

Aus der Abteilung Neuroanatomie
(Leiter: Univ.- Prof. Dr. Oliver von Bohlen und Halbach)
des Instituts für Anatomie und Zellbiologie
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. Karlhans Endlich)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Die Rolle von Staufen2 in der neuronalen Plastizität

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald

2023

vorgelegt von:
Sascha Grothe
geb. am: 17.09.1988
in: Karl-Marx-Stadt

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Oliver von Bohlen und Halbach, Greifswald

2. Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Alexander Dityatev, Magdeburg

Ort, Raum: Hörsaal des Instituts für Anatomie und Zellbiologie
Universitätsmedizin Greifswald
Friedrich-Loeffler-Straße 23c
17487 Greifswald

Tag der Disputation: 11.07.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Neuronale Plastizität	1
1.1.1 Lernen und Gedächtnis	3
1.2 Hippocampus	4
1.2.1 Anatomie und Histologie	4
1.2.2 Hippocampale Verbindungen	6
1.2.3 Funktion	9
1.3 Synaptische Plastizität	11
1.3.1 Aktivitätsabhängige Markierung von Synapsen	14
1.4 Dendriten und dendritische Dornen	15
1.4.1 Lokale Proteinbiosynthese in den dendritischen Dornen	17
1.5 Stufen	22
1.5.1 Stufen in der embryonalen Entwicklung	22
1.5.2 Stufen in der Neurogenese	23
1.5.3 Stufen und neuronale Plastizität	25
1.6 Fragestellung und Arbeitshypothese	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Chemikalien und Lösungen	27
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.3 Laborgeräte und Software	27
2.1.4 Versuchstiere	28
2.2 Methoden	30
2.2.1 Gewebeaufbereitung	30
2.2.2 Golgi-Färbung	30
2.2.3 Sholl-Analyse	32
2.2.4 Dendritenanalyse	33
2.2.5 Statistische Auswertung	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Morphologie der Neuronen in CA1	35
3.2 Morphologie und Anzahl der dendritischen Spines in CA1	39

4	Diskussion	43
4.1	Der Einfluss von Stau2 auf die Morphologie der Dendriten und Spines	43
4.2	Stau2 ^{KD} führt zur vermehrter LTP und Verhaltensänderungen	48
4.3	Synaptische Plastizität als bidirektionaler Prozess	52
4.4	Stellenwert mRNA-bindender Proteine	54
4.5	Staufen2 und FMRP	58
4.6	Schlussfolgerungen	59
	Zusammenfassung	61
	Literaturverzeichnis	63
	Abbildungsverzeichnis	81
	Tabellenverzeichnis	82
	Publikation	83
	Eidesstattliche Erklärung	85
	Danksagung	87

Abkürzungsverzeichnis

4E-BP	eIF-4E bindendes Protein, englisch <i>eIF4E binding protein</i>
A. dest.	Destilliertes Wasser, lateinisch <i>Aqua destillata</i>
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	englisch <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
AMPAR	englisch <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i>
BCM	nach Bienenstock, Cooper und Munro benannte Theorie zur synaptischen Modifikation
BI	<i>Branching Index</i>
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CA	<i>Cornu ammonis</i> , weitere Unterteilung in die Subregionen CA1-CA3
CA1a	<i>Stratum radiatum-lacunosum-moleculare</i> der CA1-Region mit apikalen Dendriten der Pyramidenzellen
CA1b	<i>Stratum oriens</i> der CA1-Region mit den basalen Dendriten der Pyramidenzellen
Ca ²⁺	Calciumion
CAG	englisch <i>chicken-β-action</i>
CaMKII	englisch <i>calcium-calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CPEB	englisch <i>cytoplasmic polyadenylation element-binding protein</i>
CreERT2	Fusionsprotein aus der Rekombinase <i>Cre</i> und einem mutiertem Östrogenrezeptor
DMTP	Gedächtnistest, englisch <i>delayed matching to place</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, englisch <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNMTP	Gedächtnistest, englisch <i>delayed non-matching to place</i>
EC	entorhinaler Kortex, englisch <i>entorhinal cortex</i>

EGFP	grün fluoreszierendes Protein, englisch <i>enhanced green fluorescent protein</i>
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor der Translation
ERK	englisch <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FMR1	Gen für FMRP, englisch <i>FMRP translational regulator 1</i>
FMRP	englisch <i>fragile X mental retardation protein</i>
FTD	frontotemporale Demenz
FUS	englisch <i>fused in sarcoma</i>
GABA	γ -Aminobuttersäure, englisch <i>γ-aminobutyric acid</i>
GD	<i>Gyrus dentatus</i>
GluR1-4	Untereinheiten 1-4 des AMPA-Rezeptors
GMC	Ganglionmutterzelle, englisch <i>ganglion mother cell</i>
LE	englisch <i>localization element</i>
LEC	lateraler Anteil des entorhinalen Kortex
LTD	Langzeitdepression, englisch <i>long-term depression</i>
LTP	Langzeitpotenzierung, englisch <i>long-term potentiation</i>
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein, englisch <i>microtubule-associated protein</i>
MEC	medialer Anteil des entorhinalen Kortex
Mg ²⁺	Magnesiumion
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
miR(Stau2)	zu Stau2 komplementäre miRNA
miRNA	microRNA
Mnk	englisch <i>MAP kinase-interacting kinase</i>
mRNA	messenger RNA
mTOR	englisch <i>mammalian target of rapamycin</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor

ORF	offener Leserahmen, englisch <i>open reading frame</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, englisch <i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A, englisch <i>protein kinase A</i>
pros	Transkriptionsfaktor prospero
PSD	Postsynaptische Verdichtung, englisch <i>postsynaptic density</i>
PSD-95	englisch <i>postsynaptic density protein 95</i>
RBP	RNA-bindendes Protein, englisch <i>RNA binding protein</i>
RISC	englisch <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure, englisch <i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RNP	Ribonukleoprotein-Partikel, englisch <i>ribonucleoprotein particle</i>
SMD	Staufen-vermittelte RNA-Degradierung, englisch <i>Staufen-mediated decay</i>
SRS	RNA-Strukturen, die als Bindungsstelle für Staufenproteine dienen, englisch <i>Stau-recognised structures</i>
Stau1	Staufen1
Stau2	Staufen2
Stau2 ^{KD}	Staufen2-Knockdown
TARP	transmembranöses AMPAR-Regulationsprotein, englisch <i>trans-membrane AMPAR regulatory protein</i>
TDP-43	englisch <i>TAR DNA-binding protein of 43 kDa</i>
UTR	nicht-translatierter Bereich der mRNA, englisch <i>untranslated region</i>
ZBP1	englisch <i>zipcode binding protein 1</i>
µm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Neuronale Plastizität

Der Begriff neuronale Plastizität beschreibt die Fähigkeit des Nervensystems auf intrinsische und extrinsische Reize zu reagieren und sich daraufhin morphologisch, strukturell und auch funktionell zu adaptieren und zu verändern (Cramer et al., 2011). Neuronale Plastizität tritt im Zusammenhang mit vielen verschiedenen Prozessen auf, wobei die wohl bekannteste Form das Lernen und damit verbunden auch die Gedächtnisbildung darstellt. Andere Formen plastischer Prozesse sind die Hirnentwicklung sowie die Reifung des Gehirns während der Adoleszenz und mit vorschreitendem Alter eines Individuums auch Alterungsprozesse. Nach Verletzungen oder im Rahmen von Erkrankungen können plastische Veränderungen des Nervensystems auftreten und in der Folge in einem begrenztem Maße Regenerationsvorgänge aber auch Anpassungsvorgänge in Gang setzen, die mit plastischen Adaptionen innerhalb des Nervensystems einhergehen (Gispén, 1993; Cramer et al., 2011).

Auf Ebene der Neuronen werden diese Anpassungsvorgänge unter anderem durch Modulation der Signalübertragung sowie durch morphologische Veränderungen mit Ausbildung neuer Synapsen, einer Neuordnung bereits vorhandener Synapsen bzw. neuronaler Verbindungen oder auch deren Verlust abgebildet (Cramer et al., 2011; Caroni et al., 2014). Außerdem zählen die Entwicklung neuer Nervenzellen, die sogenannte adulte Neurogenese, und auch die Degradierung von Neuronen zu den Prozessen der neuronalen Plastizität (McConnell, 1995). Einen Überblick über das Konzept der neuronalen Plastizität liefert Abbildung 1.

Der Begriff der neuronalen Plastizität taucht erstmalig in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts in der Literatur auf. Der Psychologe William James beschreibt in seinem Buch „*Principles of Psychology*“ (1890), die Fähigkeit eines Organismus zur Habituation beruhe auf der Plastizität organischer Materialien eines Lebewesens, insbesondere des Nervensystems. Das Nervensystem sei ein Geflecht an Verbindungen mit einem sensorischen Ausgangspunkt und einem meist motorisch oder glandulärem Endpunkt. Innerhalb dieses Systems müssten durch wahrgenommene sensorische Reize entstandene Ströme einen Weg

hinausfinden und dabei entweder vorhandene Verbindungen stärken oder neue Verbindungen schaffen (James, 2007). Wie James nutzten auch andere Neurologen und Psychiater dieser Zeit den Begriff der Plastizität in Bezug auf das Gehirn (Ferreira et al., 2014), jedoch waren dies nur theoretische Konzepte ohne Bezug auf anatomische und physiologische Veränderungen innerhalb des Nervensystems.

