung. Grenzwertige Kontakte wurden in die Wertung miteingeschlossen. Diejenigen Kontaktstellen, bei denen ein präsynaptisches Bouton eindeutig an der Kontaktbildung beteiligt war, wurden gesondert gewertet, da diese Stellen das Kriterium einer putativen Synapse am ehesten erfüllten (vgl. Einleitung).

Abb. 21 zeigt die Reduktion von 2467 automatisch detektierter Stellen nach manueller Überprüfung. Insgesamt wurden so 343 putative Kontaktstellen gefunden, an 73 dieser Kontaktstellen konnten Boutons nachgewiesen werden. Für die automatisch detektierten Kontaktstellen erfolgte im Mittel eine 5-fache Reduktion nach manueller Überprüfung. Für die einzelnen Zellpaare variierte diese Reduktion zwischen 0 – 50%. Für die Kontaktstellen mit Boutons erfolgte im Mittel eine 20-fache Reduktion von allen automatisch detektierten Stellen. Der Korrelations-

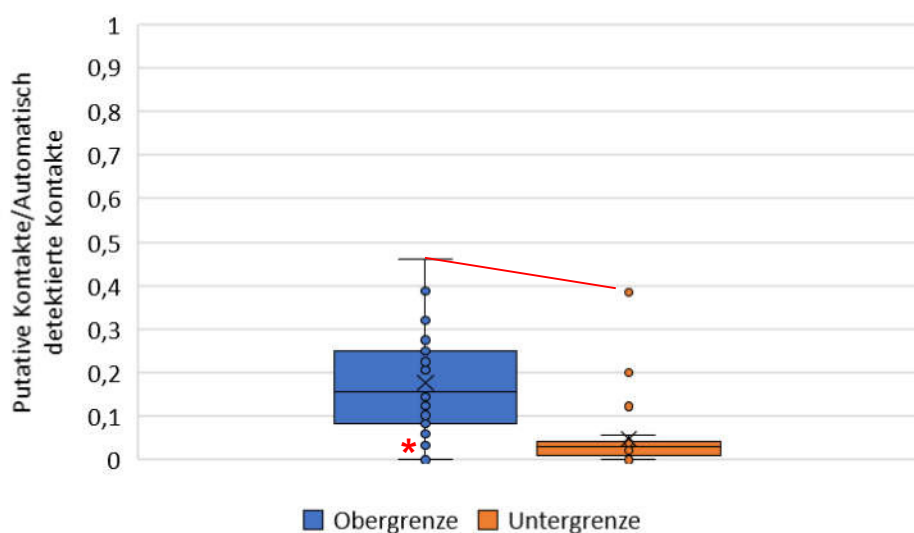


Abb. 21. Reduktion aller automatisch detektierten Kontaktstellen nach manueller Überprüfung. Blau: Reduktion der automatisch detektierten Kontaktstellen für alle manuell detektierten putativen Kontakte. In einem Zellpaar fand sich in keinem der automatisch detektierten Stellen ein putativer Kontakt (*), **Orange:** Reduktion der automatisch detektierten Kontaktstellen für alle putativen Kontakte mit zusätzlich nachgewiesenem Bouton. In einem Zellpaar (rote Linie) hatten 83% aller Kontaktstellen nachweisliche Boutons.

koeffizient von automatisch detektierten Kontakten und manuell bestätigten Kontakten lag bei 0,74. Der Korrelationskoeffizient von automatisch detektierten Stellen zu manuell bestätigten putativen Kontakten mit Bouton lag bei 0,58.

Abb. 22 zeigt für jedes einzelne Zellpaar die putativen Kontakte sowie diejenigen, bei denen ein Bouton gesehen wurde. In 8 Zellpaaren fanden sich überhaupt keine Kontakte. In 7 dieser Zellpaare wurden bereits mittels automatischer Detektion keine Stellen gefunden. Bei 6 dieser Zellpaare handelte es sich ausschließlich um Verknüpfungen von Schicht 5 zu Schicht 4 Zellen, in einem Zellpaar um eine in Schicht 4 liegende Schicht 3 Zelle auf eine Schicht 4 Zelle. 5 Zellpaare bildeten bidirektionale Verbindungen miteinander, die übrigen Zellpaare hatten nur unidirektionale Kontakte. Alle Schicht 4 Zellen bildeten Kontakte zu anderen Nervenzellen aus. Nur in 2 von 10 Zellpaaren wurden Kontakte von Schicht 5 Nervenzellen auf anderen Nervenzellen ausgebildet. Bei 4 von 5 der Zellpaare, die bidirektionale Kontakte bildeten, waren ausschließlich Schicht 4 Zellen beteiligt. Nur eine bidirektionale Verbindung fand sich zwischen einer

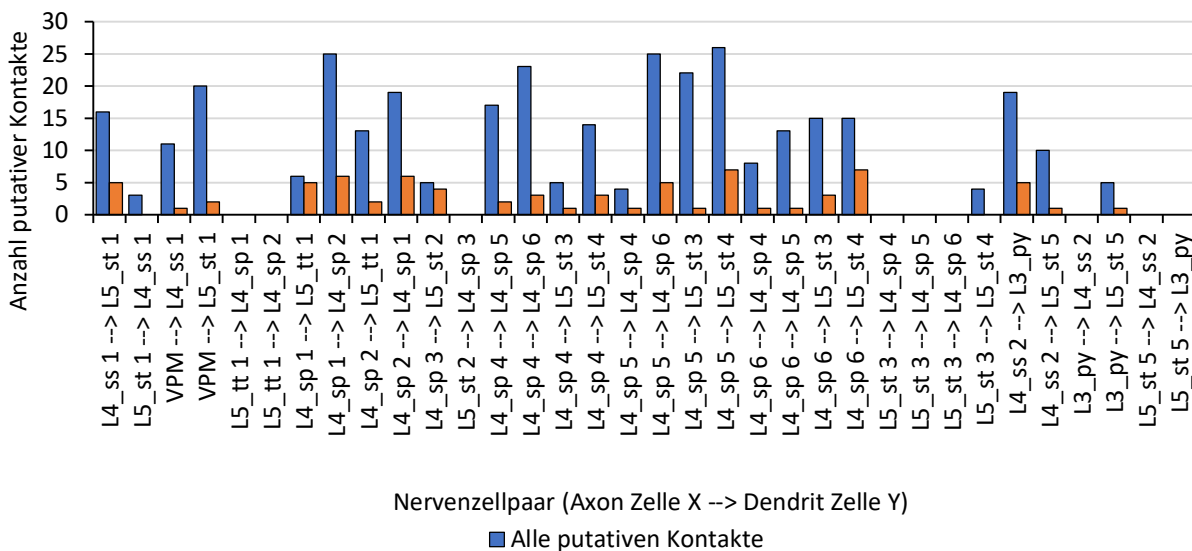


Abb. 22. Anzahl der putativen Kontakte (blau) und derjenigen mit Bouton (orange) für 34 Nervenzellpaare. L4_ss = Schicht 4 dornige Sternpyramidenzelle, L4_sp = Schicht 4 Sternpyramidenzelle, L5_st = Schicht 5 schmal-gebüschelte Pyramidenzelle, L5_tt = Schicht 5 breit-gebüschelte Sternpyramidenzelle, L3_py = Schicht 3 Pyramidenzelle, VPM = Axon einer Nervenzelle aus dem Nucleus ventralis posteromedialis (Thalamus). Die meisten Kontakte fanden sich von Axonen der Schicht 4 Zellen auf Dendriten der Schicht 5 Zellen. In 2 von 10 Nervenzellpaaren wurden putativen Synapsen von Schicht 5-Axonon auf Schicht 4-Dendriten entdeckt.

Schicht 4 und einer Schicht 5 Zelle. Zwischen Schicht 5 Zellen fanden sich keine bidirektionalen Verbindungen. Insgesamt fanden sich zwischen 3 und 26 putative Kontakte pro Zellpaar. Davon fanden sich 1 – 7 Kontakte mit nachweisbarem Bouton. In zwei Zellpaaren fanden sich keine Kontakte an Boutons. Im Mittel fanden sich 10 putative Kontakte in einem Nervenzellpaar. Von diesen hatten im Schnitt 2 nachweisbare Boutons.

Die Anzahl derjenigen Kontakte mit Bouton an allen putativen Kontakten zeigt Abb. 23. Es fanden sich deutliche Unterschiede in den Anteilen derjenigen Kontakte mit Boutons an allen gefundenen Kontaktstellen (5 – 83%).

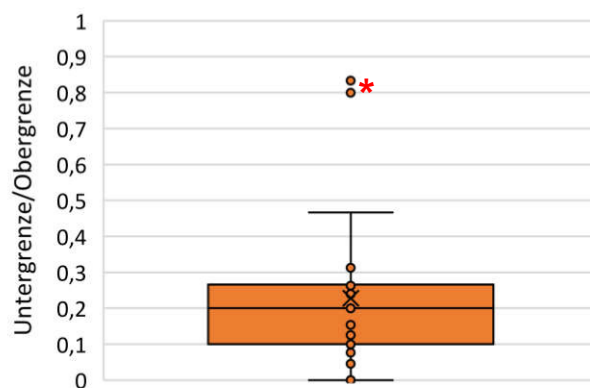


Abb. 23. Anzahl der putativen Kontakte mit Boutons an allen putativen Kontakten. Im Mittel hatten 23% aller putativen Kontakte Boutons. Dabei verteilten sich die Werte von 0 – 50%. In zwei Zellpaaren hatten knapp 80% aller putativen Kontakte Boutons (*).

Abb. 24 zeigt die Häufigkeitsverteilung für alle putative Kontaktstellen und für diejenigen mit nachgewiesenem Bouton. Es wurden 3 – 26 putative Kontakte in einer Häufigkeit von ein- bis zweimal gefunden. Für die Kontakte mit Bouton fanden sich maximal 7 Kontaktstellen mit Bouton pro Zellpaar. Am häufigsten fand sich ein putativer Kontakt mit Bouton pro Zellpaar. In einigen Zellpaaren fand sich in keinem der putativen Kontakte ein Kontakt an einem nachgewiesenen Bouton.

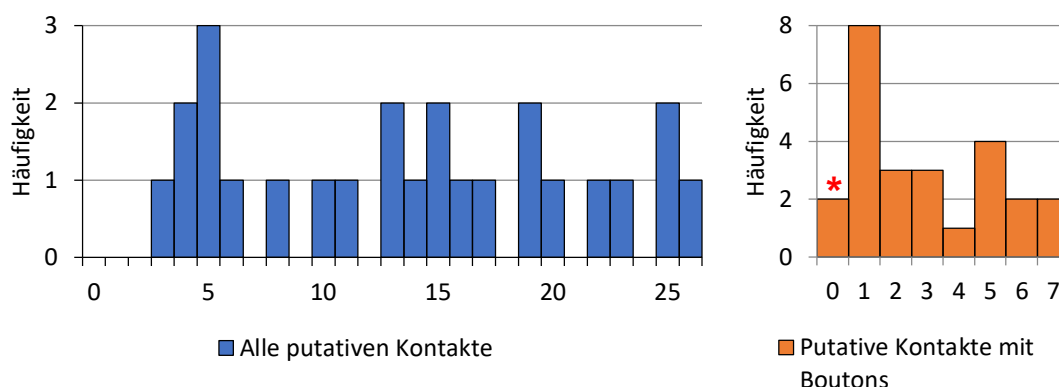


Abb. 24. Häufigkeitsverteilung aller putativen Kontakte (blau) im Vergleich zu den putativen Kontakten mit nachgewiesenem Bouton (orange). Insgesamt fanden sich zwischen 3 – 26 putative Kontakte. Die meisten Werte kamen einmal vor. An Boutons fanden sich 1 – 7 putative Kontaktstellen. Am häufigsten fand sich eine Kontaktstelle mit Bouton pro Zellpaar. In zwei Zellpaaren fanden sich putative Kontakte, von denen keines ein Bouton aufwies (*).

3.5.3 Prä- und postsynaptische Soma-Distanzen

Alle putativen Kontakte wurden auf ihre Entfernungen zum prä- und postsynaptischen Soma entlang der Axone bzw. Dendriten untersucht.

Präsynaptische-Soma Distanz: Abb. 25 zeigt die Verteilung der Werte der präsynaptischen-Soma Distanzen für alle gefundenen putativen Kontakte (blau) und derjenigen mit Bouton (orange). Dabei lagen die Kontakte zwischen 0 – 2750 μm vom präsynaptischen Soma entfernt. Es fanden sich zwei Häufigkeitsgipfel. Die meisten putativen Kontakte lagen 100 – 500 μm vom präsynaptischen Soma entfernt. Eine zweite, kleinere Anhäufung fand sich 2000 – 2750 μm vom präsynaptischen Soma entfernt. Der größte Anteil dieser Kontaktstellen fand sich an den Apikaldendriten der postsynaptischen Zellen. Die meisten Kontakte fanden sich im Mittel an der 7. axonalen Verästelung.

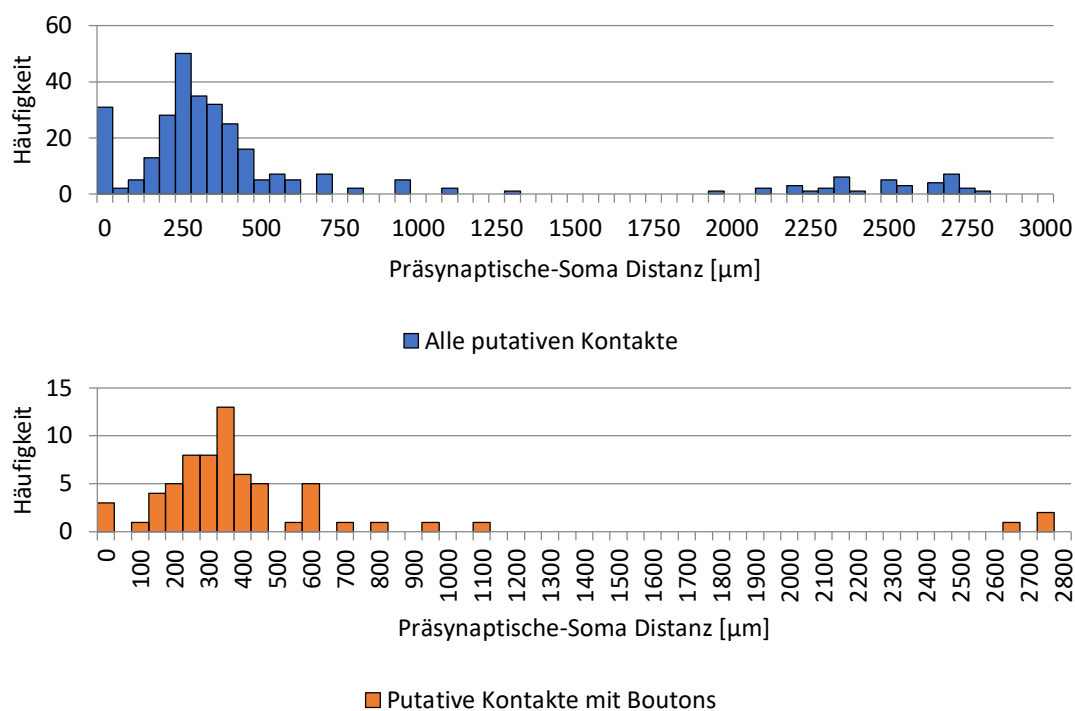


Abb. 25. Präsynaptische-Soma Distanz für alle putativen Kontakte (blau) und diejenigen mit nachgewiesenem Bouton (orange): Die meisten putativen Kontakte fanden sich 100 – 500 µm vom präsynaptischen Soma entfernt. Weiter entfernte Kontakte fanden sich überwiegend an den Apikaldendriten der postsynaptischen Zellen.

Postsynaptische-Soma Distanz: Abb. 26 zeigt die postsynaptischen-Soma Distanzen der putativen Kontakte. Die Werte verteilten sich von 0 – 880 µm in zwei Häufigkeitsgipfeln. Die meisten Kontakte lagen in einer Entfernung von 0 – 250 µm vom nachgeschalteten Soma entfernt. Ein zweiter, deutlich kleinerer Gipfel, fand sich 500 – 750 µm vom nachgeschalteten Soma entfernt. Diese Kontakte wurden ausschließlich an den Apikaldendriten der einzelnen Zellen gebildet. Für die putativen Kontakte an Boutons zeigte sich ein abweichendes Verteilungsbild. Die meisten Kontakte fanden sich in einer postsynaptischen Entfernung von 80 – 220 µm. Es fanden sich hier zwei Häufigkeitsgipfel. Eine hohe Anzahl von Kontakten fand sich 80 – 100 µm vom postsynaptischen Soma entfernt. Ein zweiter großer Anteil fand sich in einer Entfernung von 100 – 220 µm. Die putativen Kontakte fanden sich im Schnitt an der 3. dendritischen Verästelung.