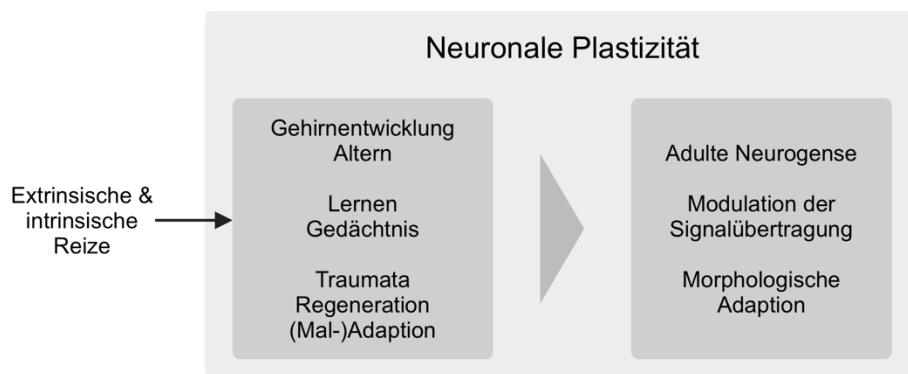


Abbildung 1: Konzept der neuronalen Plastizität. Extrinsische und intrinsische Reize führen bei Gehirnentwicklung und Altern, beim Lernen und der Gedächtnisbildung, aber auch nach Traumata und im Rahmen von Regenerations- und Adaptionsvorgängen zu plastischen Veränderungen im Nervensystem. Diese Vorgänge werden als neuronale Plastizität bezeichnet. Auf zellulärer bzw. molekularer Ebene werden diese Anpassungen durch adulte Neurogenese, Modulation der synaptischen Übertragung sowie morphologische Veränderungen an den Synapsen abgebildet.

Der Spanier Santiago Ramón y Cajal führte mithilfe einer von Camillo Golgi entwickelten Silberimprägnierung von Nervenzellen erstmalig zahlreiche morphologische Studien durch, auf deren Basis die Neuronendoktrin entstand (DeFelipe, 2006). Erstmalig formuliert wurde diese durch den deutschen Anatomen Wilhelm Waldeyer im Jahr 1891. Die Neuronendoktrin beschreibt das fundamentale strukturelle und funktionale Organisationsprinzip des Nervensystems. Wobei das Neuron als anatomische, physiologische, genetische und metabolische Grundeinheit des Nervensystems definiert wurde (Jones, 1994).

Cajal beschrieb 1887 eine Hypothese der „cerebralen Gymnastik“ als plastischen Mechanismus, die Anzahl an Verbindungen zwischen Neuronen als Antwort auf einen äußeren Stimulus zu erhöhen und somit die Kapazität des Gehirns zu steigern. Außerdem sah er einen großen Einfluss der Umwelt auf die Entwicklung und Funktion des Gehirns (DeFelipe, 2006 nach Ramón y Cajal, 1894). Ein Jahr später beschrieb er erstmalig die dendritischen Dornen als Kontaktpunkte der Axonterminalen (DeFelipe, 2006 nach Ramón y Cajal, 1888).

1893 formulierte der Italiener Eugenio Tanzi die Hypothese, dass es durch Verstärkung bereits existierender neuronaler Verbindungen zu einer Verbesserung der Effektivität von neuronalen Schaltkreisen kommt. Er sah dabei die physische Lücke zwischen den Nervenzellen als größtes Hindernis der Impulspassage an. Durch häufige Nutzung bestimmter Verbindungen, bspw. im Rahmen von Lernvorgängen, komme es zu einer Hypernutrition und Hypertrophie in diesen Bereichen. Diese Hypertrophie betreffe auch die axonalen Fortsätze und bewirke dort eine Verlängerung und damit auch eine Verkleinerung der Distanz zwischen den einzelnen Neuronen, was zu einer gesteigerten Kapazität dieses Schaltkreises führe (DeFelipe, 2006).

Mit seinen eigenen zahlreichen Studien und auch der Interpretation der Arbeiten seiner Kollegen legte Cajal die Grundlagen für die modernen Neurowissenschaften. Die Strukturen und Verbindungen des Gehirns werden seitdem als plastisch angesehen. Veränderungen innerhalb dieser Verbindungen können sowohl durch intrinsische und extrinsische Reize als auch durch Lernprozesse ausgelöst werden.

1.1.1 Lernen und Gedächtnis

Lernen und Gedächtnis sind zwei zentrale Elemente der neuronalen Plastizität. Das Lernen wird dabei als Erwerb neuer Informationen oder Fähigkeiten verstanden und das Gedächtnis als das Behalten bzw. Speichern dieser gelernten Informationen und Fähigkeiten (Bear et al., 2015, Seite 824). Das hypothetische physische Korrelat im Sinne einer materiellen Basis der im Gehirn gespeicherten Information wird als Engramm bezeichnet (Semon, 1925).

Innerhalb des Gedächtnisses werden sehr heterogene Informationen für verschieden lange Zeiträume gespeichert, sodass sich unterschiedliche Formen des Gedächtnisses abgrenzen lassen. Zum einen kann eine Unterteilung in deklaratives und nicht-deklaratives Gedächtnis getroffen werden. Das deklarative Gedächtnis speichert vor allem Fakten und Ereignisse. Das nicht-deklarative Gedächtnis lässt sich in weitere Unterformen kategorisieren. Dazu zählt zum einen das prozedurale Gedächtnis zur Speicherung von Verhaltensweisen, Fähigkeiten und Gewohnheiten. Ein anderer wichtiger Teil ist das assoziative Gedächtnis, das Zusammenhänge zwischen Ereignissen herstellt und Reaktionen sowie

Verhaltensänderungen darauf ermöglicht. Hierzu zählt sowohl die klassische als auch operante Konditionierung (Bear et al., 2015, Seiten 824ff.).

Auch in Bezug auf die Dauer der Informationsspeicherung lassen sich verschiedene Formen des Gedächtnisses unterscheiden. Dabei erfolgt die Speicherung zweistufig. So werden die Informationen zuerst im Kurzzeitgedächtnis für wenige Stunden gespeichert. Die meisten Informationen gehen danach wieder verloren. Nur ein geringer Anteil wird durch einen Konsolidierungsprozess ins Langzeitgedächtnis übertragen. Parallel zum Kurzzeitgedächtnis kann noch das Arbeitsgedächtnis abgegrenzt werden, das aktuelle Informationen zur Handlungssteuerung schnell abrufbar bereitstellt (Bear et al., 2015, Seiten 828ff.).

1.2 Hippocampus

Eine zentrale Rolle innerhalb der Lern- und Gedächtnisprozesse, vor allem bei der Konsolidierung und dem Ortsgedächtnis, und damit einhergehend auch für plastische Veränderungen auf neuronaler und synaptischer Ebene spielt der Hippocampus.

1.2.1 Anatomie und Histologie

Der Hippocampus ist Teil des Telencephalons, genauer des Archicortex. Er bildet eine bilaterale Struktur in der hinteren Hälfte der Hemisphären im Rattenhirn und wird rostral von der Amygdala und kaudal vom *Splenium corporis callosi* begrenzt (Boccara et al., 2015). In der Koronarebene grenzt er nach lateral und kranial an den Neokortex. Mediokaudal befindet sich der Thalamus. Anatomisch erfolgt die Unterteilung des Hippocampus in den *Gyrus dentatus*, das *Cornu ammonis* und das *Subiculum*. Der Begriff der hippocampalen Formation beinhaltet zusätzlich noch den *entorhinalen Kortex* (EC), sowie *Prä-* und *Parasubiculum* als Übergangszone zwischen *Subiculum* und *entorhinalem Kortex* (Insausti, 1993). Das *Cornu ammonis* lässt sich weiter in drei Subregionen (CA1-CA3) unterteilen, wobei die CA1-Region benachbart zum *Subiculum* liegt und CA3 den Übergang bis zum Hilus des *Gyrus dentatus* bildet (Boccara et al., 2015). Die Region um den Hilus wird von manchen Autoren auch als CA4 bezeichnet (Falougy et al., 2006).

Aus histologischer Sicht unterscheidet sich der Archicortex durch eine dreischichtige Zytoarchitektur vom übrigen Neokortex mit seinem typischen sechsschich-

tigen Aufbau (Falougy et al., 2006). Im Bereich des *Cornu ammonis* befindet sich eine mittlere Schicht aus dichtgepackten Pyramidenzellen, das *Stratum pyramidale*. Die innere Schicht bildet das schmale *Stratum oriens*, welches die basalen Dendriten der Pyramidenzellen enthält. Die dritte Schicht bildet das *Stratum radiatum-lacunosum-moleculare*. Es enthält die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen und unterteilt sich in die Subregionen *Stratum lucidum*, welches den Pyramidenzellen anliegt und aus den Moosfasern des *Gyrus dentatus* besteht, *Stratum moleculare* und *Stratum lacunosum-moleculare*. Im *Gyrus dentatus* enthält die mittlere Schicht Körnerzellen und wird daher *Stratum granulosum* genannt (Boccaro et al., 2015). Daneben gibt es ebenso ein *Stratum moleculare* und die dritte Schicht bildet der *Hilus fasciae dentatae*. Abbildung 2 gibt eine schematische Übersicht über den vorgestellten anatomischen und histologischen Aufbau des Hippocampus.

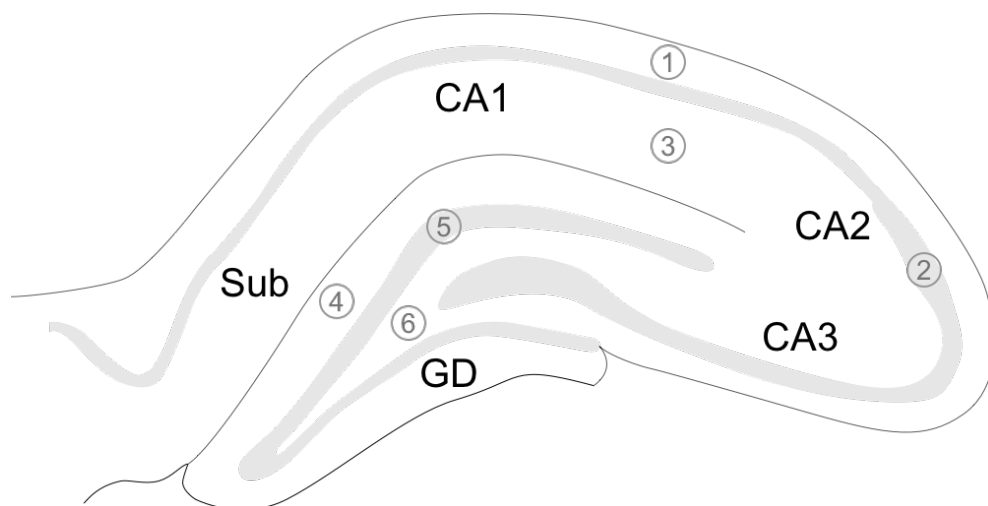


Abbildung 2: Schematische Übersicht des Hippocampus der Ratte. Dargestellt in der Koronarebene. Der Hippocampus unterteilt sich in Subiculum (Sub), Cornu ammonis (CA1-CA3) und den Gyrus dentatus (GD). Histologisch zeigt sich eine Dreischichtung mit Stratum oriens (1), Stratum pyramidale (2) und Stratum radiatum-moleculare-lacunosum (3) im Cornu ammonis. Der Gyrus dentatus besteht ebenfalls aus einem Stratum moleculare (4), dem Stratum granulosum (5) und dem Hilus fasciae dentatae (6). Basierend auf Paxinos et al., 2007, Figure 61.

Das *Stratum pyramidale* des *Cornu ammonis* ist keine homogene Zellpopulation. Es zeigt sich immer mehr, dass die Pyramidenzellen entlang aller räumlichen Achsen des Hippocampus heterogen verteilt sind (Basu et al., 2015) und sich bezüglich ihrer Verbindungen zu anderen Hirnregionen, ihrem Entladungsmuster und in ihrer Proteinexpression unterscheiden.

Im Hippocampus der Ratte befinden sich jeweils ca. 300.000 Pyramidenzellen in der CA1- und CA3-Region, in CA2 sind es ca. 30.000. Der *Gyrus dentatus* besteht zusätzlich aus ca. 1.000.000 Körnerzellen (Amaral et al., 1990). Daneben gibt es viele verschiedene inhibitorische GABA-erge Interneuronen, deren Anzahl auf ca. 10-20% der exzitatorischen Zellen geschätzt wird. Eine durchschnittliche Pyramidenzelle in der CA1-Region hat ungefähr 30.000 glutamaterge Synapsen und zusätzlich ca. 1700 GABA-erge Eingänge (Megías et al., 2001).

1.2.2 Hippocampale Verbindungen

Der *entorhinale Kortex* bildet die Haupteingangsquelle des Hippocampus und damit die Schnittstelle zwischen Neokortex und Hippocampus (Witter et al., 1991). Den Hauptausgangspfad dagegen bildet die CA1-Region (van Strien et al., 2009). Ein klassisches und weithin akzeptiertes Modell für die hippocampale Informationsverarbeitung und -modulation stellt der sogenannte trisynaptische Schaltkreis dar (Abbildung 3). Den Ausgangspunkt bilden die Neurone des EC, welche über den *Tractus perforans* zu den Körnerzellen des *Gyrus dentatus* projizieren. Die Axone der Körnerzellen ziehen als sogenannte Moosfasern zu den Pyramidenzellen der CA3-Region. Als letzte Station des Schaltkreises projizieren die Pyramidenzellen der CA3-Region über die Schaffer-Kollateralen in die CA1-Region (Naber et al., 2000). Daneben erhält die CA1-Region direkte Projektionen aus dem EC (Basu et al., 2015).

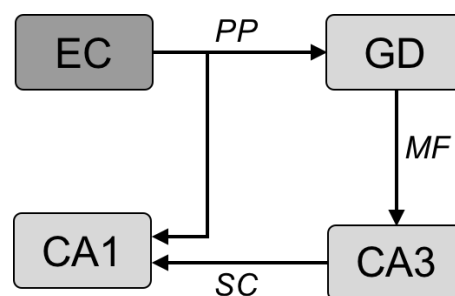


Abbildung 3: Klassischer corticohippocampaler Schaltkreis. Der entorhinale Kortex (EC) bildet die Haupteingangsquelle des trisynaptischen Schaltkreises. Über den Tractus perforans (PP) projizieren dessen Neurone in den Gyrus dentatus (GD). Von dort gelangen Afferenzen als Moosfasern (MF) in die CA3-Region, werden erneut verschaltet und gelangen dann über die Schaffer-Kollaterale (SC) nach CA1 als Hauptausgangsstation des Hippocampus. Zusätzlich besteht eine direkte monosynaptische Verbindung zwischen EC und CA1. Modifiziert nach Basu et al., 2015.

In einer erweiterten Betrachtung lässt sich der EC in einen medialen (MEC) und einen lateralen Anteil (LEC) unterteilen. Dies ist dahingehend von Bedeutung, als dass sich MEC und LEC bezüglich ihrer Verbindungen zu anderen kortikalen Arealen und auch bezüglich ihrer Projektionen innerhalb des hippocampalen Systems unterscheiden (Knierim et al., 2013).

Der LEC erhält Afferenzen aus dem ventralen visuellen System. Dieses besteht aus multisynaptischen occipitotemporalen Projektionen, die dem *Fasciculus longitudinalis inferior* folgen und die *Area striata* als primäre Sehrinde mit höheren visuellen Zentren, der *Area prestriata* und dem inferioren temporalen Kortex verbinden. Der MEC dagegen erhält vor allem Afferenzen aus dem dorsalen visuellen System. Es besteht ebenfalls aus multisynaptischen Verbindungen höherer visueller Areale und verbindet die primäre Sehrinde mit inferioren parietalen Arealen über den *Fasciculus longitudinalis superior* (Mishkin et al., 1983).

Auch die entorhinalen Efferenzen unterscheiden sich je nach Ursprung. So finden sich entlang der Transversalachse in CA1 proximal, näher an CA2, hauptsächlich direkte Eingangsverbindungen aus dem MEC. In der distalen CA1-Region, nahe dem Übergang zum *Subiculum*, bilden dagegen direkte Efferenzen aus dem MEC die Haupteingangsquelle (Witter et al., 1991).

Zusätzlich scheint die kleine CA2-Region eine wichtige Umschaltstation innerhalb der hippocampalen Verbindungen zu sein. Sie erhält ausgeprägte exzitatorische Afferenzen direkt aus dem EC über den *Tractus perforans* und weniger stark ausgeprägte Signale aus den benachbarten Regionen CA3 und GD. Die Hauptausgänge bilden stark exzitatorische Efferenzen in die CA1-Regionen (Chevalyere et al., 2010).

Zum klassischen trisynaptischen Verschaltungsmodell des Hippocampus (EC → GD → CA3 → CA1) kommt somit durch eine direkte Verbindung zwischen CA1 und EC ein monosynaptischer Pfad (CA1 → EC) hinzu. Unter Berücksichtigung der CA2-Region als eigenständige Verschaltungsebene folgt außerdem die Ergänzung um einen stark exzitatorischen disynaptischen Pfad (EC → CA2 → CA1) sowie eine weniger stark ausgeprägte quadrosynaptische Verschaltung (EC → GD → CA3 → CA2 → CA1) (Basu et al., 2015). Abbildung 4 fasst das aufgezeigte erweiterte Verschaltungsmuster der hippocampalen Verbindungen zusammen.

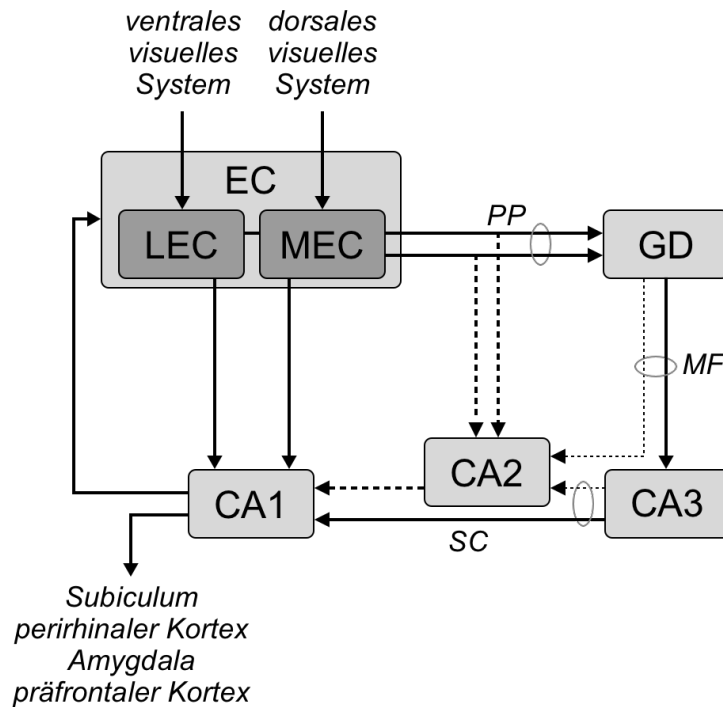


Abbildung 4: Erweiterte Verschaltungen des Hippocampus. Der entorhinale Kortex (EC) bildet weiterhin die Hauptquelle der hippocampalen Verschaltungen, kann aber in einen lateralen (LEC) und einen medialen Anteil (MEC) unterteilt werden. Entsprechend des klassischen trisynaptischen Schaltkreises projizieren LEC und MEC über den Tractus perforans (PP) in den Gyrus dentatus (GD) und weiter als Moosfasern (MF) in die CA3-Region und schließlich als Schaffer-Kollaterale (SC) nach CA1 als Hauptausgangsstation des Hippocampus. Neben der monosynaptischen Verbindung EC → CA1 gibt es auch eine Rückprojektion CA1 → EC. Zusätzlich wird CA2 als Umschaltstation berücksichtigt und integriert einen stark ausgeprägten disynaptischen Schaltkreis EC → CA2 → CA1 und einen weniger ausgeprägten quadrosynaptischen Pfad EC → GD → CA3 → CA2 → CA1. Modifiziert nach Basu et al., 2015.

Entlang der räumlichen Achsen des Hippocampus bestehen neben der unterschiedlichen Ausprägung der Afferenzen und Efferenzen auch Unterschiede bezüglich spezifischer Funktionen und auch im Verhalten der hippocampalen Neuronen. So zeigt sich ein proximodistaler Gradient im Feuerverhalten der Neuronen mit einem regulären Muster in der proximalen CA1-Region und einem deutlich verstärktem Feuermuster im *Subiculum* (Jarsky et al., 2008). Auch entlang der Longitudinalachse zeigen sich Unterschiede, so etwa bei der Proteinexpression im ventralen bzw. dorsalem Hippocampus (Dougherty et al., 2013).