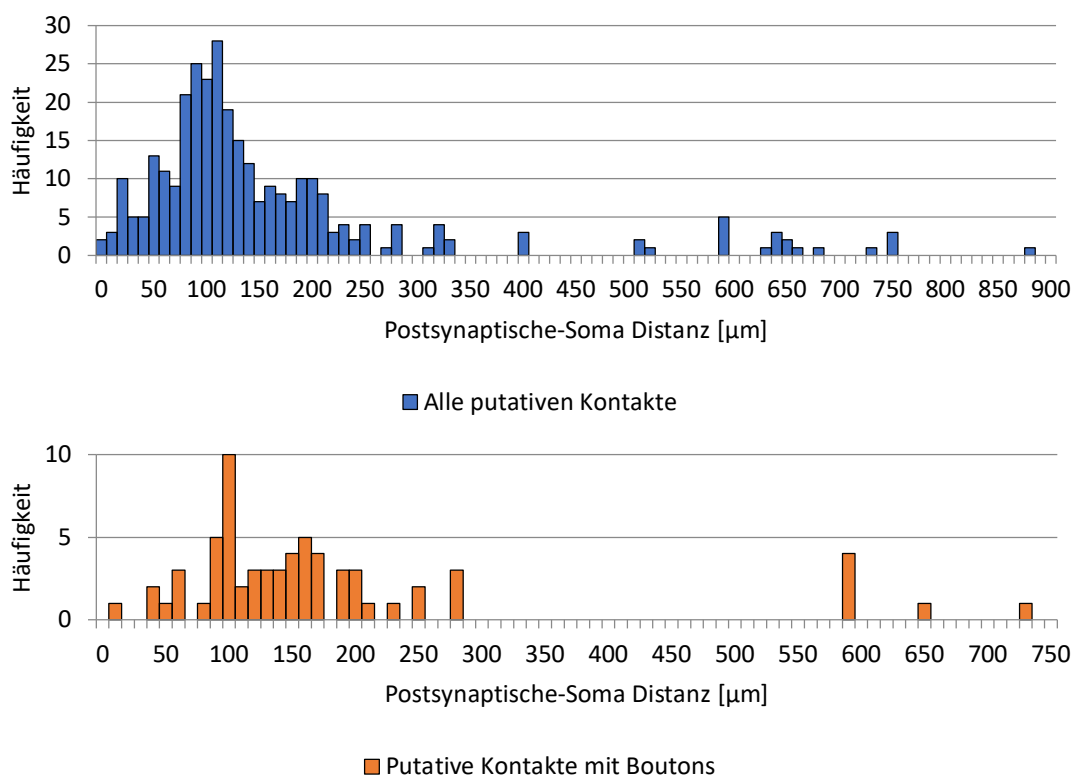


Abb. 26. Postsynaptische-Soma Distanz für alle putativen Kontakte (blau) und derjenigen mit nachgewiesenem Bouton (orange). Die meisten putativen Kontakte lagen 0 – 250 μm vom postsynaptischen Soma entfernt. Alle weiter gelegenen putativen Kontakte fanden sich ausschließlich an den Apikaldendriten.

Prä- und postsynaptische-Soma Distanzen korrelierten nur sehr gering miteinander. Für alle putativen Kontakte betrug der Korrelationskoeffizient 0,28. Für die putativen Kontakte mit Bouton betrug er 0,13.

Für die weitere Analyse wurde ausschließlich die postsynaptische-Soma Distanz weiter untersucht.

3.5.4 Synaptischer Typ

Alle putativen Kontakte wurden zusätzlich auf die beteiligte postsynaptische Zielstruktur untersucht. Die Überlappung fand am Dendritendorn, Dendritenstamm oder am Soma selbst statt. Abb. 27 zeigt die gefundenen axo-dendritischen Kontakte mit eindeutig detektiertem Bouton und Abb. 28 diejenigen ohne oder mit uneindeutig detektiertem Bouton.

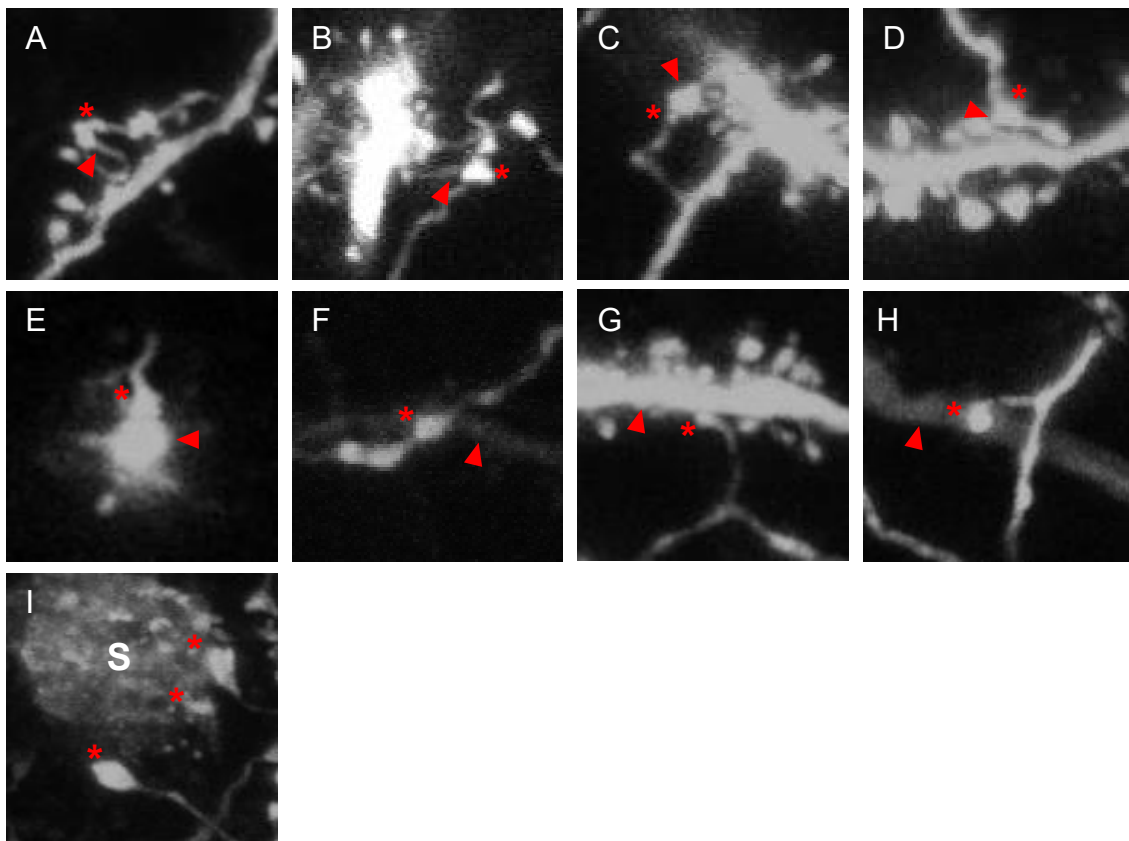


Abb. 27. Projektionsbilder axo-dendritischer Kontakte mit eindeutig detektierten axonalen Boutons: **A-D**, Überlappungen dendritischer Dornen (Pfeilspitze) mit axonalen Boutons (*). **E-H**, Überlappung des Dendritenstamms (Pfeilspitze) mit axonalen Boutons (*). Der Dendritenstamm ist in F und H nur schwach angefärbt, dendritische Dornen sind nicht zu sehen. **I**, Überlappung eines Somas (S) mit terminalen axonalen Boutons (*) einer inhibitorischen Nervenzelle.

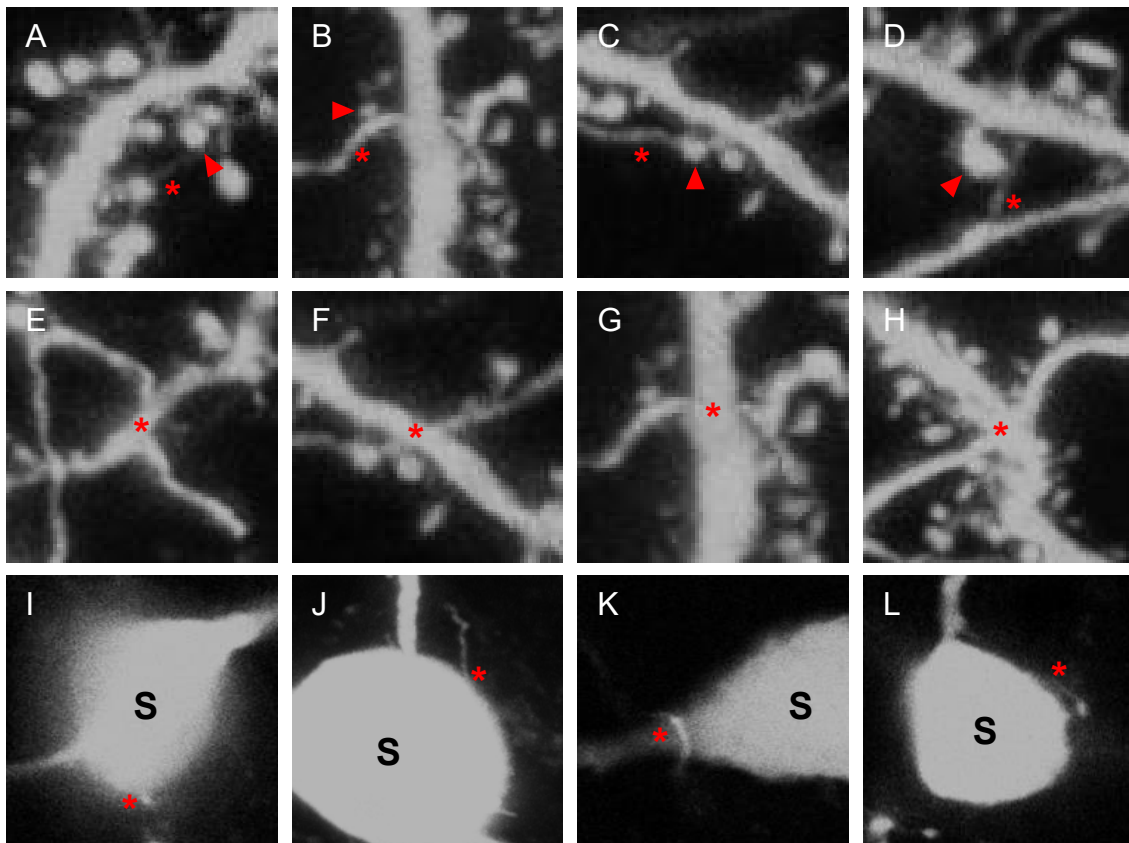


Abb. 28. Projektionsbilder axo-dendritischer Kontakte ohne/mit unklar detektierten axonalen Boutons: A-D, Überlappungen dendritischer Dornen (Pfeilspitze) mit Axonen. E-H, Überlappung des Dendritenstamms mit Axonen (*). I-L, Überlappung von Somata (S) mit Axonen (*).

Abb. 29 zeigt den Anteil des jeweiligen synaptischen Typs an allen Kontakten separat für alle putativen Kontakte und derjenigen mit Boutons. 58% der putativen Kontakte fanden sich an dendritischen Dornen, 40% an Dendritenstämmen und 2% an Zellsomata. Für die gefundenen Kontakte mit Boutons fanden sich 66% aller Kontakte an dendritischen Dornen, 33% an Dendritenstämmen und 1% an Zellsomata.

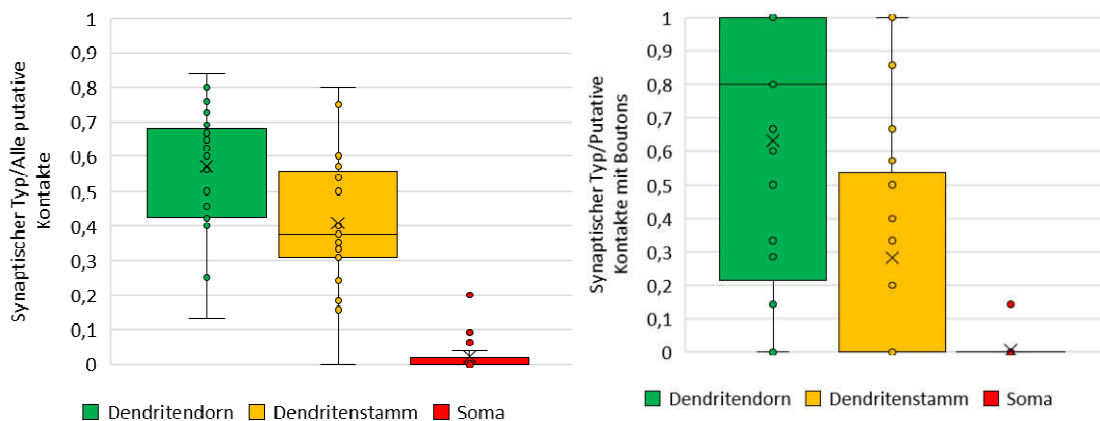


Abb. 29. Anteil der Kontakte an Dendritendornen, Dendritenstämmen und am Zellsoma für alle putativen Kontakte und derjenigen mit detektiertem Bouton. Grün = Kontakte an Dendritendornen, gelb = Kontakte an Dendritenstämmen, rot = Kontakte an Zellsomata. Die überwiegende Anzahl der Kontakte fand sich an dendritischen Dornen. Am seltensten wurden Zellsomata kontaktiert.

In allen Zellpaaren fanden sich Kontakte an Dendritendornen. Insgesamt wurden 200 Kontakte an Dendritendornen gefunden. Von diesen hatten 48 nachweisliche Boutons (24%). Es wurden maximal 19 Kontakte in einem Zellpaar gefunden. In 5 Zellpaaren (20%) fanden sich keine Kontakte an nachweisbaren Boutons. Im Mittel fanden sich pro Zellpaar 8 Kontakte an Dendritendornen von denen im Mittel 2 Boutons hatten.

In 24 von 25 Zellpaaren fanden sich 137 Kontakte an Dendritenstämmen. Von diesen hatten 24 nachweisbare Boutons (17,5 %). Für die Dendritenstammkontakte wurden in einem Zellpaar maximal 14 Kontakte gefunden. In 13 Zellpaaren (54%) wurden keine Kontakte an nachweisbaren Boutons gesehen. Im Mittel fanden sich pro Zellpaar 5 Kontakte an Dendritenstämmen von denen im Schnitt ein Kontakt ein Bouton hatte.

In 6 von 25 Zellpaaren (24%) wurde ein Kontakt an einem Zellsoma detektiert. An einem dieser Kontakte wurde ein Bouton gesehen.

Abb. 30 zeigt den Anteil der putativen Kontakte mit Boutons an allen gefundenen putativen Kontakten für Dendritendornen, Dendritenstämme und Zellsomata separat. Für Dendritendornen hatten zwischen 0 – 100 % aller gefundenen Kontaktstellen Boutons. Im Mittel hatten 27% der putativen Kontaktstellen nachweisbare Boutons. Die putativen Kontakte mit Boutons an allen putativen Kontakten

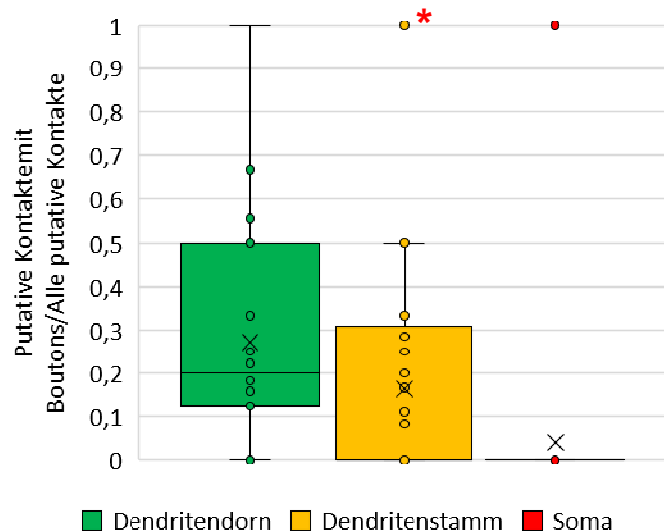


Abb. 30. Anteil der putativen Kontakte mit Boutons an allen putativen Kontakten für Dendritendornen, Dendritenstämme und Zellsomata. Dendritendornen: Der Anteil betrug im Mittel 27%. Dabei verteilten sich die Werte von 0 – 100%. **Dendritenstämme:** Der Anteil betrug im Mittel 17%. Dabei verteilten sich die Werte von 0 – 50%. In einem Zellpaar (*) wurden zwei Kontaktstellen mit einem Dendritenstamm ausgebildet; beide hatten nachweisbare Boutons.

korrelierten dabei positiv bei einem mittleren Korrelationskoeffizienten von 0,57.

Zwischen 0 – 50% aller putativen Kontakte mit nachweisbaren Boutons fanden sich an Dendritenstämmen. Im Mittel waren das 17%. Die Kontaktstellen mit Boutons an allen Kontaktstellen korrelierten positiv bei einem mittleren Korrelationskoeffizienten von 0,64.

Abb. 31 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Einzelwerte für alle putativen Kontakte und derjenigen mit Boutons. So fanden sich an Dendritendornen zwischen 1 – 19 putative Kontakte an Dendritendornen. Diese kamen am häufigsten ein- bis zweimal vor. Für die putativen Kontakte mit Boutons fanden sich maximal 6 Kontaktstellen pro Zellpaar. Am häufigsten fanden sich hier 1 und 2 Kontakte. An Dendritenstämmen fanden sich zwischen 1 – 14 Kontakte. Am häufigsten fanden sich

2 - 6 Kontakte. Für die putativen Kontakte mit Boutons fanden sich maximal 6 Kontaktstellen. Am häufigsten fand sich ein Kontakt an einem Bouton.