Wie bereits erwähnt bildet CA1 die Hauptausgangsstation aus dem Hippocampus. Von hier aus verlaufen neuronale Projektionen zu den benachbarten Hirnregionen wie dem *Subiculum* und dem perirhinalen Kortex, aber auch zur Amygdala und in den präfrontalen Kortex (Groen et al., 1990). Des Weiteren gibt es eine stark ausgeprägte Feedbackschleife von Projektionen zurück zum EC

(Naber et al., 2001). Auch bezüglich der ausgehenden Fasern zeigen sich Unterschiede entlang der räumlichen Achsen des Hippocampus. So projizieren Neuronen in der ventralen CA1-Region vermehrt in den präfrontalen Kortex und die Amygdala (Ishikawa et al., 2006).

1.2.3 Funktion

Das komplexe Verschaltungsmuster des Hippocampus schlägt sich auch in seiner Funktion nieder. So spielt der Hippocampus eine wichtige Rolle bei der Gedächtniskonsolidierung. Scoville und Milner konnten mit dem berühmten Fall des Patienten H.M. zeigen, dass eine bilaterale Entfernung der medialen Anteile der Temporallappen inklusive großer Teile der Hippocampi zu einer ausgeprägten anterograden Amnesie führt (Scoville et al., 1957). Der Hippocampus ist vor allem für die Ausbildung des deklarativen und episodischen Langzeitgedächtnisses entscheidend (Squire et al., 1991). Innerhalb der hippocampalen Schaltkreise erfolgt außerdem die Integration multipler sensorischer Informationen aus den verschiedenen kortikalen Arealen unter anderem von örtlichen, zeitlichen und gegenständlichen Informationen von erlebten Ereignissen (Ergorul, 2004). Dabei könnten die verschiedenen hippocampalen Schaltkreise dazu dienen, dass in der CA1-Region ein Vergleich zwischen aktuellen sensorischen Informationen und bereits vorhanden mnestischen Informationen unter anderem aus dem GD und CA3 stattfindet (Duncan et al., 2011). Somit kann durch den Vergleich und die Integration verschiedener zeitlich zusammentreffender Reize ein episodisches Ereignis kodiert und durch Anlegen eines bleibenden Engramms im Gedächtnis konsolidiert werden (Dudman et al., 2007; Basu et al., 2013).

Die genaue Rolle des Hippocampus beim Abrufen von Gedächtnisinhalten ist jedoch weiterhin nicht vollständig verstanden, da sich bei Patienten und auch in Tierstudien mit hippocampalen Läsionen neben einer anterograden Amnesie auch unterschiedlich stark ausgeprägte retrograde Amnesien zeigten (Squire, 2004; Bartsch et al., 2011). Eine mögliche Erklärung dafür liefert das *Multiple-Trace-Modell* zur Gedächtniskonsolidierung. Im Gegensatz zum Standardmodell, bei dem Engramme im Rahmen der sogenannten Systemkonsolidierung im zeitlichen Verlauf vom Hippocampus in den Neokortex verschoben werden, bleibt im *Multiple-Trace-Modell* der Hippocampus auch nach der Systemkonsolidierung an der Speicherung der Engramme beteiligt (Nadel et al., 2000). Außerdem kommt

es durch Abrufen einer episodischen Erinnerung in einem geänderten Kontext zur Integration der ursprünglichen Erinnerung mit aktuellen sensorischen Reizen und zur Ausbildung einer neuen Gedächtnisspur mit Beteiligung des Hippocampus und des Neokortex (Squire et al., 2015).

Neben dem deklarativen Gedächtnis legen zahlreiche Studien nahe, dass der Hippocampus elementar für das räumliche Gedächtnis sowie für die Orientierung eines Individuums im Raum ist (Silva et al., 1998). O'Keefe und Dostrovsky entdeckten 1971 Pyramidenzellen mit einem ortsabhängigem Aktivitätsmuster im Hippocampus von Ratten. Diese sogenannten Ortszellen sind in der aktuellen Umgebung eines Tieres nur innerhalb eines bestimmten Bereiches aktiv, dem Ortsfeld. Befindet sich das Tier außerhalb des Ortsfeldes einer Pyramidenzelle, zeigt diese kaum Aktivität (O'Keefe et al., 1971). Dabei scheinen gleichzeitig aktive Ortszellen im Hippocampus die aktuelle Position eines Tieres zu kodieren (Wilson et al., 1993). Innerhalb des Hippocampus und insbesondere der CA1-Region entsteht so eine neuronale Karte der aktuellen Umgebung (Moser et al., 2008). Diese Karten sind umgebungsspezifisch und müssen für jede bisher unbekannte Umgebung neu angelegt werden (Muller, 1996). Grundlage dieser neuronalen Karten zur Orientierung und Navigation bildet die Integration propriozeptiver Informationen über die körpereigenen Bewegungen mit visuellen Hinweisen aus der Umgebung. Die visuellen Informationen entstammen dem MEC (Igarashi, 2016) als einer der Haupteingangsquellen des Hippocampus. Dieser enthält dafür eine Reihe spezifischer Neuronen wie Gitterzellen und Neuronen, deren Aktivität abhängig von Begrenzungen, der Kopfposition oder der Geschwindigkeit ist (Hafting et al., 2005; Sargolini et al., 2006; Solstad et al., 2008; Kropff et al., 2015).

Eine mögliche Zusammenführung von deklarativem Gedächtnis und den räumlichen Orientierungsfunktionen des Hippocampus stellt die Theorie der kognitiven Karten dar (Schiller et al., 2015). Durch Integration multipler Informationen werden kognitive Karten mit räumlichen und zeitlichen Orientierungspunkten erzeugt (Eichenbaum et al., 2014). So nehmen Buzsáki und Moser an, dass das deklarative Gedächtnis den gleichen neuronalen Algorithmen unterliegt wie die räumliche Orientierung und Navigation. Das Abrufen von Gedächtnisinhalten stellt dabei eine Art von Navigation im mentalen Raum dar (Buzsáki et al., 2013).

Zusätzlich zu den bisher genannten Funktionen scheint der Hippocampus auch an der Emotionskontrolle beteiligt, insbesondere an Frustration und Enttäuschung (Yang et al., 2017), sowie an der Stressregulation (Dedovic et al., 2009). Entsprechend den Unterschieden der hippocampalen Verbindungen innerhalb der räumlichen Achsen erscheinen auch für die Funktionen des Hippocampus Unterschiede entlang der longitudinalen Achse zu bestehen. So zeigt sich ein dorsoventraler Gradient bezüglich der Dichte an Ortszellen mit deutlich mehr Zellen im dorsalen Hippocampus und dementsprechend größeren Ortsfeldern im ventralen Hippocampus (Jung et al., 1994). Aus funktioneller Sicht ergibt sich eine Unterteilung in ventralen, intermediären und dorsalen Hippocampus. Dabei steht der ventrale Hippocampus im Zusammenhang mit affekt- und emotionsbezogenem Verhalten, der dorsale Hippocampus dagegen ist primär wichtig für kognitive Funktionen wie räumliches und kontextbezogenes Gedächtnis (Fanselow et al., 2010).

1.3 Synaptische Plastizität

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass Synapsen hoch plastische Strukturen sind und die Speicherung von Informationen im Rahmen von Lernen und Gedächtnis mit einer Modifikation von synaptischen Verbindungen bzw. deren Stärke einhergehen, was als synaptische Plastizität bezeichnet wird (Martin et al., 2000; DeFelipe, 2006). Konorski und Hebb stellten die Hypothese auf, dass die Effektivität einer synaptischen Verbindung von ihrer Aktivität abhängt (Berlucchi et al., 2008). Daraus leitete Hebb die Regel ab, dass es bei häufiger gleichzeitiger Aktivierung von zwei miteinander verbundenen Neuronen zu einer Stärkung der Verbindung kommt und so leichter ein Aktionspotenzial in der Effektorzelle ausgelöst werden kann („*neurons that fire together wire together*“). Im Umkehrschluss werden synaptische Verbindungen abgeschwächt, wenn die beiden Neuronen zu unterschiedlichen Zeitpunkten aktiv sind („*neurons that fire out of sync lose their link*“) (Bear et al., 2015, Seite 814).

Als elementare Bausteine der synaptischen Plastizität auf zellulärer Ebene gelten die glutamatergen spannungsabhängigen Ionenkanäle vom NMDA- und AMPA-Typ sowie die Mechanismen der Langzeitpotenzierung (LTP, englisch für *long-*

term potentiation) sowie der Langzeitdepression (LTD, englisch für *long-term depression*) (He et al., 2014).

Der Ionenkanal eines NMDA-Rezeptors ist während des Ruhemembranpotenzials durch ein Magnesiumion (Mg^{2+}) verschlossen, sodass auch nach Aktivierung durch präsynaptisch ausgeschüttetes Glutamat nur ein sehr geringer Calciumeinstrom möglich ist, der nicht ausreicht, um ein Aktionspotenzial auszulösen. Erst eine Depolarisierung der postsynaptischen Membran führt zu einem Herauslösen des Mg^{2+} -Ions und zur Freigabe des Ionenkanals. Zur vollständigen Aktivierung des Rezeptors ist daher neben Glutamat auch eine Depolarisierung der postsynaptischen Membran notwendig (Bear et al., 2015, Seite 815). Im Gegensatz dazu öffnen die AMPA-Rezeptoren bereits bei einer geringen Glutamatkonzentration und bewirken einen Calciumeinstrom in das postsynaptische Neuron. Bei ausreichender Depolarisierung der postsynaptischen Membran kommt es zusätzlich zur Öffnung der NMDA-Rezeptoren und einem relativ starkem Calciumeinstrom (Schmidt et al., 2011, Seite 93).

Eine starke Aktivierung der NMDA-Rezeptoren führt zu einer Stärkung der synaptischen Übertragung durch den Prozess der LTP. Ausgelöst wird die LTP durch das Auftreten von synaptischen Übertragungen, während die postsynaptische Membran bereits stark depolarisiert ist, bspw. durch eine hochfrequente Serie von Aktionspotenzialen. Durch den starken Calciumeinstrom werden die Proteinkinase C und die *calcium-calmodulin-dependent protein kinase II* (CaMKII) mithilfe von *second messengern* wie Ca^{2+} -Calmodulin aktiviert. Im Folgenden kommt es durch Phosphorylierung einerseits zu einer gesteigerten Effektivität der vorhandenen postsynaptischen AMPA-Rezeptoren. Andererseits werden neue AMPA-Rezeptoren durch Aktivierung der CaMKII in die postsynaptische Membran integriert (Bear et al., 2015, Seiten 816 und 875ff.).

Im Gegensatz dazu führt die LTD zu einer geringeren Effektivität der aktiven Synapsen. Geringe Depolarisation der postsynaptischen Membran während einer synaptischen Übertragung, bspw. durch eine niederfrequente Serie an Aktionspotenzialen, kann den LTD-Mechanismus in Gang setzen. Bei nur geringer Aktivierung der postsynaptischen NMDA-Rezeptoren bleiben die Ionenkanäle mit Mg^{2+} blockiert und es kommt zu einem nur geringen Calciumeinstrom. Hierdurch wird anstatt der Proteinkinasen im Rahmen der LTP eine Kaskade von

Phosphatasen aktiviert. Daraufhin kommt es zur Dephosphorylierung von AMPA-Rezeptoren und zusätzlich werden membranständige Rezeptoren internalisiert. Abbildung 5 liefert einen Überblick über die beschriebenen Mechanismen der LTP und LTD.

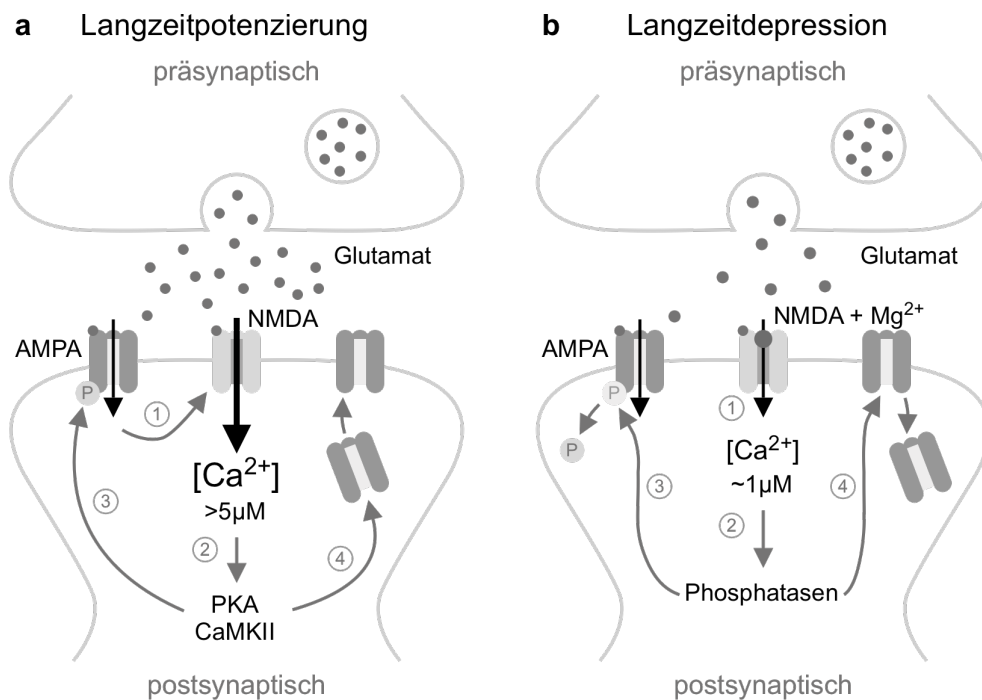


Abbildung 5: Molekulare Mechanismen von Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD). LTP (a): Durch die Ausschüttung von Glutamat kommt es zur Aktivierung von AMPA-Rezeptoren. Bei ausreichender Depolarisierung kommt es zusätzlich zur Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (1). Durch einen starken Anstieg der Calciumkonzentration werden die Proteinkinase A (PKA) und die calcium-calmodulin-abhängige protein kinase II (CaMKII) aktiviert (2). Es kommt daraufhin zur Phosphorylierung von AMPA-Rezeptoren (3) und zum Einbau von weiteren AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran (4). LTD (b): Bei nur geringer Glutamatausschüttung kommt es durch aktivierte AMPA-Rezeptoren nur zu einem geringen Calciumeinstrom. Die Poren der NMDA-Rezeptoren bleiben durch ein Magnesiumion (Mg^{2+}) blockiert (2). Bei nur geringer Calciumkonzentration kommt es zur Aktivierung von Phosphatasen (2), welche zum einen die Phosphorylierung von AMPA-Rezeptoren aufheben. Außerdem werden AMPA-Rezeptoren internalisiert (4). Modifiziert nach Bear et al., 2015, Seiten 874 und 883.

Neben diesen unmittelbaren Effekten der LTP und LTD, die auch als frühe Phase bezeichnet werden und im Zeitraum von circa einer Stunde stattfinden (Pfeiffer et al., 2006), zeigen sich jeweils auch langfristige Veränderungen. Dabei lassen sich eine intermediäre Phase im Zeitraum von circa einer bis drei Stunden nach Beginn der LTP bzw. LTD und eine späte Phase, ab vier Stunden nach Reizinduktion, unterscheiden (Kang et al., 1996; Banko et al., 2005; Pfeiffer et al.,

2006). Der Unterschied zwischen beiden Phasen liegt darin, dass neben der lokalen Proteinbiosynthese in der späten Phase zusätzlich eine Transkription neuer mRNAs im Zellkern auftritt (Manahan-Vaughan et al., 2000; Pfeiffer et al., 2006). Für eine frühe Stabilisierung der LTP oder LTD scheint daher die lokale Proteinbiosynthese durch lokale Translation von mRNAs von großer Bedeutung. Für das Aufrechterhalten über einen längeren Zeitraum hinweg wird dann zusätzlich die Transkription neuer mRNAs im Zellkern benötigt (Frey et al., 1989; Steward et al., 2003).

Die lokale Translation von Proteinen an den Synapsen ist abhängig von der Aktivität der Synapse. Sie muss daher strengen Regulationsmechanismen unterliegen. Dabei lassen sich zwei unterschiedliche Regulationsformen unterscheiden, zum einen allgemeine Mechanismen, die multiple mRNAs betreffen und zum anderen gen-spezifische Regulationen. LTP und LTD scheinen bezüglich der allgemeinen Regulationsmechanismen zu konvergieren (Kelleher et al., 2004). So kommt es bei beiden Vorgängen über die gleichen Signalkaskaden mit einer zentralen Rolle von *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) und *mammalian target of rapamycin* (mTOR) zur Aktivierung der Translation (Banko et al., 2004; Banko, 2006; Darnell et al., 2012). Da LTP und LTD für ihre Aufrechterhaltung letztendlich aber unterschiedliche Proteine benötigen, zeigt sich bezüglich der gen-spezifischen Regulatoren eine deutliche Divergenz (Kelleher et al., 2004; Pfeiffer et al., 2006). Eine zentrale Rolle in der Regulation spezifischer mRNAs spielen dabei mRNA-bindende Proteine (Wells, 2006).

1.3.1 Aktivitätsabhängige Markierung von Synapsen

Ein Neuron in der CA1-Region besitzt durchschnittlich etwa 32.000 Synapsen auf einer Dendritengesamtlänge von durchschnittlich 11,5 mm (Megías et al., 2001). Die langfristige Modifikation ausgewählter Synapsen stellt jedoch einen hoch selektiven Prozess dar, da potenziell jede einzelne Synapse abhängig von ihrer Aktivierung im Sinne von LTP und LTD individuell verändert werden kann (Martin et al., 2002). Es ist daher wichtig, dass neu generierte Genprodukte nicht diffus innerhalb der Dendriten an die postsynaptischen Membranen verteilt werden, sondern spezifisch zu den zuvor aktivierten Synapsen gelangen, um dort im Rahmen der lokalen Proteinbiosynthese für eine Stabilisierung von LTP und LTD Verwendung zu finden. Eine mögliche Erklärung für die gezielte Verteilung wichtiger

Proteine bzw. deren mRNAs liefert die Hypothese der sogenannten synaptischen Markierung (englisch: *synaptic tagging*). Demnach erhält die postsynaptische Seite der aktivierten Synapsen eine spezielle Markierung bzw. ein Etikett (englisch *tag*). Durch dieses Tag ist es möglich, speziell für eine Modifizierung der synaptischen Verbindungen genutzte mRNAs und auch Proteine „einzufangen“ (englisch *capture*) und dort zu verwenden, wo sie aktivitätsabhängig benötigt werden (Martin et al., 2002). Diese Art des Taggings von Synapsen konnte sowohl in der Meereschnecke *Aplysia* (Martin et al., 1997; Casadio et al., 1999) als auch in hippocampalen Neuronen von Ratten (Frey et al., 1997; Frey et al., 1998) nachgewiesen werden.

Auf molekularer Ebene ist die genaue Identität eines solchen synaptischen Etiketts bisher nicht geklärt. Voraussetzungen für ein solches Tag sind ein örtlich und zeitlich sehr begrenztes Auftreten, sowie die Fähigkeit auf zelluläre Ereignisse reagieren bzw. damit interagieren zu können (Martin et al., 2002). Als mögliche Kandidaten kommen spezifische Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen oder die Aktivierung bestimmter Proteinkinasen oder -phosphatasen in Betracht. Aber auch dynamische Veränderungen des Zytoskeletts wie bspw. des Aktinnetzwerkes oder der Mikrotubuli könnten als potenzielle Tags dienen. Andere Möglichkeiten sind bestimmte Adhäsionsmoleküle, Ionenkanäle oder auch lokale Translations- und Degradierungsvorgänge (Martin et al., 2002; Kelleher et al., 2004).

In Zusammenschau mit den vielfältigen molekularen Mechanismen, die an der Ausbildung einer persistierenden LTP bzw. LTD beteiligt sind, ist es unwahrscheinlich, dass es nur eine einzige Art der synaptischen Markierung gibt. Deutlich plausibler erscheint eine komplexe Interaktion aus mehreren Tags, welche durch verschiedene Auslöser und zu verschiedenen Zeitpunkten aktiviert werden. Diese tragen in der Folge zusammen mit den durch sie aktivierten molekularen Vorgängen zur Formation der synaptischen Veränderung und des Gedächtnisses bei (Martin et al., 2002).