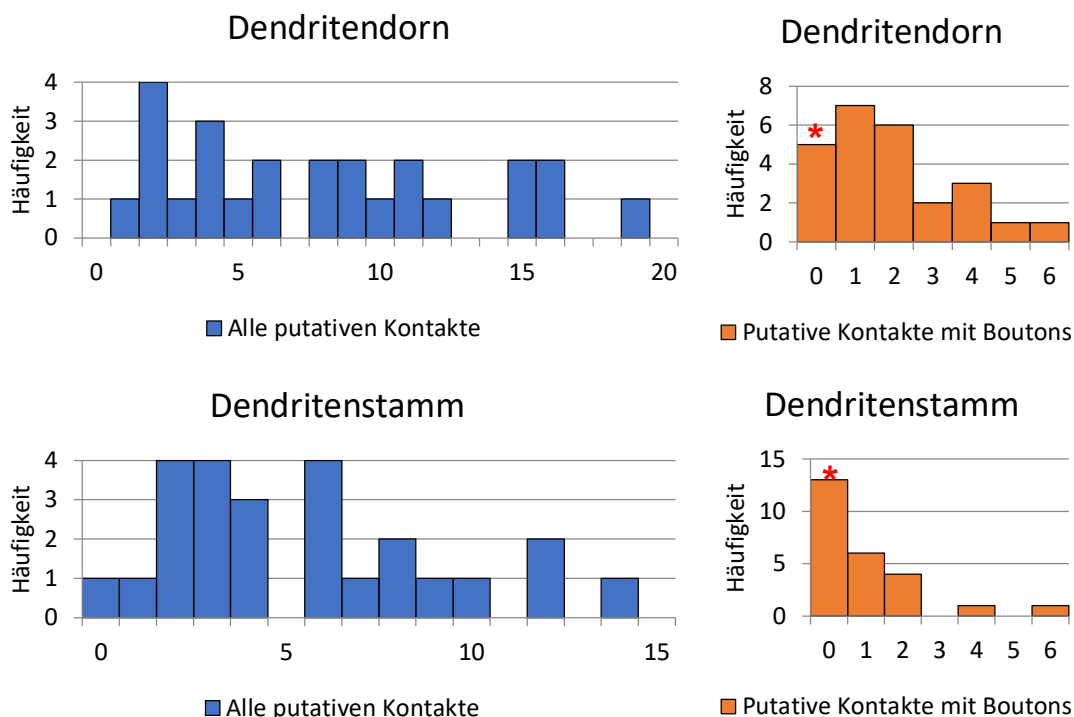


Abb. 31. Häufigkeitsverteilung aller putativen Kontakte (blau) und derjenigen mit Boutons (orange) an Dendritendornen und Dendritenstämmen. Dendritendornen: Es fanden sich 1-19 putative Kontakte. Am häufigsten fanden sich zwei Kontakte an Dendritendornen. Es fanden sich 1 – 6 Kontaktstellen mit Boutons. Am häufigsten wurden hier ein oder zwei Kontakte gefunden. Bei 4 Zellpaaren wurden keine Kontaktstellen mit einem Bouton gefunden (*). **Dendritenstämmen:** Es fanden sich 1 – 14 putative Kontakte. Am häufigsten fanden sich 2 Kontaktstellen. Es fanden sich 1 – 6 Kontaktstellen mit Boutons. Am häufigsten wurden hier ein oder zwei Kontakte gefunden. In den meisten Fällen fanden sich keine putativen Kontakte an Boutons (*).

Abb. 32 zeigt die Verteilung der postsynaptischen-Soma Distanzen an Dendritendornen und Abb. 33 an Dendritenstämmen für alle putativen Kontakte und derjenigen mit Boutons. Die Verteilung der Werte an Dendritendornen zeigt zwei Häufigkeitsgipfel. Zwischen 20 – 150 µm fanden sich die meisten putativen Kontakte zum nachgeschalteten Soma. Zwischen 150 – 250 µm fand sich ein zweiter, niedrigerer Häufigkeitsgipfel. Die Verteilung der Werte für die putativen Kontakte mit Boutons war verschieden. Es zeigten sich auch hier zwei Häufigkeitsgipfel. Ein sehr schmaler zwischen 80 – 100 µm und ein breiterer 100

– 200 μm vom postsynaptischen Soma entfernt. Im Mittel fanden sich alle putativen Kontakte an der 3. dendritischen Verästelung.

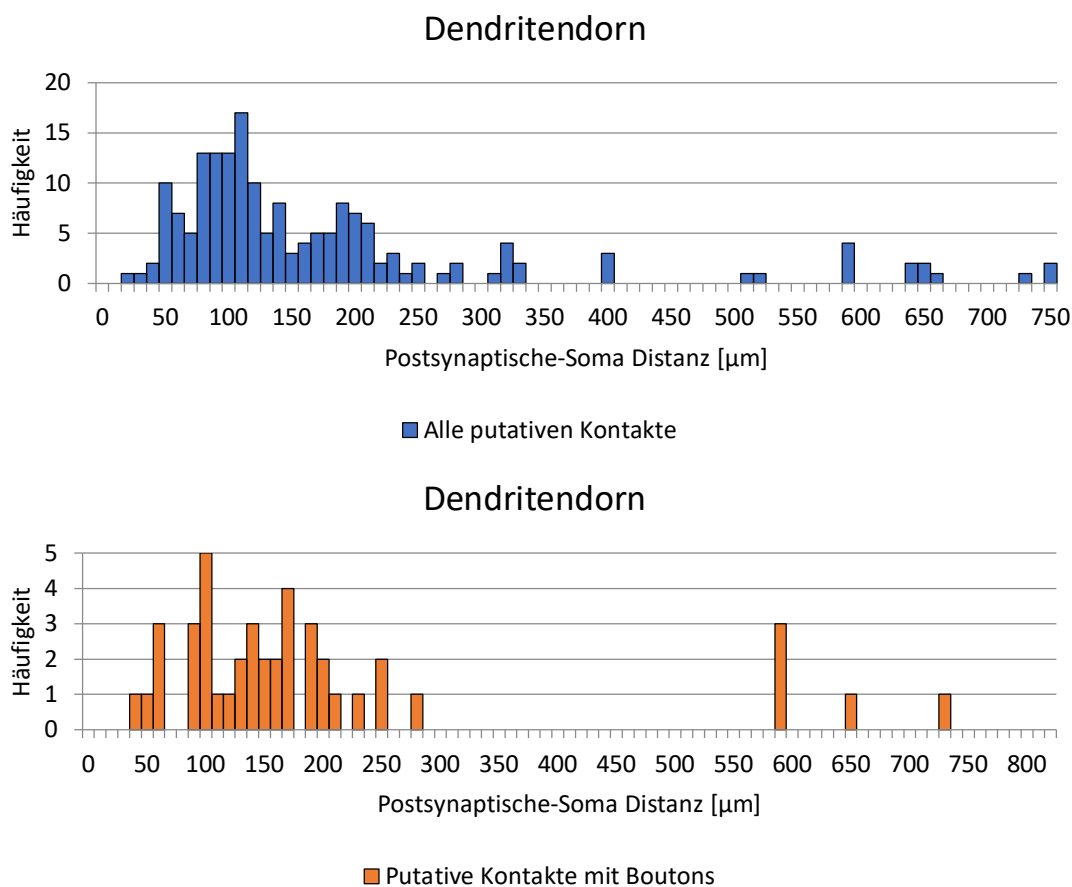


Abb. 32. Postsynaptische-Soma Distanzen für alle putativen Kontakte (blau) und derjenigen mit Boutons (orange) an Dendritendornen. Die meisten putativen Kontakte lagen in einer Entfernung von 20 – 250 μm zur nachgeschalteten Zelle. Dabei lag ein Häufigkeitsschwerpunkt 20 – 150 μm zum nachgeschalteten Soma, ein zweiter, kleinerer 150 – 250 μm entfernt.

Die Kontakte an Dendritenstämmen waren 10 – 250 μm vom postsynaptischen Soma entfernt. Dabei lag der Häufigkeitsschwerpunkt zwischen 80 – 140 μm . Die putativen Kontakte mit Boutons waren deutlich schmaler verteilt und lagen in Entfernungen von 80 – 140 μm vom postsynaptischen Soma entfernt. Ein zweiter, sehr schmaler Häufigkeitsanstieg lag 150 – 170 μm entfernt. Im Mittel fanden sich alle putativen Kontakte an der 3. dendritischen Verästelung.

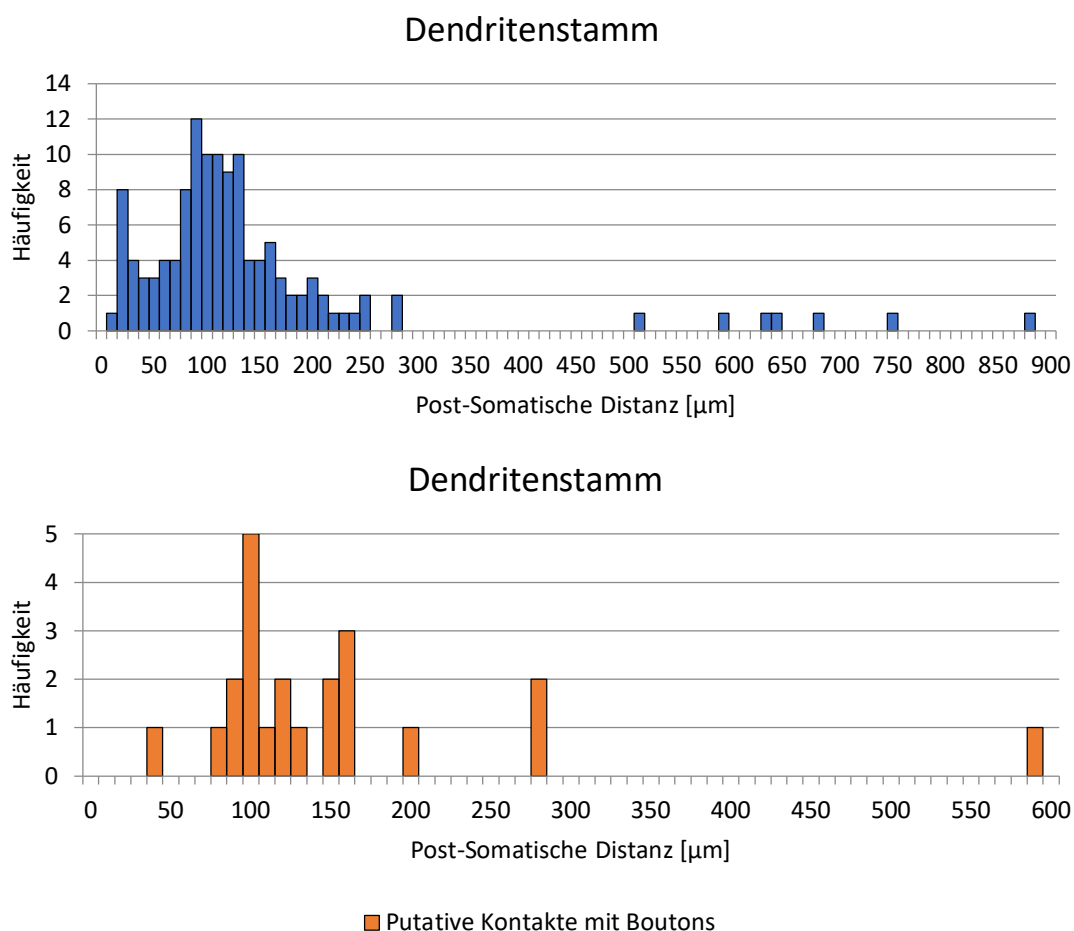


Abb. 33. Postsynaptische-Soma Distanzen für alle putativen Kontakte (blau) und diejenigen mit Boutons (orange) an Dendritenstämmen. Die meisten Kontakte an Dendritenstämmen fanden sich in einer Entfernung zwischen 80 – 140 μm zum nachgeschalteten Soma.

3.5.5 Zelltyp-spezifische Kontakte

In allen Experimenten fanden sich putative Kontakte zwischen Schicht 4 Zellen. Schicht 5 Zellen bildeten keine Kontakte an Schicht 4 Zellen. Im Folgenden wurden Schicht 4 – Schicht 4 Kontakte und Schicht 4 – Schicht 5 Kontakte getrennt untersucht.

Abb. 34 zeigt exemplarisch die Untersuchung putativer synaptischer Verbindungen zwischen einer Schicht 4 und einer Schicht 5 Nervenzelle.

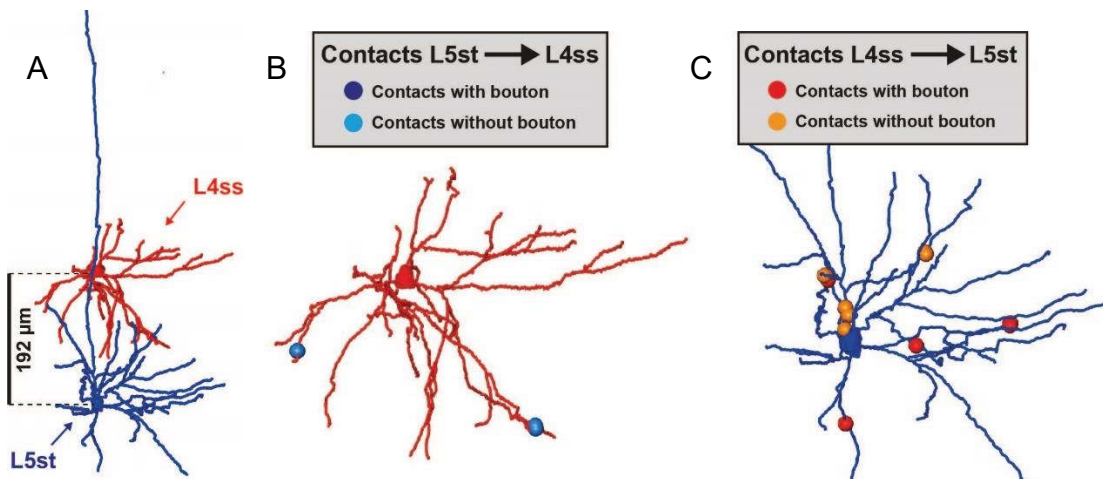


Abb. 34. Anzahl und dendritische Verteilung putativer Kontakte anhand zweier Nervenzellen. **A**, Dendriten von zwei Nervenzellen aus Experiment 1. L4 ss = Schicht 4 dornige Sternpyramidenzelle, L5 st = Schicht 5 schmal-gebüschelte Pyramidenzelle. Die Zellkerne beider Nervenzellen lagen 192 µm voneinander entfernt, Dendritenbaum der Schicht 4 Nervenzelle. In blau = putative Synapsen der Schicht 5 Nervenzelle. Dunkelblau = putative Kontakte mit Boutons, hellblau = alle putativen Kontakte. **C**, Dendritenbaum der Schicht 5 Nervenzelle. In rot/gelb = putative Synapsen der Schicht 4 Nervenzelle. Rot = putative Kontakte mit Boutons, gelb = alle putativen Kontakte.

Schicht 4 – Schicht 4 Kontakte: In 9 Zellpaaren wurden putative Kontakte zwischen Schicht 4 Zellen gefunden. Insgesamt fanden sich 153 Kontakte, von denen 30 nachweisbare Boutons hatten (20%). Im Mittel fanden sich 17 putative Kontakte zwischen zwei Schicht 4 Zellen, von denen im Mittel 3 Boutons hatten.

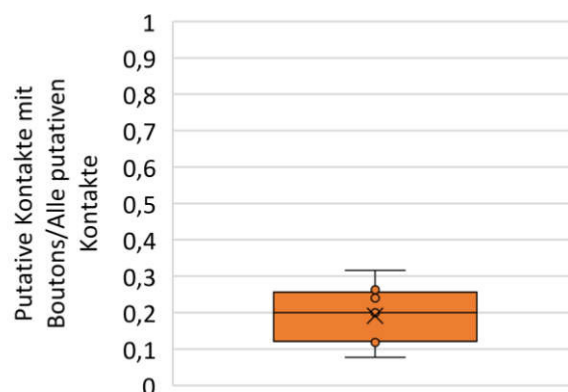


Abb. 35. Anteil putativer Kontakte mit Boutons an allen putativen Kontakten für Schicht 4 Kontakte. Der Anteil betrug im Mittel 18% und variierte zwischen 13 und 32%.

Abb. 35 zeigt den Anteil putativen Kontakte mit Boutons an allen putativen Kontakten. Zwischen 13 und 32% aller putativen Kontakte wiesen Boutons auf. Im Mittel waren es 19%. Der Anteil der putativen Kontakte mit Boutons an allen putativen Kontakten korrelierte positiv bei einem mittleren Korrelationskoeffizienten von 0,79.

Abb. 36 zeigt die Häufigkeitsverteilung der putativen Kontakte zwischen Schicht 4 Zellen. Es fanden sich 4 – 25 putative Kontakte. Die meisten dieser Werte kamen einmal vor. Es fanden sich 1 – 6 putative Kontakte mit Boutons. Am häufigsten fand sich ein Kontakt mit einem Bouton.

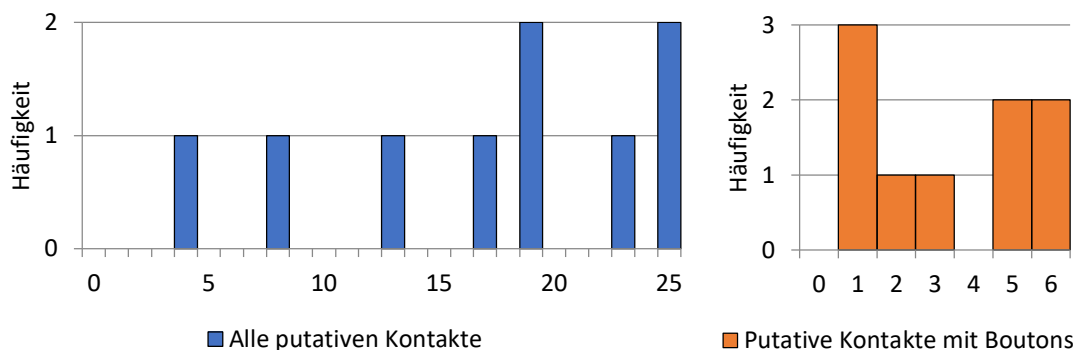


Abb. 36. Häufigkeitsverteilung aller putativen Kontakte (blau) und derjenigen mit Boutons (orange) zwischen Schicht 4 Zellen. Es fanden sich 4 – 25 putative Kontakte zwischen zwei Nervenzellen jeweils einmal. 1 – 6 Kontaktstellen hatten Boutons. Am häufigsten fand sich hier ein Kontakt.

Abb. 37 zeigt den Anteil der postsynaptischen Zielstrukturen zwischen Schicht 4 Zellen für alle putativen Kontakte und derjenigen mit Boutons. In allen Zellpaaren wurden Kontakte an Dendritendornen und Dendritenstämmen gefunden, in 2 Zellpaaren wurden Kontakte an Zellsomata gefunden. Im Mittel fanden sich 65% aller Kontaktstellen an Dendritendornen, 34% an Dendritenstämmen und zwischen 1% an Zellsomata. Bei den Kontakten mit Boutons fanden sich im Mittel 79% aller Kontakte an Dendritendornen, 22% an Dendritenstämmen und keine an Zellsomata.

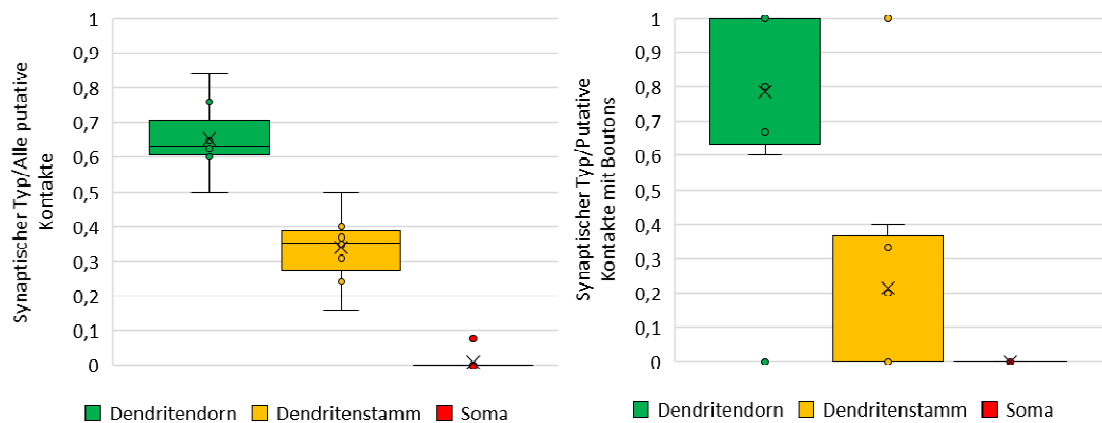
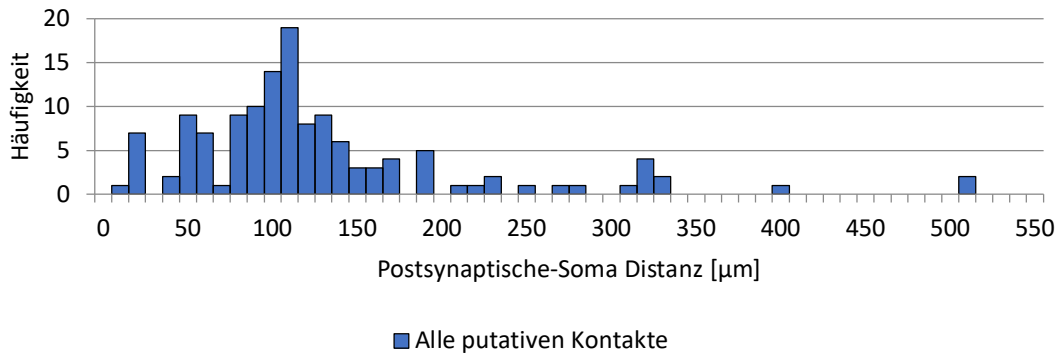


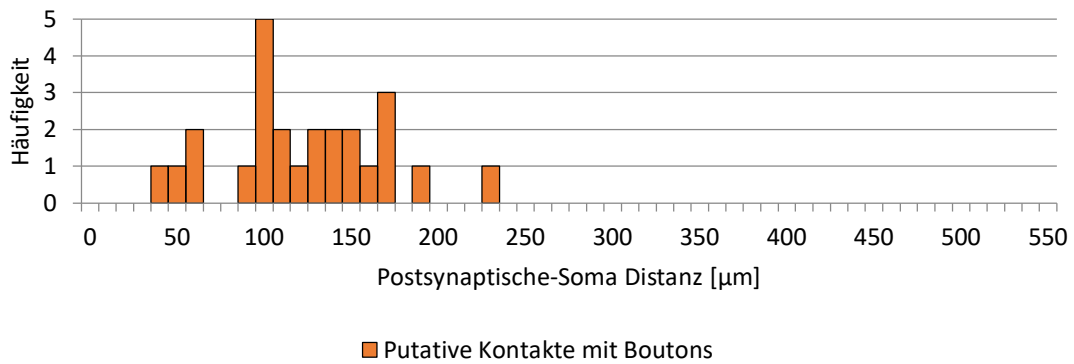
Abb. 37. Anteil der synaptischen Typen an allen putativen Kontakten bzw. denjenigen mit Boutons zwischen Schicht 4 Zellen. Grün = Kontakte an Dendritendornen, gelb = Kontakte an Dendritenstämmen, grau = Kontakte an Zellsomata. In allen Zellpaaren fanden sich Kontakte an Dendritendornen und Dendritenstämmen. In 2 Zellpaaren wurden auch Kontakte an Zellsomata gefunden. Die meisten Kontakte wurden an Dendritendornen gefunden.

Abb. 38 zeigt die Verteilung der Distanzen der einzelnen putativen Kontakte zum postsynaptischen Soma für alle putativen Kontakte und für diejenigen an Dendritendornen und Dendritenstämmen. Die putativen Kontakte lagen zwischen 10 – 520 μm vom nachgeschalteten Soma entfernt. Die meisten Kontakte waren 10 – 190 μm entfernt. Die Distanzen für Dendritendornen und Dendritenstämmen wiesen dabei eine ähnliche Verteilung auf. Im Mittel lagen die putativen Kontakte an der 2. – 3. Dendritischen Verästelung.

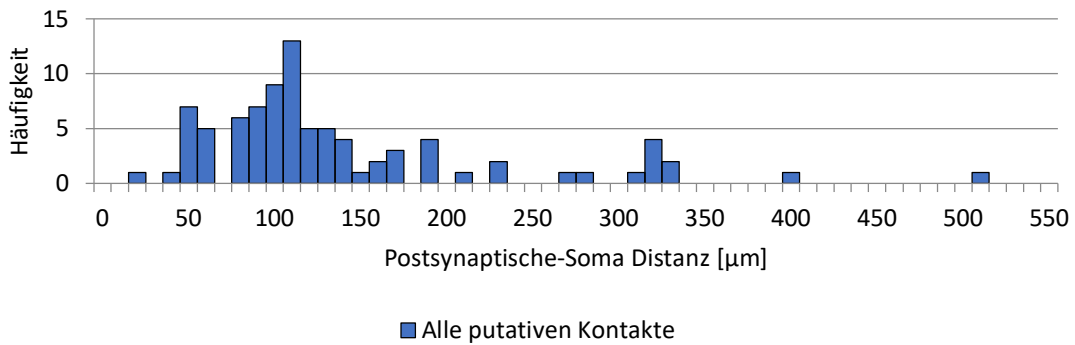
Gesamt



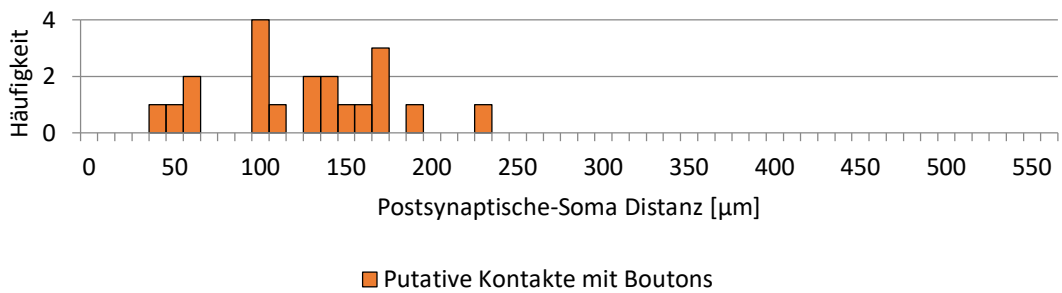
Gesamt



Dendritendorn



Dendritendorn



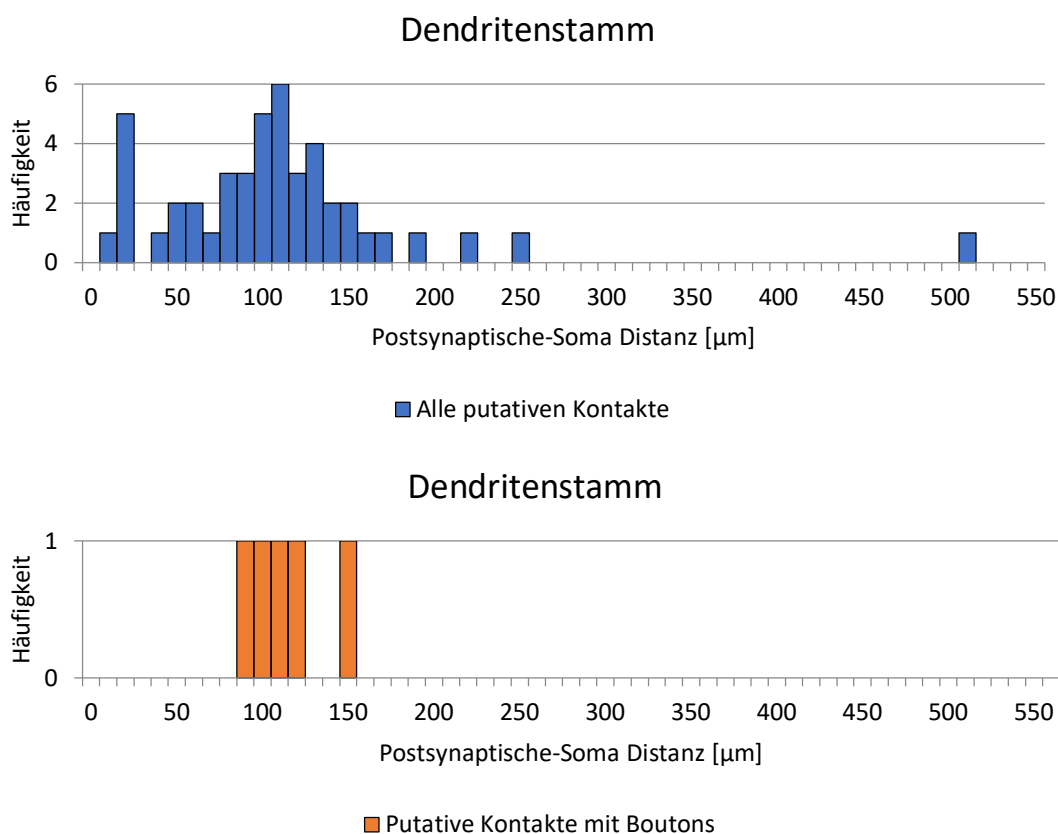


Abb. 38. Postsynaptische-Soma Distanzen für alle putativen Kontakte und derjenigen mit Boutons zwischen Schicht 4 Zellen. Blau = Alle putativen Kontakte. Die Kontakte lagen in Entfernungen von 10 bis max. 520 µm zum nachgeschalteten Soma. Die meisten Kontakte lagen 10 – 190 µm entfernt. Die Kontakte an Dendritendornen fanden sich in ähnlicher Entfernung wie die an Dendritenstämmen.

Schicht 4 – Schicht 5 Kontakte: In 12 Zellpaaren fanden sich putative Kontakte von Schicht 4 Zellen an Schicht 5 Zellen. Insgesamt fanden sich 152 Kontakte. Von diesen hatten 40 nachweisbare Boutons (26%). Im Mittel fanden sich 13 putative Kontakte pro Zellpaar von denen im Mittel 3 Boutons hatten.

Abb. 39 zeigt den Anteil der putativen Kontakte mit Boutons an allen putativen Kontakten. Er lag im Mittel bei 32%. Zwischen 5 und 83% aller putativen Kontakte hatten Boutons. Die putativen Kontakte mit Boutons an allen putativen Kontakten korrelierten positiv bei einem mittleren Korrelationskoeffizienten von 0,38.

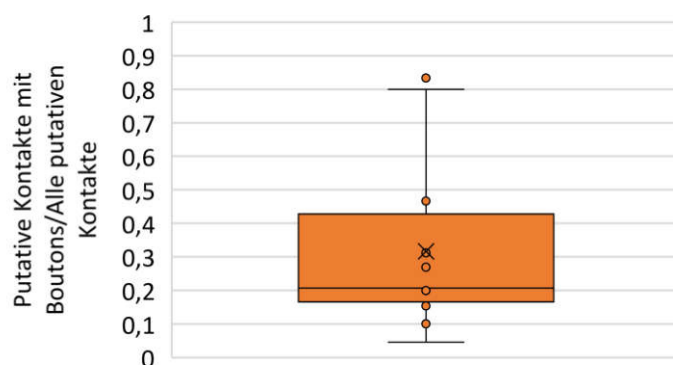


Abb. 39. Anteil der putativen Kontakte mit Boutons an allen putativen Kontakten zwischen Schicht 4 – Schicht 5 Zellen. Der Anteil betrug im Mittel 32%. Dabei verteilten sich die Werte zwischen 0 – 85%.

Abb. 40 zeigt die Verteilung der Einzelwerte für alle putativen Kontakte und derjenigen mit Boutons. So fanden sich 5 – 26 Kontakte pro Zellpaar. Am häufigsten kamen 5 Kontakte vor. An Boutons fanden sich 1 – 7 Kontakte. Diese kamen am häufigsten einmal vor.

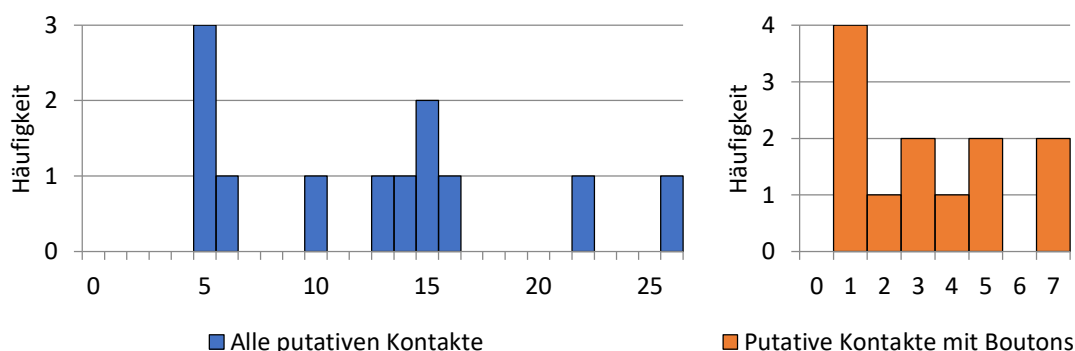


Abb. 40. Häufigkeitsverteilung aller putativen Kontakte (blau) und derjenigen mit Boutons (orange) zwischen Schicht 4 – Schicht 5 Zellen. Es fanden sich 5 – 26 putative Kontakte. Dabei zeigten sich zwei Häufigkeitsbereiche bei 5 – 6 Kontakten und 13 – 16 Kontakten. Am häufigsten fand sich ein Kontakt mit einem Bouton.

Abb. 41 zeigt den Anteil der postsynaptischen Zielstrukturen von Schicht 4 an Schicht 5 Zellen für alle putativen Kontakte und derjenigen mit Boutons. In fast allen Zellpaaren fanden sich putative Kontakte an Dendritendornen und Dendritenstämmen, in 4 Zellpaaren fanden sich Kontakte an Zellsomata. Im Mittel fanden sich 50% aller Kontakte an Dendritendornen, 47% an Dendritenstämmen und 3% an Zellsomata. Für die Kontakte mit Boutons fanden sich im Mittel 56% an Dendritendornen, 43% an Dendritenstämmen und 1% an Zellsomata.

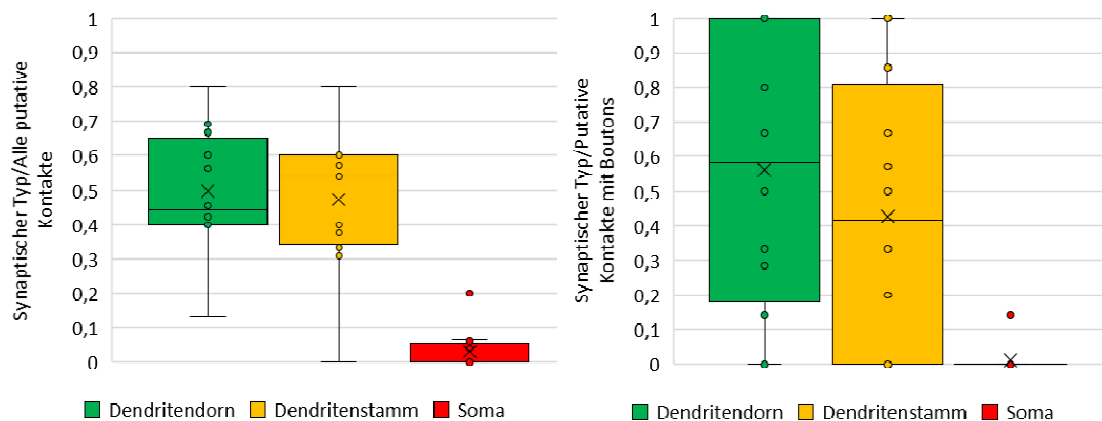
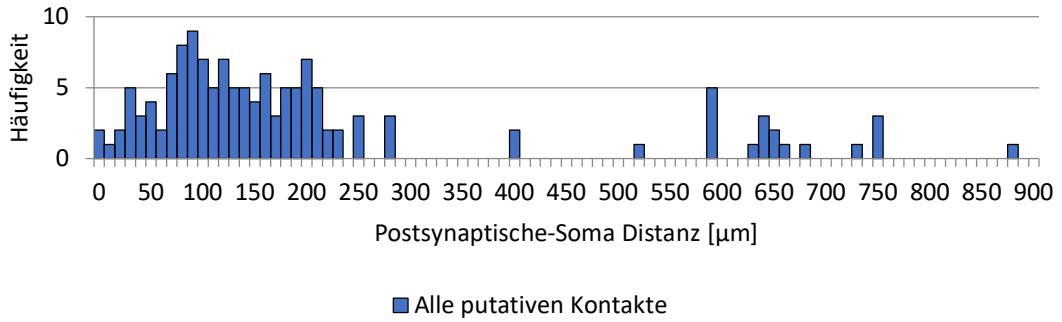


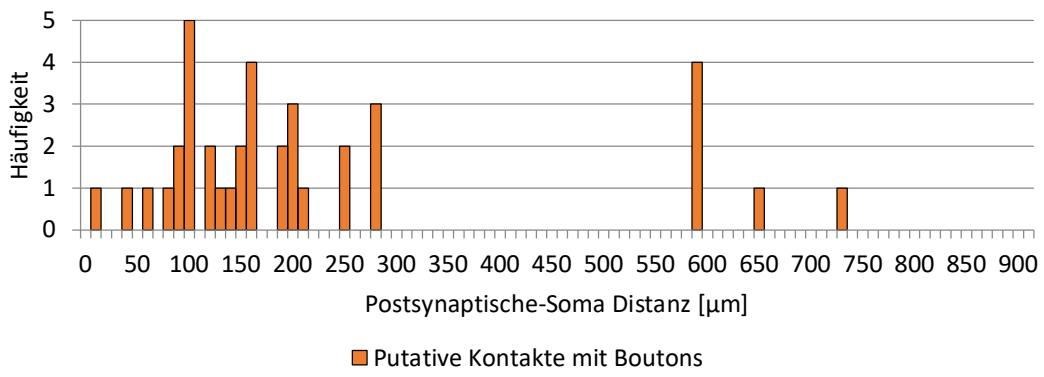
Abb. 41. Anteil der synaptischen Typen an allen putativen Kontakten bzw. denjenigen mit Boutons zwischen Schicht 4 – Schicht 5. Grün = Kontakte an Dendritendornen, gelb = Kontakte an Dendritenstämmen, grau = Kontakte an Zellsomata. In fast allen Zellpaaren fanden sich Kontakte an Dendritendornen und Dendritenstämmen, grau = Kontakte an Zellsomata. In 4 Zellpaaren wurden auch Kontakte an Zellsomata gefunden. Kontakte an Dendritendornen kamen nur gering häufiger vor als an Dendritenstämmen.