1.4 Dendriten und dendritische Dornen

Neuronen bestehen typischerweise aus einem Soma, einem Axon und den Dendriten. Der Dendritenbaum bildet die Afferenzen eines Neurons und

unterscheidet sich morphologisch und funktionell von einem Axon, das die Efferenz einer Nervenzelle darstellt. Die Dendriten der meisten Neuronen zeigen eine Vielzahl von kleinen Protrusionen, die sogenannten dendritischen Dornen (englisch *dendritic spines*). Die dendritischen Dornen bilden die postsynaptische Membran und stellen somit die Haupteingangsebene der synaptischen Übertragung dar (von Bohlen und Halbach, 2009). In der CA1-Region des Hippocampus werden exzitatorische Signale ausschließlich über dendritische Dornen übertragen (Megías et al., 2001). Dendritische Dornen teilen einen grundlegenden Aufbau aus einem Kopf, der die postsynaptische Membran bildet, und einem Hals, der die Verbindung zum Schaft des Dendriten herstellt. Ansonsten zeigt sich eine große Vielfalt bezüglich der Form und Größe einzelner Spines (Peters et al., 1970).

Wichtig für die Struktur und Funktion sowohl der Dendriten als auch der Spines ist das zugrundeliegende Zytoskelett. In den Dendriten regulieren Mikrotubuli zusammen mit mikrotubuli-assoziierten Proteinen (englisch *microtubule-associated proteins*, MAPs) die Ausbildung und Organisation des Dendritenbaumes (Conde et al., 2009). Außerdem dienen sie als Leitschiene für den Transport zwischen Zytosoma und den Synapsen mittels Motorproteinen wie Kinesin und Dynein (Barlan et al., 2017). Aktin dagegen bildet die Hauptkomponente des Zytoskeletts in den Spines (Korobova et al., 2010) und ist neben der strukturellen Organisation und dynamischen Strukturanpassung (Okamoto et al., 2004; Honkura et al., 2008; Hotulainen et al., 2010) auch für die Verankerung von Zellorganellen wie den Membranrezeptoren verantwortlich (Spence et al., 2015).

Die dendritischen Dornen bilden ein eigenes abgeschlossenes physiologisches und biochemisches Kompartiment (Bramham et al., 2007) mit eigenen Zellorganellen wie endoplasmatischem Retikulum und Polyribosomen (Špaček, 1985). Die Membranrezeptoren der postsynaptischen Membran im Kopf der Spines befinden sich innerhalb einer elektronendichten Struktur, der sogenannten *postsynaptic density* (PSD) (Nimchinsky et al., 2002). Ein für die PSD wichtiges Strukturprotein ist *postsynaptic density protein 95* (PSD-95). PSD-95 stellt eine Verbindung zwischen Membranproteinen und Signalmolekülen her und interagiert mit Untereinheiten der glutamatergen spannungsabhängigen Ionenkanäle (Fujita et al., 2000; Kim et al., 2004). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das für

die LTP wichtige Regulatorprotein CaMKII hoch konzentriert auftritt (Jourdain et al., 2003).

Dendritische Dornen sind sehr dynamische und plastische Strukturen, deren Form und Dichte abhängig von der Entwicklung und der Funktion eines Neurons sind. Neu ausgebildete Dendriten haben zu Beginn noch keine Spines. Erst während der Synaptogenese kommt es zu deren Ausbildung (Fiala et al., 2002). Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Spinedichte in der CA1-Region des Hippocampus von Ratten zwischen dem 15. postnatalen Tag und dem Erwachsensein nahezu verdoppelt (Harris et al., 1992). Die Dichte der dendritischen Dornen ist ein Maß für die Konnektivität eines Neurons. Moser et al. konnten nach räumlichem Training eine signifikante Erhöhung der Spinedichte um 9% in Pyramidenzellen der CA1-Region von Ratten nachweisen (Moser et al., 1994). Daher scheinen die dendritischen Dornen eine Rolle im Rahmen des Lernens und auch der Gedächtnisformation zu spielen (Leuner et al., 2003) und sind damit ein wichtiger Bestandteil neuronaler und synaptischer Plastizität (Yuste et al., 2001).

Die Mehrheit der Proteine für sowohl das prä- als auch das postsynaptische Kompartiment wird im Soma der Neuronen synthetisiert und entlang des Zytoskeletts an die Zielorte in den Axonen bzw. Dendriten transportiert (Kennedy et al., 2006). Für die Ausreifung und das Wachstum der dendritischen Dornen sowie für die strukturellen Änderungen im Rahmen von LTP und LTD erscheint jedoch neben dem klassischen Weg die lokale Translation von Proteinen von großer Bedeutung (Ostroff et al., 2002; Bramham et al., 2007), da sie an der individuellen Synapse die Möglichkeit zur aktivitäts-abhängigen Anpassung von Funktion und Morphologie bietet.

1.4.1 Lokale Proteinbiosynthese in den dendritischen Dornen

Cajigas et al. konnten 2550 mRNAs in Dendriten und Axonen nachweisen (Cajigas et al., 2012). Darunter sind Neurontransmitterrezeptoren, Strukturproteine und auch Enzyme für die Signalkaskaden. Viele der Proteine, wie bspw. B-Actin, Arc, MAP2 oder auch CaMKII α , sind für die synaptische Plastizität relevant. Dagegen scheinen sogenannte *housekeeping*-Proteine, die wichtig für die zellulären Elementarfunktionen sind, nicht lokal in den Dendriten und Spines translatiert zu werden (Bramham et al., 2007).

Dass mRNAs vom Soma in die Dendriten und die Axone transportiert werden, konnte vielfach gezeigt werden (Davis et al., 1987; Knowles et al., 1996; Köhrmann et al., 1999; Dyne et al., 2006). Jedoch sind die genauen Mechanismen bisher nur unvollständig verstanden. Eine elementare Rolle in der Regulation des Transports und der lokalen Translation von mRNAs spielen die *mRNA binding proteins* (RBP) (Gallagher et al., 2018). Diese wichtige Rolle der RBPs wird dadurch untermauert, dass es bei Defekten bzw. Mutation innerhalb der Proteine oder auch bei Fehlexpression zu schweren Entwicklungsstörungen bzw. neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen kommt. Dazu gehören unter anderem das Fragile-X-Syndrom, amyotrophe Lateralsklerose und frontotemporale Demenz, spinale Muskelatrophie, aber auch Autismus-Spektrum-Störungen (Tolino et al., 2012). Weitere Informationen dazu finden sich in Abschnitt 4.4.

Nach der Transkription im Nukleus besitzen die reifen mRNAs neben der codierenden Sequenz in den Randbereichen nicht-translatierte Bereiche (englisch *untranslated region*, UTR) mit regulatorischen Elementen (Chatterjee et al., 2012). Der 5'-UTR ist der codierenden Sequenz vorangestellt. Der 3'-UTR folgt auf das Stopcodon (Chatterjee et al., 2012). In neuronaler mRNA befinden sich vor allem im 3'-UTR spezifische Sequenzen, die als Bindungsstelle für die RBPs dienen und wichtig für die Translationskontrolle, die Stabilität und den Transport zur Zielregion sind (Chatterjee et al., 2012; Tolino et al., 2012). Diese cis-wirkenden Elemente werden auch als *localization elements* (LE) oder *zipcodes* bezeichnet und sind in Größe und Struktur sehr heterogen. Sie reichen von kurzen primären RNA-Sequenzen bis zu komplexen Sekundär- oder auch Tertiärstrukturen, auch Kombinationen und Überschneidungen verschiedener LEs sind beschrieben (Gao et al., 2008; Doyle et al., 2011). Zu den wichtigsten RBPs, die an der Translokation von mRNA in die Dendriten beteiligt sind, zählen *zipcode binding protein 1* (ZBP1), *fragile X mental retardation protein* (FMRP), *cytoplasmic polyadenylation element-binding protein* (CPEB), *hnRNP A2 protein* und die Proteine der Staufer-Familie (Doyle et al., 2011). Die einzelnen RBPs binden als transwirkendes Element bereits im Zellkern an bestimmte LEs ihrer Ziel-mRNAs. Es ist bisher nicht vollständig geklärt, ob verschiedene RBPs an die gleichen LEs binden können oder ob diese spezifisch für einzelne RBPs sind. Jedoch konnten in den RBPs spezifische Bindungsdomänen ausgemacht werden, die an LEs mit bestimmten Sequenzen bzw. Strukturen binden. So bindet hnRNP A2 an eine

bestimmte Primärsequenz, die Staufen-Proteine dagegen an Sekundärstrukturen. ZBP1 erkennt sowohl primäre als auch sekundäre Strukturen innerhalb der Ziel-RNA (Stefl et al., 2005; Lunde et al., 2007).

Durch die Bindung der RBPs an die mRNA scheint eine direkte Translation verhindert zu werden (Dahm et al., 2005). So konnten Hüttelmaier et al. zeigen, dass ZBP1 in Neuronen und Fibroblasten ein LE im 3'-UTR der β -Aktin-mRNA bindet und eine Translation unterdrückt, bis die mRNA in der Peripherie der Zelle angekommen ist (Hüttelmaier et al., 2005). Auch hier sind die genauen molekularen Vorgänge nicht vollständig verstanden. Die Initiation der Translation wird in eukaryotischen Zellen durch mindestens 12 verschiedene Initiationsfaktoren (eIF) gesteuert und stellt den wohl wichtigsten Ansatzpunkt zur Translationskontrolle dar (Costa-Mattioli et al., 2009). Daneben konnten in Neuronen zahlreiche microRNAs (kurz miRNA) nachgewiesen werden, die durch direkte Bindung an ihre Ziel-mRNAs an der Translationsregulation beteiligt sind (Kosik, 2006). Die Repression der mRNA-Translation scheint somit aus einem Zusammenspiel aus direkter Bindung der RBPs an die Ziel-mRNAs sowie aus Interaktionen der RBPs mit eIFs und miRNAs zu resultieren (Jung et al., 2006; Filipowicz et al., 2008; Darnell, 2013).