Abb. 42 zeigt die Verteilung der postsynaptischen – Soma Distanzen aller putativen Kontakte und derjenigen an Dendritendornen bzw. Dendritenstämmen. Dabei lagen die putativen Kontakte 0 – 880 μm vom postsynaptischen Soma entfernt. Es zeigten sich zwei Häufigkeitsschwerpunkte für die putativen Kontakte an Schicht 5 Zellen. Die meisten Kontakte fanden sich 0 – 240 μm entfernt. Ein zweiter, kleinerer Anteil fand sich in Entfernungen zwischen 600 – 750 μm . Für die putativen Kontakte an Dendritendornen zeigten sich zwei Häufigkeitsgipfel. Der erste lag zwischen 30 – 130 μm , der zweite 150 – 240 μm . Für die putativen Kontakte an Dendritenstämmen zeigte sich ein breiterer Häufigkeitsgipfel zwischen 50 – 220 μm . Im Mittel fanden sich die putativen Kontakte an der 3. dendritischen Verästelung.

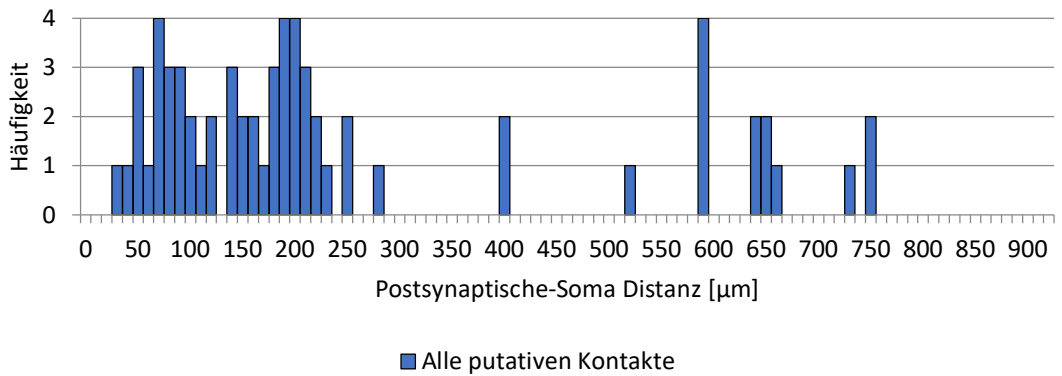
Gesamt



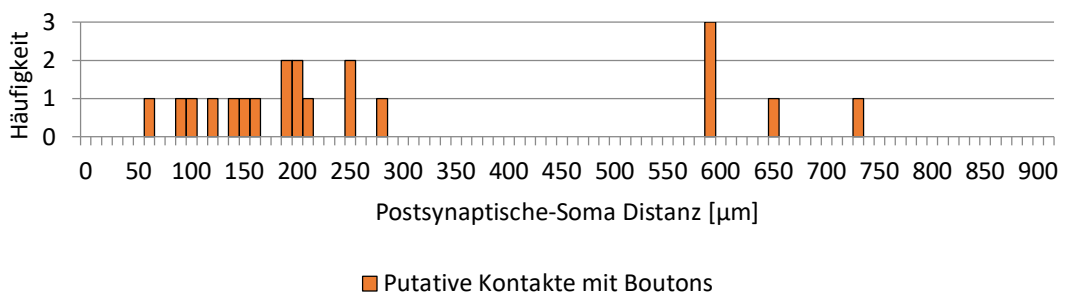
Gesamt



Dendritendornen



Dendritendornen



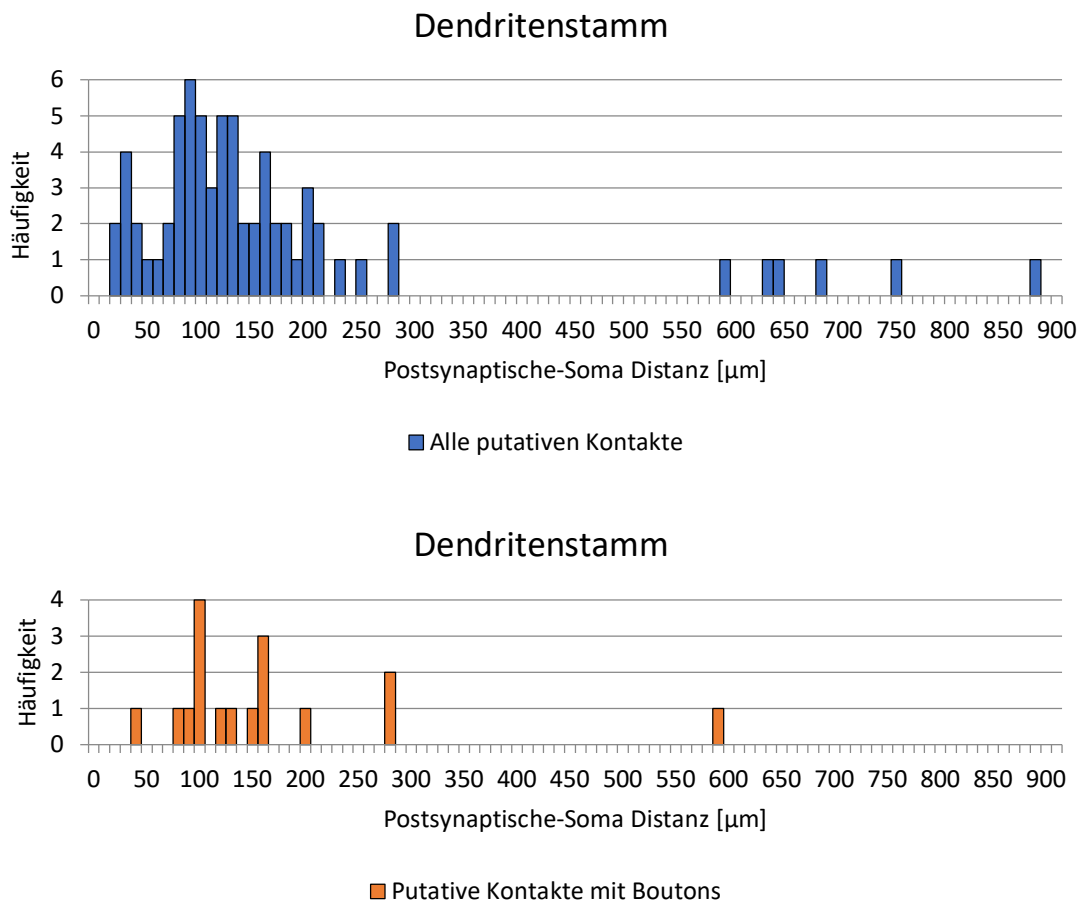


Abb. 42. Postsynaptische-Soma Distanzen für alle putativen Kontakte und derjenigen mit Boutons von Schicht 4 Zellen an Schicht 5 Zellen. Die Kontakte lagen in Entfernungen von 0 bis max. 880 µm zum nachgeschalteten Soma. Die meisten Kontakte lagen 0 – 240 µm entfernt. Für die Kontakte an Dendritendornen zeigten sich zwei deutliche Häufigkeitsgipfel (30 – 130 µm und 150 – 240 µm). Die Kontakte an Dendritenstämmen zeigten eine breitere Verteilung zwischen 50 – 220 µm.

3.5.6 Axo-axonale Kontakte

Vereinzelt fanden sich auch axo-axonale Kontakte zwischen einzelnen Nervenzellen. Diese wurden überwiegend von terminalen Boutons des Axons der ersten Zelle auf dem Axon einer zweiten Zelle gebildet. Die überzeugendsten Beispiele zeigt Abb. 43. Diese Kontaktstellen wurden nicht weiter untersucht.

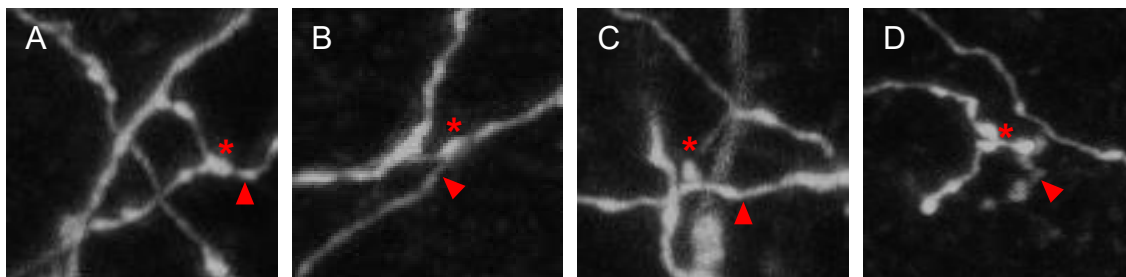


Abb. 43. Projektionsbildbeispiele axo-axonischer Kontakte: A-D, Überlappung terminaler Axone (*) des ersten Axons mit einem zweiten Axon (Pfeilspitze).

3.6 *In vitro* vs. *in vivo*

Abschließend wurden die aus den *in vivo* Experimenten gewonnenen Zellmorphologien „künstlich“ auf 300 μm breite Schnitte getrimmt, um die *in vivo* gewonnenen Daten mit *in vitro* Experimentbedingungen zu vergleichen. Dabei wurden die Grenzen der Schnitte so gelegt, dass die Zellkerne eines Paares möglichst zentral im Schnitt angeordnet waren. Durchschnittlich lagen die Zell-somata 132 μm voneinander entfernt. Die Apikaldendriten dieser Zellen, wenn vorhanden, wurden parallel zur Schnittrichtung ausgerichtet. Als nächstes wurden die Axon- und Dendritenlängen sowie die Anzahl putativer Kontakte an 5 verschiedenen Positionen dieser Zellkerne im Schnitt gemessen (50, 100, 150, 200, 250 μm). Abb. 44 zeigt exemplarisch einen 300 μm Schnitt und die 5 verschiedenen Positionen der Zellkerne. Daneben wurden die Ergebnisse dargestellt, in denen die Daten aus allen 5 Schnittpositionen zur Ursprungsmorphologie zusammengefasst wurden. Im Mittel waren in den *in vitro* Morphologien noch 34% der Axone, 92% aller Dendriten und 86% aller putativen Kontakte vorhanden.

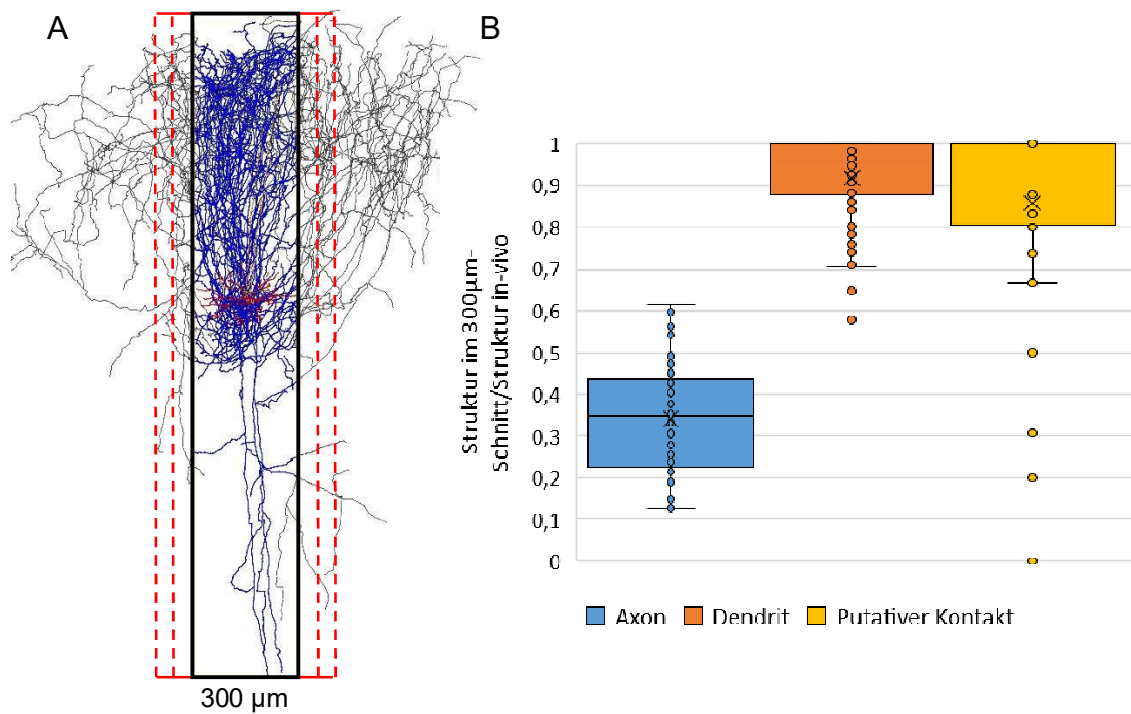


Abb. 44. *In vitro* vs. *in vivo* Zellmorphologien und putative Kontakte. **A**, Seitenansicht auf einen 300 µm Schnitt. In Grau sind die Maße des Originalaxons zu erkennen, in blau die nach dem Schneiden übrig gebliebenen Axonstrukturen. Die Zellen wurden dabei so angeordnet, dass die Zellkerne und die Dendriten/Apikaldendriten zentral im Schnitt angeordnet wurden. Daneben wurde die Lokalisation der Zellkerne jeweils um 50 bzw. 100 µm zu einer Schnittkante verschoben (rot-gestrichelte Linie als neue Schnittkanten). **B**, Vergleich der im Schnitt gemessenen Längen von Axonen (blau) und Dendriten (orange) im Vergleich zur Originalmorphologie sowie der putativen Kontakte (gelb).

4 Diskussion

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf den anatomischen Grundlagen putativer synaptischer Verbindungen zwischen einzelnen Nervenzellen in Schicht 4 und Schicht 5 des somatosensorischen Kortex der Ratte. Dabei wurden verschiedene Methoden so kombiniert, dass einzelne Nervenzellen auf putative synaptische Kontakte untersucht werden konnten.

4.1 *In vivo* Experimente

Die Erfolgsrate der *in vivo* Biocytin-Markierung lag in etwa bei 38% und entsprach damit in etwa der typischen Erfolgsrate für diese Art von Experimenten (Narayanan *et al.*, 2014). Die Erfolgsrate einer hochqualitativen Markierung von mindestens zwei Nervenzellen lag niedriger. In 20% führte diese Methode zu einer sehr guten Anfärbung von mindestens zwei Nervenzellen, also der vollständigen Axon- und Dendritenmorphologie inklusive sichtbarer subzellulärer Elemente. Dabei zeigte sich, dass die Ergebnisse stark übungsabhängig waren. So lag meine Erfolgsrate für die Anfärbung von zwei Nervenzellen in der ersten Hälfte der Experimentreihe bei nur 11%. In der zweiten Hälfte verliefen bereits bis zu 33% der Experimente erfolgreich.

Dabei spielten verschiedene Faktoren eine wichtige Rolle. Als sehr wichtig stellen sich stabile Experimentbedingungen heraus. Dazu zählte die stereotaktische Fixierung des Kopfes des Versuchstieres. Bereits minimale Schwankungen führten hier bereits dazu, dass die Füllungszustände gepatchter Nervenzellen unregelmäßig oder zu kurz wurden. Ebenso wurden die Nervenzellen z.T. von der Pipettenspitze weggestoßen und konnten anschließend nicht mehr auffindig gemacht werden. Daneben war der physiologische Zustand des Tieres sehr wichtig. Insbesondere die Respiration war hierfür ein guter Indikator. Unregelmäßige und tiefe Atemzüge deuteten häufig auf respiratorische Probleme hin. Gerade eine

gleichmäßige und lang anhaltende Anästhesie war für diese Art von Experimenten aber sehr wichtig.

Daneben spielte das Design der Patch-Pipetten eine wichtige Rolle. Besonders die Verwendung sehr kleiner Innendurchmesser der Pipettenspitze von 1 – 1,5 μm stellte sich hier als sehr erfolgreich heraus. Der Widerstand dieser Pipetten lag in etwa bei 7 $\text{M}\Omega$ und ermöglichte besonders stabile Füllungszustände. Die Nervenzellen konnten so über einen sehr langen Zeitraum elektroporiert und offengehalten werden, ohne zwischenzeitlich die Strompulse ausschalten zu müssen. Die Füllungszeiten waren so dementsprechend lang und betrugen mehrere Minuten. So konnten Axone und Dendriten ausreichend markiert werden.

4.2 3D Rekonstruktion von Nervenzellen

Der Rekonstruktionsaufwand der einzelnen Nervenzellen hing von verschiedenen Faktoren ab. Insbesondere in Bereichen der Soma-Regionen versagte die automatische Detektion von feinen Axonstrukturen häufig. Hier lagen sehr viele einzelne Strukturen in teils unterschiedlicher Signalstärke dicht beieinander. Große, signalstarke Strukturen wie Dendriten und Zellsomata überlagerten dabei häufig die viel dünneren, signalschwächeren Axone und wurden so nicht automatisch detektiert. Diese mussten dann manuell nachrekonstruiert werden (Abb. 45).

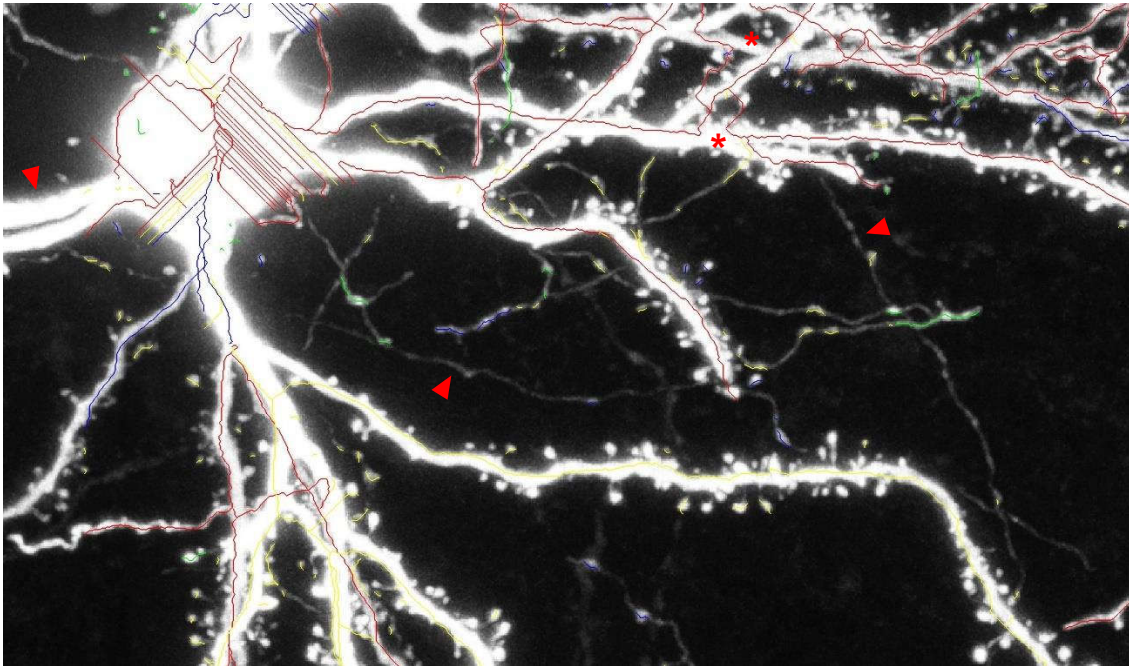


Abb. 45. Schwierigkeiten der automatischen Detektion von Axonen und Dendriten in signal-dichten Bereichen (insb. Somabereichen). Farbig: Automatisch detektierte Strukturen. Insbesondere Dendriten und Nervenzellsoma wurden detektiert. Die meisten Axone (Pfeilspitzen) wurde nur stellenweise detektiert und mussten manuell nachrekonstruiert werden. *: Falsch verknüpfte Strukturen.

Außerdem kam es immer wieder zu Fehlverknüpfungen zwischen Dendriten und überkreuzenden Axonen. Da aber die exakte Rekonstruktion genau dieser Bereiche für die anschließende Untersuchung auf putative Kontaktstellen wichtig war, mussten alle Dendritenstrukturen zusätzlich manuell überprüft und ggf. korrigiert werden.

Der Rekonstruktionsaufwand war auch stark vom jeweiligen Nervenzelltyp abhängig. Je nach Zelltyp waren z.T. erhebliche Nachscans nötig, um die vollständige Axonmorphologie in ihrer vollständigen Ausdehnung aufnehmen zu können. Das gesamte rekonstruierte Zellvolumen konnte dabei sehr groß werden und wurde ausschließlich von der Axonmorphologie bestimmt. So betrug das Gesamtvolumen eines Experiments mit 3 – 4 nah beieinander liegenden Nervenzellen im Schnitt $5,47 \text{ mm}^3$. In Experiment 5 betrug das von den Axonen eingenommene Gesamtvolumen von nur 3 untersuchten Nervenzellen sogar $10,47 \text{ mm}^3$.

Hier fand sich eine Schicht 4 Nervenzelle mit einer Gesamtaxonlänge von 125,3 mm!

Insgesamt ließen sich auf diese Weise alle Nervenzellstrukturen rekonstruieren und eindeutig einer einzelnen Nervenzelle zuordnen. Selbst nur schwach gefärbte Nervenzellen ließen sich noch gut rekonstruieren und zuordnen. So konnten bis zu 6 in einer kortikalen Kolumne lokalisierten Nervenzellen inklusive ihrer gesamten Axonmorphologie rekonstruiert werden. Ihre Zellsomata lagen dabei vereinzelt nur 20 µm voneinander entfernt.

4.3 Bestimmung des Nervenzelltyps und Registrierung

Alle rekonstruierten Nervenzellen wurden anhand ihrer dendritischen und axonalen Parameter einem bestimmten Zelltyp zugeordnet. Als Grundlage wurde die Klassifikation von Nervenzellen im somatosensorischen Kortex der Ratte verwendet (Oberlaender *et al.*, 2012; Narayanan *et al.*, 2015). So lagen 10 Nervenzellen in Schicht 4 und 6 Nervenzellen in Schicht 5. Eine Nervenzelle lag in Schicht 2 – 3. In Schicht 4 wurden dornige Sternpyramidenzellen als der vorherrschende Subtyp identifiziert. Die anderen zwei Zelltypen (Sternpyramidenzelle und Pyramidenzelle) kommen nur etwa halb so häufig vor (Narayanan, Udvary and Oberlaender, 2017). Diese Verteilung passt zu der Häufigkeit der hier vorgefundenen Zelltypen. Nach Abgleich mit den dendritischen Parametern aus den Einzelzellexperimenten wurden 50% der in Schicht 4 gepatchten Zellen (5) als dornige Sternpyramidenzellen klassifiziert, zwei als Schicht 4 Pyramidenzellen und eine als Schicht 4 Sternpyramidenzelle. Daneben fanden sich in Schicht 4 zwei Schicht 3 Pyramidenzellen.

Die meisten meiner Schicht 5 Zellen konnten als schmal-gebüschelte Pyramidenzellen klassifiziert werden. Das entspricht auch dem Vorkommen dieses Subtyps in der Grenzregion zwischen Schicht 4 und Schicht 5. Breit-gebüschelte Schicht 5 Pyramidenzellen kommen etwas tiefer gelegen vor und sind seltener (Narayanan *et al.*, 2015; Narayanan, Udvary and Oberlaender, 2017).

Alle meine gepatchten Zellen lagen in einer experimentell gemessenen Tiefe (Pia-Soma Distanz) von 813 – 1219 μm (Mittelwert 951 μm) und damit exakt im Bereich der Schicht 4 – Schicht 5 Grenzregion von vS1 im Kortex der Ratte (L4-L5: $900 \pm 50 \mu\text{m}$ (Narayanan, Udvary and Oberlaender, 2017)).

4.4 Putative synaptische Verbindungen

4.4.1 Automatische Detektion

Mittels automatischer Detektion wurden all diejenigen Bereiche zwischen dem Axon einer ersten Nervenzelle und dem Dendriten einer zweiten Nervenzelle herausgesucht, in denen sich beide Strukturen bis zu einem Maximalabstand von 4 μm nahe kamen (Smyth, 2015). Bereits hier zeigten sich deutliche Unterschiede in der Anzahl der detektierten Bereiche. So wurden zwischen 0 – 380 Kontaktstellen detektiert, im Schnitt 73 pro Zellpaar. Bei 7 Zellpaaren wurde trotz somatischer Nähe von 78 – 289 μm (194 μm) kein einziger Bereich detektiert, in denen sich Axon und Dendrit innerhalb eines Abstandes von 4 μm nahekamen. Das ist umso eindrucklicher, da alle diese Nervenzellen ausschließlich in Schicht 5 lokalisiert waren, und diese Zellen ihre Axone an den darüber liegenden Schicht 4 Zellen „vorbeischieben“. Außerdem lagen die meisten Zellkerne fast exakt übereinander und waren im gleichen Barrel lokalisiert. Bei Betrachtung der Schicht 5 Morphologien fällt auf, dass diese in Schicht 4 nur eine sehr geringe Axondichte aufweisen. Die meisten Axone ziehen dabei senkrecht in Richtung Pia und verbreitern sich erst in den oberen Schichten. Damit ist vermutlich die Wahrscheinlichkeit, dass ein Axon einer Schicht 5 Zelle einem Dendriten einer Schicht 4 Zelle nahekommt, gering.

4.4.2 Manuelle Überprüfung

Die manuelle Beurteilung der Kontaktstellen hing u.a. vom Verlauf der Nervenstrukturen in der Bildaufnahme und vom Kontakttyp ab. Da die Auflösung in der

konfokalen Mikroskopie in x-y-Richtung 92 x 92 nm betrug, in y-Richtung aber 500 nm dick war, ließen sich Strukturen, die in der x-y Ebene verliefen, meistens gut beurteilen. Besonders Kontakte von Boutons an Dendritendornen ließen sich hier gut beurteilen. Trafen beide Elemente in z-Richtung aufeinander, wurde eine Beurteilung schwieriger und die Detektion eines Boutons war meist nicht möglich. Die lineare Dekonvolution der Bilddaten führte zwar insgesamt zu einer schärferen Darstellung von Axon- und Dendritenstrukturen, erschwerte aber meistens die Einzelbeurteilung der Kontaktstellen. Besonders feine Strukturen, wie dünne Axone oder die Hälse von Dendritendornen, waren nach Dekonvolution nicht mehr sichtbar. Das war aber für die Beurteilung einer möglichen Kontaktstelle sehr wichtig. Hier wurde auf die Rohbilddaten zurückgegriffen.

Die manuelle Überprüfung der Kontaktstellen zeigte auch große Unterschiede je nach vorliegender postsynaptischer Zielstruktur. So ließen sich Axone, die dendritische Dornen kontaktierten, meist gut und sicher beurteilen. Kam es allerdings zu Überkreuzungen von Axonen an Dendriten oder zu sehr nahen, parallelen Verläufen beider Strukturen, konnten so zwar Kontaktstellen identifiziert werden, eine Detektion von Boutons an diesen Stellen war allerdings meistens nicht mehr möglich.

Die Mehrzahl aller automatisch detektierten Stellen zeigte nach manueller Überprüfung keine Überlappungen von Axon- und Dendritenstrukturen. Zwischen 0 – 50% aller automatisch detektierten Stellen stellten sich als putative Kontakte heraus. Im Schnitt kam es nach manueller Bewertung zu einer 5-fachen Reduktion dieser Stellen. Für die Kontakte mit identifizierten Boutons kam es zu einer etwa 20-fachen Reduktion. Die putativen Kontakte korrelierten positiv mit den automatisch detektierten Stellen bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,74. Für diejenigen mit detektierten Boutons lag die Korrelation niedriger (0,58). Damit kann die Anzahl der automatisch detektierter Kontaktstellen, die innerhalb eines Abstandes von 4 μm ausgewählt wurden, bereits ein Indiz für die Anzahl der anschließend manuell detektierten Kontakte sein. Strukturen, die sich sehr nahekommen, überlappen eher und erfüllen so dann das Kriterium eines putativen Kontakts. Ob die bloße Nähe zweier Prozesse aber bereits eine Kontaktbildung vorhersagbar macht, bleibt unklar.

Alle Nervenzellen aus Schicht 4 bildeten putative Kontakte an anderen Nervenzellen aus Schicht 4 und Schicht 5. Nur in 2 von 10 Zellpaaren fanden sich putative Kontakte von Schicht 5 Zellen an anderen Zellen. 5 Zellpaare bildeten bidirektionale Verbindungen zueinander aus, alle anderen Verbindungen waren unidirektional. 4 der 5 Zellpaare mit bidirektionalen Verbindungen waren ausschließlich Schicht 4 Zellen untereinander, in einem Fall war es ein Schicht 4 – Schicht 5 Zellpaar.

Es fanden sich große Unterschiede in der Anzahl und der Verteilung der putativen Kontakte für die einzelnen Zellpaare. So fanden sich zwischen 3 – 26 putativen Kontaktstellen pro Zellpaar. Im Mittel fanden sich so 10 putative Kontakte. Von diesen hatten im Schnitt 2 nachweislich auch Boutons (23%). Die putativen Kontakte mit Boutons an allen putativen Kontakten korrelierten zwar positiv miteinander. Diese war aber mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,55 eher mittelgradig. So fanden sich z.B. für ein Zellpaar bis zu 22 putative Kontakte. Davon hatten aber nur 2 nachweisbare Boutons. Andererseits fanden sich Zellpaare, in denen fast alle putativen Kontaktstellen auch Boutons trugen (80%). Besonders deutlich zeigten sich die Unterschiede zwischen detektierten putativen Kontakten und denjenigen mit Boutons in der Häufigkeitsverteilung der Kontaktstellen. So war die Verteilung der putativen Kontakte aller Zellpaare sehr breit. Es fanden sich zwischen 3 – 26 putative Kontakte in einer ähnlich vorkommenden Häufigkeit von ein- bis zweimal. Für die putativen Kontakte mit Boutons fand sich eine deutliche Abweichung in der Verteilung und Häufigkeit der Kontakte. So war die Verteilungsbreite deutlich kleiner, es fanden sich maximal 7 Kontaktstellen mit Bouton pro Zellpaar. Am häufigsten fanden sich hier 1 – 3 putativer Kontakte mit einem Bouton pro Zellpaar. Für mehr Kontaktstellen zeigt sich eine deutliche Abnahme in den Häufigkeiten.

4.4.3 Prä- und postsynaptische – Soma Distanzen

Die Untersuchung der prä- und postsomatischen Soma-Distanzen zeigte eine sehr klare Verteilung in der Lokalisation der gefundenen Kontaktstellen.

Präsynaptische-Soma Distanz: Hier zeigten sich zwei Häufigkeitsgipfel. Die meisten putativen Kontakte lagen 100 – 500 μm vom präsynaptischen Soma entfernt. Ein zweiter, deutlich kleinerer Anteil fand sich 2000 – 2750 μm vom präsynaptischen Soma entfernt. Der größte Anteil dieser Kontaktstellen fand sich an den Apikaldendriten der postsynaptischen Zellen. Insgesamt zeigten sich keine großen Unterschiede in der Verteilung der Werte für alle putativen Kontakte und derjenigen mit Boutons.

Postsynaptische-Soma Distanz: Auch hier verteilten sich die Werte in zwei Häufigkeitsgipfeln. Die meisten putativen Kontakte lagen etwa 0 – 250 μm vom postsynaptischen Soma entfernt. Ein zweiter, deutlich kleinerer Gipfel, fand sich 500 – 750 μm vom nachgeschalteten Soma entfernt. Diese Kontakte wurden ausschließlich an den Apikaldendriten der einzelnen Zellen gebildet. Insgesamt zeigte sich ein deutlicher Unterschied in den Häufigkeitsverteilungen der putativen Kontakte zu denjenigen mit detektiertem Bouton. Hier fanden sich die meisten Kontakte in einer Entfernung zwischen 800 – 220 μm und begannen so erst in einer gewissen Distanz zum nachgeschalteten Soma. Dabei fanden sich zwei Häufigkeitsgipfel. Ein Großteil der Kontakte fand sich in einem sehr engen Bereich von 80 – 100 μm zum postsynaptischen Soma. Danach folgt eine zweite, breitere Verteilung der Häufigkeiten in einer Entfernung von 100 – 220 μm zum postsynaptischen Soma.

4.4.4 Synaptischer Typ

Eine Erklärung für die großen Unterschiede zwischen den putativen Kontakten und denjenigen mit Boutons sowie den postsynaptischen-Soma Distanzen fanden sich im synaptischen Typ. Die Unterscheidung zwischen Dendritendornen und Dendritenstämmen spielte hier eine wichtige Rolle. In den Zellpaaren, in denen sich zahlreiche putative Kontakte an Dendritenstämmen fanden, ließen sich eher selten axonale Boutons finden. Interessanterweise korrelierte die Anzahl der putativen Kontakte mit denen an Boutons bei diesem Kontakttyp trotzdem besser

als bei Kontakten an Dendritendornen. So hatten zwischen 0 – 100% aller putativen Kontakte an Dendritendornen auch Boutons. Vermutlich ließen sich auch hier Boutons durch die Signalüberlagerung prominenter dendritischer Dornen nicht immer identifizieren. Betrachtet man die Verteilung aller putativen Kontakte an Dendritendornen und Dendritenstämmen separat, zeigen sich ebenfalls deutliche Unterschiede. Es fanden sich bis zu 19 putative Kontakte an Dendritendornen und bis zu 14 putative Kontakte an Dendritenstämmen pro Zellpaar. Dabei nahm die Häufigkeit zu höheren Kontaktzahlen ab und ähnelte so der Häufigkeitsverteilung der putativen Kontakte mit Boutons.