Die stumm geschalteten mRNAs und RBPs bilden zusammen mit noch weiteren Proteinen wie Motorproteinen, Translationsfaktoren und miRNAs sogenannte Ribonukleinprotein-Partikel (englisch *ribonucleinprotein particle*, RNP) (Mallardo et al., 2003; Fatimy et al., 2016; Graeve et al., 2018), die dem Weitertransport der mRNAs unter anderem in die Dendriten dienen. Der Transport erfolgt aktiv unter Energieverbrauch entlang des Zytoskeletts, insbesondere entlang der Mikrotubuli, mithilfe der Motorproteine Kinesin und Dynein (Knowles et al., 1996; Kanai et al., 2004; Kiebler et al., 2006; Darnell et al., 2012). Die Partikel scheinen in ihrer Zusammensetzung sehr heterogen. Einzelne RBPs zeigen dabei eine Assoziation zu bestimmten Gruppen an Proteinen, aber auch zu spezifischen Sets an mRNAs (Fritzsche et al., 2013). Innerhalb der RNPs sind nur sehr wenige Kopien (ca. 1-2) einzelner mRNAs vorhanden (Mikl et al., 2011; Batish et al., 2012). Außerdem scheint die Anzahl an mRNAs in den Partikeln sowohl abhängig von der aktuellen Position innerhalb des Dendriten, mehr mRNAs in

proximalen RNPs und weniger in distalen Partikeln, als auch von der synaptischen Aktivität an den Dendriten (Park et al., 2014).

Der genaue Mechanismus, wie RNPs von den Dendriten in Spines mit aktivierten Synapsen gelangen, ist bisher nicht vollständig verstanden. So könnte das Aktinzytoskelett diesen letzten Schritt der Translokation übernehmen. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass Mikrotubuli aktivitätsabhängig in die Spines einsprossen und so einen Transport bis zum Ziel ermöglichen (Hu et al., 2008; Jaworski et al., 2009). Daneben stellt sich die Frage, wie genau die Auswahl eines spezifischen Transportziels stattfindet, damit die RNPs genau dort ankommen, wo sie im Rahmen der synaptischen Plastizität benötigt werden.

Einen Erklärungsversuch hierfür bietet das sogenannte *sushi-belt*-Modell. Grundannahme dieses Modells ist, dass sich spezifische mRNAs oder auch Gruppen von mRNAs in unterschiedlichen RNPs mit jeweils bestimmten RBPs befinden (Mikl et al., 2011). Zusätzlich müssen aktivierte Synapsen, die zur Konsolidierung mRNAs benötigen, als solche erkennbar sein. Dafür erscheinen die Mechanismen der in Abschnitt 1.3.1 beschriebenen synaptischen Markierung von Bedeutung. Anstatt einer Ablagerung der RNPs an einem vordefinierten Zielort postuliert das Modell einen bidirektionalen Transport der RNPs entlang der Dendriten, ähnlich wie auf einem Förderband in einem Sushi-Restaurant (Doyle et al., 2011). An als aktiviert gekennzeichneten Spines bzw. Synapsen könnten dann spezifische, dort im Rahmen von LTP bzw. LTD benötigte mRNAs für die lokale Translation entpackt werden (Hutten et al., 2014). Das zuvor beschriebene Einsprossen von Mikrotubuli in aktivierte Spines könnte in diesem Zusammenhang entweder als eine Art der Markierung verstanden werden oder auch als eine erste Reaktion auf diese.

Das Entpacken von mRNAs aus den RNPs im Rahmen der LTP kann durch Phosphorylierung der RBPs erreicht werden. Dadurch kommt es zur Dissoziation von RBP und mRNA und nachfolgend zur lokalen Initiierung der Translation (Fernández-Moya et al., 2014; Yoon et al., 2016; Rangaraju et al., 2017). Aber auch im Rahmen der LTD kommt es zu Veränderung in der Proteinexpression und damit zur Notwendigkeit der lokalen Proteinsynthese (Huber et al., 2000). Lebeau et al. konnten zeigen, dass für die verschiedenen Arten von synaptischer Plastizität unterschiedliche RBPs wichtige Regulatoren darstellen (Lebeau et al.,

2011b; Lebeau et al., 2011a). LTP und LTD führen über unterschiedliche Signalkaskaden zu den jeweiligen strukturellen Veränderungen an der Synapse. Neben der Regulierung durch die RBPs spielen weitere Signalkaskaden eine wichtige Rolle. Wie bereits in Abschnitt 1.3 besprochen konvergieren diese Signalwege am Ende (Pfeiffer et al., 2006). Nach der Stimulierung von sowohl NMDA-Rezeptoren als auch von mGlu-Rezeptoren kommt es über verschiedene Zwischenkaskaden zur Aktivierung von ERK. ERK wiederum aktiviert durch Phosphorylierung *MAP kinase-interacting kinase* (Mnk), was zur Phosphorylierung und Aktivierung des eIF4E führt (Banko et al., 2004; Banko, 2006). eIF4E ist der am geringsten exprimierte Initiationsfaktor und damit geschwindigkeitsbestimmend für die Translation. Seine Regulation ist daher Angriffspunkt wichtiger Signalkaskaden. Zusammen mit eIF4G und eIF4A bildet eIF4E den eIF4F, der an den 5'-UTR der mRNA bindet und im Folgendem die Bindung der ribosomalen Untereinheiten an die mRNA ermöglicht (Gingras et al., 1999). Die Bildung des eIF4F-Komplexes wird durch eIF4E binding proteins (4E-BPs) verhindert, da diese mit eIF4G um die Bindungsstelle an eIF4E konkurrieren (Pause et al., 1994; Mader et al., 1995). 4E-BPs mit geringer Phosphorylierung binden dabei mit einer sehr hohen Affinität an eIF4E und unterdrücken so die Translation. Dagegen führt die Phosphorylierung von 4E-BPs zu einer Dissoziation von eIF4E, das dann zur Bildung des eIF4F-Komplexes bereit steht (Gingras et al., 1999). Die Phosphorylierung der 4E-BPs wird hauptsächlich durch die Kinase mTOR kontrolliert, die damit eine zentrale Rolle bei der Regulation der Translationsinitiation einnimmt. Daneben scheint mTOR über die Aktivierung des Elongationsfaktors eEF2K an der Elongationskontrolle beteiligt zu sein (Darnell et al., 2012).

Zusammenfassend stellt die lokale Proteinbiosynthese in den Dendriten einen komplex regulierten Vorgang dar, der vor allem im Zusammenhang mit den intermediären und späten Phasen sowohl der LTP als auch der LTD steht. Eine zentrale Rolle dabei spielen die RBPs, die ihre Ziel-mRNAs vom Zellkern bis in die Spines begleiten und neben dem Transport auch die Translation der mRNAs regulieren.

1.5 Staufen

Staufen-Proteine bilden eine Familie bestehend aus RNA-bindenden Proteinen, die über verschiedene Spezies, wie *Drosophila*, *Xenopus*, *Aplysia*, Zebrafische und auch Säugetiere wie Mäuse, Ratten und Schweine, hinweg eine Funktion bei der Lokalisation von mRNAs aufweisen (St Johnston et al., 1991; Allison et al., 2004; Brevini et al., 2007; Calder et al., 2007). Die erste Beschreibung von Staufenf (Stau) erfolgte im Rahmen der embryonalen Entwicklung von Oozyten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (St Johnston et al., 1991). Stau bindet dabei doppelsträngige sekundäre RNA-Strukturen, die entweder intramolekular innerhalb einer mRNA oder intermolekular zwischen zwei mRNA-Strängen entstehen können. Diese sogenannten *Stau-recognised structures* (SRS) befinden sich vor allem in der 3'-UTR der Ziel-RNAs (Heraud-Farlow et al., 2013; Laver et al., 2013).

In Säugetieren finden sich zwei homologe Formen des Proteins, die als Staufen1 (Stau1) und Staufen2 (Stau2) bezeichnet werden. Beide Proteine teilen nahezu 60% ihrer Gensequenz und sind als RNA-bindende Proteine am mikrotubuli-assoziierten Transport von mRNAs und an deren Translationskontrolle beteiligt (Buchner et al., 1999; Kiebler et al., 1999; Wickham et al., 1999). Stau1 wird ubiquitär exprimiert, wohingegen Stau2 vor allem im Gehirn exprimiert wird (Marión et al., 1999; Monshausen et al., 2001; Duchaîne et al., 2002). Weitere Unterschiede zeigen sich im Bereich der RNA-Bindungsstellen. Stau2 weist, wie auch das Staufen-Protein der *Drosophila*, vier solcher Bindungsstellen auf, Stau1 dagegen nur drei. Zusätzlich besitzen alle Formen eine spezielle Tubulin-Bindungsstelle (Roegiers et al., 2000; Park et al., 2013b).

Bezüglich der Funktion der Staufen-Proteine lässt sich eine Beteiligung in drei verschiedenen Bereichen innerhalb der Entwicklung eines Organismus nachweisen: (1) in der embryonalen Entwicklung, (2) der Neurogenese und (3) in der synaptischen Plastizität (Heraud-Farlow et al., 2014).

1.5.1 Staufen in der embryonalen Entwicklung

Staufen ist zusammen mit einer Reihe anderer Hilfsproteine an der Lokalisierung der mRNAs innerhalb der Oozyten von *Drosophila melanogaster* beteiligt und damit wichtig für die regelrechte Ausbildung der Polarität innerhalb der Eizellen

(Schüpbach et al., 1986; Berleth et al., 1988; Kim-Ha et al., 1991). Staufen ist sowohl zusammen mit der bicoid-mRNA am Vorderpol der Oozyte als auch in Kolokalisation mit der oskar-mRNA am posteriorem Pol nachweisbar.