Besonders an Dendritenstämmen stellte sich die Frage, wie viele dieser Kontaktstellen auch putative Synapsen bildeten. Korrelative Studien zwischen lichtmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten zeigen, dass nur 16% aller lichtmikroskopisch detektierten Kontaktstellen an Dendritenstämmen auch tatsächliche Synapsen waren. Im Gegensatz dazu lag die Treffsicherheit bei dendritischen Dornen bei 87% (Schoonover *et al.*, 2014). Diese Untersuchung zeigt allerdings auch, dass ein bloßer Kontakt von einem Axon und einem Dendriten nichts darüber aussagt, ob an dieser Stelle auch eine „echte“ Synapse vorliegt. Prä- und postsynaptische Strukturen wie Bouton und Dendritendorn müssen ebenfalls bewertet werden und in die Gewichtung einer Kontaktstelle miteinfließen.

Insgesamt wurden in meinen Daten ca. 2/3 aller Kontaktstellen an dendritischen Dornen und ca. 1/3 an Dendritenstämmen ausgebildet. Nur sehr selten fanden sich Kontaktstellen an exzitatorischen Zellsomata. Die meisten Zellsomata wurden von vorbeiziehenden Axonen nur „berührt“. In einem Fall fand sich ein Bouton in diesem Bereich. Die einzigen Kontakte an Zellsomata mit eindeutigen axonalen Boutons fand sich von einer inhibitorischen an einer exzitatorischen Zelle.

4.4.5 Zelltyp-spezifische Kontakte

Besonders deutlich zeigten sich die Unterschiede in den gefundenen putativen Kontakten bei der Untersuchung der beteiligten Zelltypen. In allen 5 Experimenten wurde mindestens eine Schicht 4 und eine Schicht 5 Zelle gefunden. Alle Zellen aus Schicht 4 bildeten putative Kontakte an anderen Nervenzellen (Schicht 4 und Schicht 5 Zellen). Schicht 4 Zellen gelten als Hauptempfänger sensorischer Informationen aus dem Thalamus und sind aus funktioneller und anatomischer Sicht gut untersucht. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass Schicht 4 Zellen untereinander besonders stark verknüpft sind und damit vermutlich die schwachen ankommenden Signale aus dem Thalamus verstärken und in die oberen, supragranulären Schichten weiterleiten (Lund *et al.*, 1979; Stratford *et al.*, 1996; Feldmeyer *et al.*, 1999, 2002). Gleichzeitig fanden sich auch in allen Experimenten Kontakte von Schicht 4 auf Schicht 5 Zellen. Hierzu konnte ich nur Untersuchungen aus einer Studie finden, in denen eine kleine Zahl von Kontaktstellen in dieser Konstellation nachgewiesen wurde (Feldmeyer, 2005).

Nur in 2 der 10 Zellpaare fanden sich putative Kontakte von Axonen der Schicht 5 Zellen an anderen Nervenzellen. Im ersten Fall wurde eine Schicht 4 dornige Sternpyramidenzelle kontaktiert. Hier wurden nur 3 Kontakte gefunden, keiner dieser Kontakte hatte ein Bouton. Im zweiten Fall war der postsynaptische Zelltyp ebenfalls eine Schicht 5 Zelle. Das passt zur Funktion der Schicht 5 Zellen, die überwiegend in andere Hirnbereiche projizieren (DeFelipe and Fariñas, 1992). Bidirektionale Kontakte fanden sich fast ausschließlich zwischen Schicht 4 Nervenzellen (4 von 5, s.o.).

Die postsynaptischen Zielstrukturen an Schicht 4 und Schicht 5 Zellen zeigten ebenfalls Unterschiede. 63 – 78% aller gefundenen putativen Kontakte von Schicht 4 an Schicht 4 Zellen wurden an Dendritendornen ausgebildet. Bei Schicht 4 an Schicht 5 Zellen wurden nur zwischen 52 – 53% der Kontakte an Dendritendornen gefunden, der Rest der Kontakte fand sich an Dendritenstämmen. In einigen Zellpaaren war der Anteil der Kontakte an Dendritenstämmen sogar höher als an Dendritendornen. Der Anteil der Kontakte an Dendritendornen

der Schicht 4 Zellen entspricht dem Anteil aus anderen Studien an Schicht 4 Zellen, in denen 70% der Kontakte an Dendritendornen ausgebildet wurden (Feldmeyer *et al.*, 1999). Es konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass die postsynaptischen Zielstrukturen an Schicht 4 Zellen für verschiedene Afferenzen unterschiedlich sind (Ahmed *et al.*, 1994). Hier zeigte sich, dass die gleichen Afferenzen (Schicht 4 Zellen) unterschiedliche postsynaptische Zielstrukturen haben können.

Der untersuchte Datensatz war insgesamt zu klein, um abschließend sichere quantitative Aussagen über die hier vorgefundenen Ergebnisse treffen zu können. Trotz der niedrigen Zellzahlen fanden sich aber bereits deutliche Unterschiede in der Art und Verteilung der gefundenen putativen Synapsen, was mit den biologischen Daten aus anderen Studien gut vergleichbar ist. Besonders deutlich waren dabei die Unterschiede in der Häufigkeit und Art der putativen Kontakte zwischen Schicht 4 und Schicht 5 Zellen.

4.5 *In vitro* vs. *in vivo*

Eine künstliche Trimmung der Daten auf eine 300 µm – Dicke zeigte, dass nachher noch 34% der Axone, 92% aller Dendriten und 86% aller putativen Kontakte übrigblieben. Die hier betrachteten Nervenzellen waren dabei in einer kortikalen Kolumne in einem durchschnittlichen Abstand von 132 µm voneinander entfernt lokalisiert. Besonders eindrücklich fällt hier der Wegfall eines Großteils der Axonmorphologie auf. Durch die optimale Orientierung der Dendriten im Schnitt konnte meistens die gesamte Dendritenmorphologie erhalten bleiben. Der Wegfall der putativen Kontakte zeigte dabei die größte Variabilität. Je nach Zellpaar blieben 0 – 100% der Kontaktstellen erhalten. Insgesamt fielen im Schnitt 14% der detektierten Kontaktstellen weg.

Durch die Trimmung der Experimente konnte gezeigt werden, dass v.a. große Teile der Axonstrukturen im Hirnschnitt verloren gehen. In meinen Experimenten lagen die meisten Zellen innerhalb einer Kolumne und waren sehr nah beieinander lokalisiert. Bereits in diesen „optimalen“ Experimentbedingungen fielen 14%

aller Kontaktstellen weg. Dabei zeigten sich für das jeweilige Zellpaar große Unterschiede. So konnten in einigen Zellpaaren alle putativen Kontakte im Schnitt erhalten werden. In einigen Konstellationen fielen bis zu 50% weg. Damit unterliegt die Untersuchung putativer Kontakte im Schnitt einer großen Variabilität.

Für weiter entlegene Zellen müssen die Auswirkungen des Schnitts auf die putativen Kontakte noch untersucht werden.

Abschließend kann die Untersuchung von putativen Kontakte *in vivo* aber sehr nützlich sein, die Ergebnisse putativer Kontakte aus *in vitro* Experimenten besser einzuordnen und so vergleichbar zu machen. Experimente im Hirnschnitt führen nicht nur dazu, dass Axon-, Dendritenmorphologien und putative Kontakte wegfallen. Auch werden hier intakte Verbindungen zwischen Hirnbereichen, die funktionell miteinander verknüpft sind, getrennt. Dadurch sind elektrophysiologische Messungen im Hirnschnitt limitiert und können die Verhältnisse im „Lebenden“ nicht wiedergeben.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Zwischen den detektierten putativen Kontakten und denjenigen mit Boutons liegt vermutlich die „wahre“ Anzahl synaptischer Verbindungen zwischen zwei Nervenzellen. Dabei sind die putativen Kontakte mit Boutons vermutlich repräsentativer, da sie nicht allein aufgrund des „Kontaktkriteriums“ ausgewählt wurden. Das zeigte sich an der geringen Korrelation derjenigen Werte mit Boutons an allen Kontakten. Zudem unterscheiden sich die Häufigkeitsverteilungen zwischen diesen beiden Gruppen deutlich. Das zeigte auch der Vergleich zu Synapsenzahlen aus anderen Studien, in denen häufig zwischen 2 – 8 Synapsen zwischen einzelnen Zellen von Schicht 4 und 5 Zellen detektiert wurden. Nichtsdestotrotz liefert die Berücksichtigung aller putativen Kontakte die Möglichkeit, diejenigen Kontakte einzuschließen, in denen aufgrund von Signalüberlagerungen die Detektion von Boutons nicht möglich ist. Sie bildet in gewisser Hinsicht eine „Obergrenze“ der synaptischen Verbindungen zwischen zwei Zellen, die für anschließende Untersuchungen zur Verfügung steht.

Die gezählten putativen Kontakte an Boutons selbst sind in meinen Daten vermutlich unterrepräsentiert. Zum einen könnten Kontakte an sehr kleinen Boutons leicht übersehen werden, auf der anderen Seite konnten an Dendritenstämmen aufgrund von Signalüberlagerungen meistens keine Boutons detektiert werden. Zwar ist ihr Anteil im Vergleich zu den Kontakten an Dendritendornen kleiner, für die Gesamtheit synaptischer Verbindungen spielt er aber eine wichtige Rolle.

Ob und bei wie vielen der putativen Kontakte es sich um echte Synapsen handelt, bleibt letztendlich ungeklärt. Dazu müssen die putativen Kontakte mit weiteren Methoden, wie der Elektronenmikroskopie, verifiziert werden. Nur mit derartigen korrelativen Datensätzen lassen sich die gefundenen Ergebnisse weiter bewerten. Auch bleibt an dieser Stelle offen, ob andere anatomische Größen, wie der Boutondurchmesser, für die Bewertung putativer Kontakte eine Rolle spielt (Rodriguez-Moreno *et al.*, 2017). Es lässt sich vermuten, dass es hier zumindest aus funktioneller Sicht Unterschiede gibt. In wieweit sich diese Größen dann auf die Anzahl und Verteilungsmuster von Synapsen zwischen Zellen auswirken, bleibt zu klären.

Die hier vorgestellte Methode liefert einen ersten Ansatz, putative Kontakte zwischen Zellpaaren auf anatomischer Ebene zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass dabei die Kombination von Patch-Clamp Technik, modifizierter histologischer Methoden und lichtmikroskopischer Techniken die Detektion putativer synaptischer Verbindungen zwischen zwei und mehreren Nervenzellen im lebenden Gehirn qualitativ und quantitativ ermöglicht. Hierbei erlaubt die Methode i) die elektrophysiologischen Messungen und die eindeutige Markierung der untersuchten Nervenzellen mittels Biocytin *in vivo*. ii) Die vollständige morphologische Rekonstruktion und Klassifikation aller beteiligten Nervenzellstrukturen, und zwar auch, wenn diese sehr dicht beieinander lokalisiert sind. iii) Die genaue Benennung und Messung der Art, der Anzahl, der Verteilung und der prä- und postsomatischen Distanz der putativen synaptischen Stellen. iv) Die Methode liefert umfangreiche Datensätze, mit denen sich weitere Untersuchungen durchführen lassen.

Systematische und quantitative Untersuchungen zwischen bestimmten Nervenzelltypen in Hinblick auf ihre synaptischen Verschaltungen zueinander bleiben weiterhin unzureichend. Dazu bedarf es weiterer Experimente.

Neben der Verknüpfung exzitatorischer Nervenzellen untereinander können prinzipiell weitere Zelltypen, z. B. inhibitorische Nervenzellen, mittels der beschriebenen Methode auf die gleiche Art und Weise untersucht werden. In meinen Datensätzen wurden ausschließlich exzitatorische Nervenzellen berücksichtigt. Zusätzlich fanden sich in einigen Experimenten inhibitorische Zelltypen. Neben der Funktion und den morphologischen Besonderheiten dieser Zellen ist über ihre synaptische Verschaltung untereinander und zu exzitatorischen Zellen nur wenig bekannt. Mit der vorliegenden Methode lassen sich systematische Untersuchungen zwischen diesen beiden Zelltypen auf Einzelzellebene durchführen (Abb. 46).

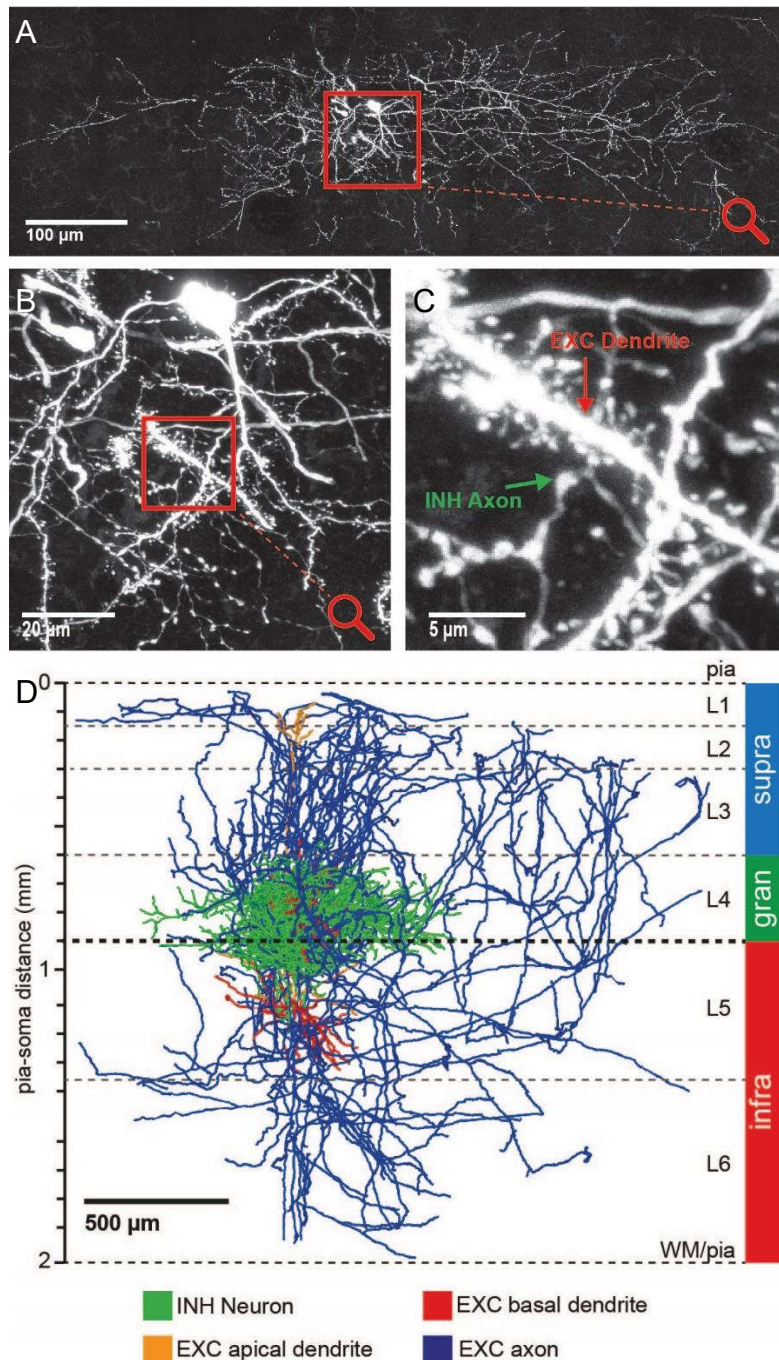


Abb. 46. Vollständig rekonstruierte inhibitorische Nervenzelle (grün) in Schicht 4 des somatosensorischen Kortex der Ratte. Dazwischen 3 vollständig rekonstruierte exzitatorischen Nervenzellen aus Schicht 4 und 5. A-C, Projektionsabbildung der Soma-Ebene. Besonders auffällig ist die lokale Dichte der inhibitorischen Axone. B, C, Vergrößerung der gleichen Ebene. Ein exzitatorischer Dendritenast mit seinen zahlreichen angelagerten Dornen verläuft zwischen den inhibitorischen Axonen, erkennbar an ihren perlschnurrartig angeordneten und dicht aufgereihten Boutons. D, Vollständige Rekonstruktion der inhibitorischen Nervenzelle (grün) und mehrerer exzitatorischer Nervenzellen (blau = Axon, rot = Dendrit) in Schicht 4 und 5.

Neben axo-dendritischen Synapsen zwischen zwei Nervenzellen lassen sich ebenfalls axo-axonische Kontakte und Autapsen einzelner Nervenzellen untersuchen und miteinander vergleichen. Beide Sorten von Kontakten konnten in meinen Datensätzen gefunden werden.

Daneben ermöglicht die vorliegende Methode Einblicke in die Morphologie subzellulärer Elemente. Neben der Einteilung der putativen Synapsen nach ihrer postsynaptischen Zielstruktur (Dendritendorn, Dendritenstamm, Soma), lassen sich auch die präsynaptischen Elemente näher untersuchen (En-passant und Terminal-Boutons).

Die untersuchten Nervenzellen lagen vorwiegend in Schicht 4 und 5 des somatosensorischen Kortex der Ratte. Obwohl das Datenset klein war (insgesamt 16 Nervenzellen) konnten bereits biologische Unterschiede in der Häufigkeit und Art der Synapsen für Schicht 4 und 5 Zellen gesehen werden.

Es bleibt zu klären, bei wie vielen der detektierten Kontaktstellen es sich tatsächlich um Synapsen handelt. Hierfür ist die Untersuchung der subzellulären Elemente nötig. Dazu können die detektierten Stellen mittels elektronenmikroskopischer Verfahren näher untersucht werden. Korrelative Studien zwischen lichtmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Daten haben bereits gezeigt, dass die Detektion falsch positiver Synapsen in der Lichtmikroskopie typischerweise bei unter 10-15% liegt (Schoonover, Tapia et al 2014). Damit lassen sich mittels der vorliegenden Methode die wirkliche Anzahl synaptischer Verbindungen zwischen zwei Nervenzellen eingrenzen.

Der Arbeitsaufwand für die Untersuchung von synaptischen Verbindungen zwischen einzelnen Nervenzellen bleibt trotz zahlreicher automatischer Methoden arbeitsintensiv. Dabei stellt die Rekonstruktion der einzelnen Nervenzellen weiterhin den größten Aufwand dar. Dies gilt insbesondere für Nervenzellen, die sehr dicht beieinander liegen und deren nervale Strukturen eng nebeneinander verlaufen. Um eine klare Abgrenzung zwischen zwei einzelnen Nervenzellen zu finden, wäre eine Markierung der Nervenzellen mit unterschiedlichen Farbstoffen hilfreich. Das würde sowohl die Rekonstruktion als auch die Detektion putativer

Kontakte, v.a. im Bereich der Dendritenstämme, erleichtern. Ansätze hierzu finden sich bereits in der Literatur (Schoonover *et al.*, 2014).

Meine Methode ermöglicht die hochauflösende Untersuchung von Kontaktstellen zwischen einzelnen, vollständig rekonstruierten und klassifizierten Nervenzellen und bietet sich damit für Konnektivitätsüberprüfungen zwischen bestimmten Nervenzelltypen auf Einzelzellebene an. Sie generiert umfangreiche Datensätze, die sich mit weiteren Methoden kombinieren lassen und liefert so tiefere Einblicke in die subzellulären Vorgänge zwischen einzelnen Nervenzellen.

5 Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit habe ich putative synaptische Verbindungen zwischen einzelnen Nervenzellen im Gehirn der Ratte untersucht. Für diese *in vivo* Untersuchungen wurden verschiedene Techniken verwendet und neu miteinander kombiniert. Dazu gehörten neben der *in vivo* Patch-Clamp-Methode ein weiterentwickeltes histologisches Protokoll. Die Verwendung konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie erlaubte die hoch-auflösende Darstellung aller nervalen Strukturen. Die Kombination dieser Verfahren ermöglichte so zunächst die vollständige dreidimensionale Rekonstruktion von 2 – 6 nah beieinander liegenden Nervenzellen. Aus diesen Rekonstruktionen ließen sich zahlreiche anatomische Parameter extrahieren. So z.B. die Dendriten- und Axonlänge, die Somaposition, intersomatische Distanzen, etc. Des Weiteren wurde die elektrophysiologische Aktivität dieser Zellen gemessen. Mittels dieser Parameter ließen sich die einzelnen Nervenzellen dann einem bestimmten Zelltyp im somatosensorischen Kortex (Barrel-Kortex) der Ratte zuordnen.

In einem nächsten Schritt wurden die Zellpaare auf mögliche Kontaktstellen untersucht. Dabei zeigten sich große Unterschiede in der Anzahl und Verteilung der putativen Kontakte zwischen bestimmten Nervenzellpaaren. So fanden sich zwischen Schicht 4 Zellen und von Schicht 4- auf Schicht 5 Zellen zahlreiche Kontakte. Schicht 5 Zellen hingegen bildeten kaum Kontakte untereinander oder zu Schicht 4 Zellen aus. Des Weiteren fanden sich zwischen den meisten Schicht 4 Nervenzellpaaren bidirektionale Verbindungen. Die Kontaktstellen selbst wurden in zwei Gruppen eingeteilt. In der ersten Gruppe wurden alle putativen Kontaktstellen zwischen zwei Nervenzellen berücksichtigt. Das waren alle Bereiche, in denen sich das Axon einer ersten Zelle mit dem Dendriten einer zweiten Zelle innerhalb einer 500 nm-dicken Schichtaufnahme überlagerten. In der zweiten Gruppe wurden ausschließlich diejenigen Kontakte berücksichtigt, in denen ein präsynaptisches Bouton in der mikroskopischen Aufnahme eindeutig identifiziert werden konnte. Diese Kontaktstellen erfüllten am ehesten das Kriterium einer

„putativen Synapse“ im Lichtmikroskop. Im Mittel fanden sich 10 putative Kontakte pro Zellpaar. Von diesen hatten im Schnitt 2 nachweisbare Boutons. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Daten aus anderen, überwiegend *in vitro* durchgeführten Studien. Des Weiteren wurden die postsynaptischen Zielstrukturen näher untersucht. Es zeigten sich häufig dann große Unterschiede zwischen den beiden Kontaktgruppen, wenn es zu besonders vielen Kontakten an Dendri-tenstämmen kam. Hier war die Detektion von präsynaptischer Boutons aufgrund der Signalüberlagerungen beider Strukturen meistens nicht eindeutig möglich (häufig gesehen bei Schicht 4 - Schicht 5 Kontakten). An Zellsomata selbst fanden sich kaum bis keine Kontaktstellen, was für exzitatorische Nervenzellen typisch ist.

Die vorliegende Methodik erlaubt die präzise anatomisch-morphologische Untersuchung von putativen synaptischen Verbindungen zwischen einzelnen Nervenzellen *in vivo*. Dabei erlaubt die Patch-Clamp Methode zusätzlich die elektrophysiologische Messung von einzelnen Nervenzellen im Lebenden. Die größte Herausforderung besteht dabei in der ausreichenden Biocytin-Markierung von mindestens zwei Nervenzellen sowie einer präzisen histologischen Vorgehensweise. Die Anzahl der gefundenen Kontakte selbst ist niedrig und kann so mittels weiterer Techniken, wie der Elektronenmikroskopie, näher untersucht werden.

Referenzen

Ahmed, B. *et al.* (1994) 'Polyneuronal innervation of spiny stellate neurons in cat visual cortex', *Journal of Comparative Neurology*, 341(1), pp. 39–49.

Barrett, J. N. and Graubard, K. (1970) 'Fluorescent staining of cat motoneurons in vivo with beveled micropipettes', *Brain Research*, 18, pp. 565–568.

Binzegger, T. (2004) 'A Quantitative Map of the Circuit of Cat Primary Visual Cortex', *Journal of Neuroscience*, 24(39), pp. 8441–8453.

Blackstad, T. W. (1975) 'Electron microscopy of experimental axonal degeneration in photochemically modified golgi preparations: A procedure for precise mapping of nervous connections', *Brain Research*, 95(2–3), pp. 191–210.

Colonnier, M. (1968) 'Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study', *Brain Research*, 9(2), pp. 268–287.

da Costa, N. M. and Martin, K. A. C. (2011) 'How Thalamus Connects to Spiny Stellate Cells in the Cat's Visual Cortex', *Journal of Neuroscience*, 31(8), pp. 2925–2937.

DeFelipe, J. and Fariñas, I. (1992) 'The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs', *Prog Neurobiol*, 39(6), pp. 563–607.

Dercksen, V. J., Hege, H. C. and Oberlaender, M. (2014) 'The filament editor: An interactive software environment for visualization, proof-editing and analysis

of 3D neuron morphology', *Neuroinformatics*, 12(2), pp. 325–339.

Deuchars, J. and Thomson, A. M. (1995a) 'Innervation of burst firing spiny interneurons by pyramidal cells in deep layers of rat somatomotor cortex: Paired intracellular recordings with biocytin filling', *Neuroscience*, 69(3), pp. 739–755.

Deuchars, J. and Thomson, A. M. (1995b) 'Single axon fast inhibitory postsynaptic potentials elicited by a sparsely spiny interneuron in rat neocortex', *Science*, 69(3), pp. 705–709.

Deuchars, J., West, D. C. and Thomson, A. M. (1994) 'Relationships between morphology and physiology of pyramid-pyramid single axon connections in rat neocortex in vitro', *The Journal of Physiology*, 478(3), pp. 423–435.

Egger, R. *et al.* (2012) '3D Reconstruction and Standardization of the Rat Vibrissal Cortex for Precise Registration of Single Neuron Morphology', *PLoS Computational Biology*, 8(12).

Feldmeyer, D. *et al.* (1999) 'Reliable synaptic connections between pairs of excitatory layer 4 neurones within a single "barrel" of developing rat somatosensory cortex', *The Journal of physiology*, 521 Pt 1, pp. 169–190.

Feldmeyer, D. *et al.* (2002) 'Synaptic connections between layer 4 spiny neurone- layer 2/3 pyramidal cell pairs in juvenile rat barrel cortex: physiology and anatomy of interlaminar signalling within a cortical column', *The Journal of Physiology*, 538(3), pp. 803–822.

Feldmeyer, D. (2005) 'Monosynaptic Connections between Pairs of Spiny Stellate Cells in Layer 4 and Pyramidal Cells in Layer 5A Indicate That Lemniscal and Paralemniscal Afferent Pathways Converge in the Infragranular Somatosensory Cortex', *Journal of Neuroscience*, 25(13), pp. 3423–3431.

Gray, E. G. (1959) 'Axo-Somatic and Axo-Dendritic Synapses of the Cerebral Cortex: an Electron Microscope Study', *Journal of Anatomy*, 93(Pt 4), pp. 420–433.

Hof, P. R. *et al.* (2014) *Cellular Components of Nervous Tissue, From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience: Third Edition.*

Horikawa, K. and Armstrong, W. E. (1988) 'A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates', *Journal of Neuroscience Methods*, 25(1), pp. 1–11.

Jones, E. G. and Powell, T. P. S. (1970) 'Electronmicroscopy of the somatic sensory cortex of the cat I. Cell types and synaptic organization', *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.*, 257(January), pp. 1–11.

Kandel, E. R. and Siegelbaum, S. A. (2000) *Principles of Neural Science*. Fourth Edi. Edited by E. R. Kandel, J. H. Schwartz, and T. M. Jessell. McGraw-Hill.

Kelly, J. P. and van Essen, D. C. (1974) 'Cell Structure and Function in the visual Cortex of the Cat', *J. Physiol.*, 36(2), pp. 243–243.

Kisvárdy, Z. F. and Eysel, U. T. (1992) 'Cellular organization of reciprocal patchy networks in layer III of cat visual cortex (area 17)', *Neuroscience*, 46(2), pp. 275–286.

LeVay, S. (1973) 'Synaptic patterns in the visual cortex of the cat and monkey. Electron microscopy of Golgi Preparations', *The Journal of Comparative Neurology*, 150(1), pp. 53–85.

Lund, J. S. *et al.* (1979) 'Anatomical organization of the primary visual cortex (area 17) of the cat. A comparison with area 17 of the macaque monkey.', *The Journal of comparative neurology*, 184(4), pp. 599–618.

Narayanan, R. T. *et al.* (2014) 'Juxtosomal Biocytin Labeling to Study the Structure-function Relationship of Individual Cortical Neurons', *Journal of Visualized Experiments*, (84), pp. 1–9.

Narayanan, R. T. *et al.* (2015) 'Beyond columnar organization: Cell type- and target layer-specific principles of horizontal axon projection patterns in rat vibrissal cortex', *Cerebral Cortex*, 25(11), pp. 4450–4468.

Narayanan, R. T., Udvary, D. and Oberlaender, M. (2017) 'Cell Type-Specific Structural Organization of the Six Layers in Rat Barrel Cortex', *Frontiers in Neuroanatomy*, 11(October), pp. 1–10.

Nicholson, C. and Kater, S. B. (1973) 'The Development of Intracellular Staining', in Kater, S. B. and Nicholson, C. (eds) *Intracellular Staining in Neurobiology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–19.

Oberlaender, M. (2007) 'Transmitted light brightfield mosaic microscopy for three-dimensional tracing of single neuron morphology', *Journal of Biomedical Optics*, 12(6), p. 064029.

Oberlaender, M. *et al.* (2009) 'Shack-Hartmann wave front measurements in cortical tissue for deconvolution of large three-dimensional mosaic transmitted light brightfield micrographs', *Journal of Microscopy*, 233(2), pp. 275–289.

Oberlaender, M. *et al.* (2012) 'Cell type-specific three-dimensional structure of thalamocortical circuits in a column of rat vibrissal cortex', *Cerebral Cortex*, 22(10), pp. 2375–2391.

Peters, A. and Proskauer, C. C. (1980) 'Synaptic relationship between a multipolar stellate cell and a pyramidal neuron in the rat visual cortex. A combined Golgi electron microscope study', *Journal of Neur*, 9, pp. 163–183.

Peters, A., White, E. L. and Fairén, A. (1977) 'Synapses between identified neuronal elements. An electron microscopic demonstration of degenerating axon terminals synapsing with Golgi impregnated neurons', *Neuroscience Letters*, 6(2–3), pp. 171–175.

Pinault, D. (1996) 'A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: Morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin', *Journal of Neuroscience Methods*, 65(2), pp. 113–136.

Ramón y Cajal, S. (1909) 'Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres. Maloine, Paris: 1911. chap. II', *Demography*, v.1(90), pp. 3–43.

Rodriguez-Moreno, J. *et al.* (2017) 'Quantitative 3D Ultrastructure of Thalamocortical Synapses from the "Lemniscal" Ventral Posteromedial Nucleus in Mouse Barrel Cortex', *Cerebral Cortex*, (June 2018), pp. 1–17. doi: 10.1093/cercor/bhx187.

Schindelin, J. *et al.* (2012) 'Fiji: An open-source platform for biological-image analysis', *Nature Methods*, 9(7), pp. 676–682.

Schoonover, C. E. *et al.* (2014) 'Comparative Strength and Dendritic Organization of Thalamocortical and Corticocortical Synapses onto Excitatory Layer 4 Neurons', *Journal of Neuroscience*, 34(20), pp. 6746–6758.

Smyth, A. (2015) *Automated Detection of Putative Synaptic Contacts between Pairs of In Vivo Labeled Neurons*, *Bachelor Thesis*. Eberhard-Karls University

Tübingen, University of Stuttgart.

Squire, L. R. *et al.* (2008) *Fundamental Neuroscience, Fundamental Neuroscience*.

Staiger, J. F. *et al.* (2004) 'Functional diversity of layer IV spiny neurons in rat somatosensory cortex: Quantitative morphology of electrophysiologically characterized and biocytin labeled cells', *Cerebral Cortex*, 14(6), pp. 690–701.

Stepanyants, A., Hirsch, J. A. and Martinez, L. M. (2008) 'Local Potential Connectivity in Cat Primary Visual Cortex', *Cerebral Cortex*, (January 2008), pp. 13–28.

Stratford, K. J. *et al.* (1996) 'Excitatory synaptic inputs to spiny stellate cells in cat visual cortex.', *Nature*, pp. 258–261.

Thomson, A. M. and Deuchars, J. (1997) 'Synaptic interactions in neocortical local circuits: Dual intracellular recordings in vitro', *Cerebral Cortex*, 7(6), pp. 510–522.

Wang, G. and Smith, S. J. (2012) 'Sub-diffraction Limit Localization of Proteins in Volumetric Space Using Bayesian Restoration of Fluorescence Images from Ultrathin Specimens', *PLoS Computational Biology*, 8(8), pp. 1–11.

White, E. L. and Rock, M. P. (1981) 'A comparison of thalamocortical and other synaptic inputs to dendrites of two non-spiny neurons in a single barrel of mouse Sml cortex', *Journal of Comparative Neurology*, 195(2), pp. 265–277.

Wise, S. P. and Jones, E. G. (1977) 'Cells of origin and terminal distribution of descending projections of the rat somatic sensory cortex', *J Comp Neurol.*, 175, pp. 129–157.

Wright, L. D. *et al.* (1952) 'Biological Studies of Biocytin', *Journal of the American Chemical Society*, 74(8), pp. 2004–2006.

Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde mit Unterstützung des *Werner Reichardt Centrum für Integrative Neurowissenschaften*, Abteilung „Systems Neurophysiology“ unter Betreuung von Prof. Dr. Cornelius Schwarz durchgeführt.

Die Konzeption und Umsetzung der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit dem *Max-Planck-Institut für biologische Kybernetik* in Tübingen und dem *Center of Advanced European Studies and Research (Caesar)* in Bonn, Abteilung „In Silico Brain Sciences“ unter Leitung von Dr. Marcel Oberländer.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Rajeevan Narayanan von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Bonn, den

[Unterschrift]

Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei **Prof. Dr. Cornelius Schwarz** vom *Werner Reichardt Centrum für Integrative Neurowissenschaften* in Tübingen bedanken, welcher die vorliegende Arbeit ermöglichte.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 2013 bis April 2018 am *Max-Planck-Institut für biologische Kybernetik* in Tübingen und dem *Center for Advanced European Studies and Research (Caesar)* in Bonn in der Max-Planck-Forschungsgruppe „In silico brain sciences“ unter Leitung von **Dr. Marcel Oberländer** durchgeführt. Ihm danke ich für die Nutzung seiner Räumlichkeiten, seiner Techniken und seines Know-hows. Ganz besonders möchte ich ihm aber für die große Unterstützung während der Arbeit und seine exzellente wissenschaftliche Betreuung danken.

Großer Dank gilt ebenfalls **Dr. Rajeevan Narayanan**, der mir neben den Grundlagen der Laborarbeit die Patch-Clamp Technik und die histologischen Methoden beibrachte. Ich danke ihm für seine unendliche Geduld, das Fingerspitzengefühl und die Hilfsbereitschaft. Seine kollegiale Art und sein stets respektvoller Umgang waren vorbildlich für mich.

Dank gilt **Alison Smith** (R.I.P.) und **Mythreya Seetharama**, welche die Entwicklung des automatischen Tools zur Synapsenerkennung ermöglicht haben.

Außerdem bedanke mich bei **Dr. Robert Egger** für die hervorragende wissenschaftliche Unterstützung. Ebenso möchte ich mich bei **Daniel Udvary** bedanken, der mich in Fragen der Auswertung stets tatkräftig unterstützte.

Zum Schluss möchte ich mich noch ganz besonders bei **Dr. Charlotte Benken-dorff** bedanken. Neben ihrer unglaublichen Unterstützung hat sie mich daran erinnert, wie wichtig ein Leben neben der Arbeit ist.