Die unterschiedliche Verteilung von mRNAs innerhalb einer Zelle und die damit entstehenden Gradienten stellen einen weit verbreiteten Mechanismus dar, um innerhalb von Zellen speziell in Oozyten oder auch Neuronen eine Polarität herzustellen. So kann hierdurch bspw. die anteriore und posteriore Seite einer Eizelle definiert werden (Gavis, 1997; Schnapp, 1999). In den Oozyten der *Drosophila melanogaster* entsteht ein solcher anterior-posteriorer Gradient dadurch, dass bicoid-mRNA bereits sehr früh in der Oogenese am anterioren Pol der Zelle gebündelt wird. Nach Befruchtung der Eizelle erfolgt die lokale Translation und die Ausbildung eines Verteilungsgradienten des bicoid-Proteins, der wichtig für die regelrechte Entwicklung des Kopfes und des Thorax ist (Berleth et al., 1988; Driever et al., 1988). So konnten Driever et al. zeigen, dass eine Injektion von bicoid an anderen Stellen innerhalb der Eizelle zur Ausbildung von ektopen Kopf- und Thoraxstrukturen führt (Driever et al., 1988). Am posterioren Pol der Oozyten dagegen ist die Lokalisation von oskar mRNA grundlegend für die weitere Anordnung von Proteinen wie nanos und die nachfolgend achsengerechte Entwicklung dieser Region mit Ausbildung des Abdomens und der Keimbahn (Kim-Ha et al., 1991).

1.5.2 Staufen in der Neurogenese

Die Neurogenese beschreibt die Entwicklungen von Nervenzellen aus den neuronalen Stammzellen, den sogenannten Neuroblasten und beruht auf einer asymmetrischen Zellteilung dieser Neuroblasten. Im Gegensatz zur normalen Mitose, bei der zwei gleiche Tochterzellen entstehen, hat eine asymmetrische Teilung zwei verschiedene Zellen mit jeweils unterschiedlichem weiterem Entwicklungspfad zum Ergebnis (Knoblich, 2008).

Die Neuroblasten der Fruchtfliege teilen sich in eine große Tochterzelle, die als Neuroblast verbleibt, und in eine kleinere Ganglionmutterzelle (englisch *ganglion mother cell*, kurz GMC). Die GMC vollführt eine weitere Teilung, aus der zwei Neuronen oder Gliazellen hervorgehen (Homem et al., 2012). Der erste asymmetrische Teilungsschritt erfolgt ähnlich wie in der oben beschrieben

Embryogenese auf der Basis einer unterschiedlichen Distribution von Proteinen und deren mRNAs innerhalb der Neuroblasten.

Ein wichtiger Regulator in der Entwicklung der GMC ist der Transkriptionsfaktor prospero (pros). Während der Mitose eines Neuroblasten akkumuliert pros-mRNA am basalen Pol, aus dem die GMC hervorgeht (Broadus et al., 1998). In der GMC selbst wird keine pros-mRNA transkribiert. Es erfolgt jedoch die Translation der aus dem Neuroblasten stammenden mRNA. In der Folge reguliert pros die Genexpression der GMC im Nucleus und bestimmt deren Differenzierung mit (Doe et al., 1991; Vaessin et al., 1991). Es kommt zur Repression von Genen, die wichtig für die Stammzellfunktionen und die Selbsterneuerung sind. Eine Mutation von pros in GMCs führt dazu, dass sich die Zellen wieder in Neuroblasten zurück transformieren (Choksi et al., 2006).

Ein weiteres wichtiges Regulatorprotein ist brat. Im Zusammenspiel mit pros leitet es ebenfalls die Differenzierung der GMC ein. Es wird angenommen, dass brat dabei einen aktivierenden Transkriptionsfaktor von pros darstellt, da eine Mutation von brat zu einer Proliferation von pros-negativen Stammzellen führt mit der Entstehung von neuronalen Stammzelltumoren. Eine zusätzliche Überexpression von pros kann die Tumorbildung unterbinden und eine regelrechte Differenzierung der Stammzellen wiederherstellen (Bello et al., 2006; Lee et al., 2006). Mutationen beider Proteine führen zu einem nahezu vollständigen Verlust aller GMCs (Betschinger et al., 2006).

Wie pros zeigt auch Stau eine asymmetrische Verteilung innerhalb der Neuroblasten der Drosophila mit Akkumulation am basalen Pol der Zellen zu Beginn der Mitose. Wie in den Oozyten ist Stau in den Neuroblasten an der Ausbildung einer Polarität im Sinne der Lokalisierung von pros am basalem Zellpol beteiligt (Broadus et al., 1997; Broadus et al., 1998). Dazu bindet Stau die pros-mRNA im Bereich der 3'-UTR und kann diese so zusammen mit dem Adaptorprotein Miranda innerhalb des Neuroblasten verteilen (Schuldt et al., 1998). Miranda bindet zusätzlich pros- und auch brat-Proteine, sodass über die Interaktion von Stau und Miranda ein wichtiger Proteinkomplex für die Differenzierung eines Neuroblasten hin zur GMC entsteht (Schuldt et al., 1998; Jia et al., 2015).

1.5.3 Stauen und neuronale Plastizität

Die elementare Bedeutung von RNPs für die synaptische Plastizität wurde bereits in Abschnitt 1.4.1 erläutert. In der *Drosophila* konnte eine Beteiligung von Stauen an der Entstehung des Langzeitgedächtnisses und der damit verbundenen Aktivierung der Genexpression nachgewiesen werden. So kann die Ausbildung des Gedächtnisses nach erfolgtem Training durch das Ausschalten einer temperatursensitiven Stau-Mutante unterbunden werden (Dubnau et al., 2003). Außerdem konnten Bolduc et al. eine Verbindung zwischen Stau und FMRP nachweisen, einem weiteren RBP mit ebenfalls wichtigen Funktionen im Rahmen von mRNA-Transport und Translationskontrolle an den Synapsen (Bolduc et al., 2008; Dichtenberg et al., 2008).

Für Stau2 sind ca. 1200 assoziierte mRNAs in unterschiedlichen Studien beschrieben (Furic et al., 2007; Maher-Laporte et al., 2010). Allerdings zeigt sich bei nur 38 mRNAs ein verändertes Expressionslevel nach Herunterregulation von Stau2 in Zellkulturen. Bei diesen 38 mRNAs handelt es sich vorrangig um Proteine, die im Bereich der Synapse benötigt werden (Heraud-Farlow et al., 2013), wie β -Aktin und MAP1B, was für eine Rolle von Stau2 bei der dendritischen Lokalisierung seiner Ziel-mRNAs spricht. Dazu passend zeigt sich in Stau2-negativen Neuronen eine um 40% reduzierte mRNA-Menge in den Dendriten bei gleichzeitig vermehrter mRNA-Anzahl im Soma (Tang et al., 2001). Von den 38 mRNAs sind 32 bei fehlendem Stau2 ebenfalls reduziert. Dies deutet auf eine vorrangig stabilisierende Wirkung von Stau2 auf seine Zielstrukturen hin (Heraud-Farlow et al., 2013). Im Gegensatz zu Stau1 zeigt sich eine Assoziation von Stau2 mit der LTD und deren Regulation (Lebeau et al., 2011b).

1.6 Fragestellung und Arbeitshypothese

Berger et al. haben ein Tiermodell mit der Möglichkeit eines konditionalen Knock-downs von Stauen2 im Gehirn von Ratten generiert. Durch die intravenöse Injektion von Tamoxifen wird die Expression von Stau2 herabreguliert (Berger et al., 2017). Damit erscheint es möglich die Funktionen von Stau2 nach Beendigung der Neurogenese im normal entwickelten adulten Tier und im Rahmen von Lernprozessen zu studieren.

Aus den hier bisher dargelegten Informationen und Studien ergibt sich die Hypothese, dass sich ein Knockdown von Stau2 zu morphologischen Veränderungen an den Dendriten und insbesondere an den dendritischen Dornen führt. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Auswirkungen eines Knockdowns von Stau2 auf die Morphologie von Neuronen des Hippocampus in Rattengehirnen genauer zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gelatine	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
GolgiStain Kit	FD NeuroTechnologies Inc., Columbia, USA
Merckoglas	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland

2.1.3 Laborgeräte und Software

AxioVision, Version 4.8.1	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Oberkochen, Deutschland
Prism, Version 7.0a	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
ImageJ 1.51n	National Institutes of Health, USA
Leica VT1000S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Excel, Version 15.39	Microsoft Corporation, Redmond, USA

NeuroExplorer, Version 9.12	MBF Biosciences, Williston, USA
NeuroLucida, Version 9.12	MBF Biosciences, Williston, USA
Sketch, Version 68	Bohemian B.V., Den Haag, Niederlande
Zeiss AxioCam HR3	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Oberkochen, Deutschland
Zeiss AxioPlan 2 Mikroskop	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Oberkochen, Deutschland

2.1.4 Versuchstiere

Die Versuche wurden an transgenen Ratten mit einem konditionalen Knockdown des *Stau2*-Gens durchgeführt. Das Tiermodell wurde von Berger et al. am Zentralinstitut für Seelische Gesundheit in Mannheim entwickelt (Berger et al., 2017) auf Grundlage der Arbeiten von Schönig et al., 2012.

Die Basis des Knockdowns bildet ein sogenannter RNA-Interferenz-Mechanismus, kurz RNAi, mit dem die Expression von *Stau2* zielgerichtet stillgelegt bzw. signifikant reduziert wird. Es erfolgt dabei eine posttranskriptionale Kontrolle der Genexpression durch sogenannte microRNAs, kurze nicht-kodierende doppelsträngige RNA-Moleküle. Zusammen mit Proteinen der Argonautfamilie bilden diese miRNAs einen *RNA-induced silencing complex* (RISC). Nach der Transkription können mRNAs an einen RISC mit komplementärer miRNA gebunden werden. Bei niedriger Komplementarität erfolgt eine Inhibition der weiteren Translation der mRNA, dagegen wird die mRNA bei hoher Komplementarität direkt gespalten und abgebaut (Wienholds et al., 2005).

Zur zeitlichen und örtlichen Kontrolle der Expression der miRNA gegen *Staufen2* (miR(*Stau2*)) wurde der RNAi-Mechanismus mit dem sogenannten Cre/loxP-System kombiniert. Es wurde in Bakteriophagen entdeckt und dient dem gezielten Entfernen oder der Inversion von markierten DNA-Sequenzen (Sauer et al., 1988). Bei Cre handelt es sich um eine Rekombinase, die DNA spaltet und neu verknüpft. Als Markierungen dienen jeweils zwei loxP-Sequenzen, die Anfang und Ende des zu verändernden Bereichs kennzeichnen. So ist es möglich bestimmte DNA-Abschnitte gezielt zu entfernen bzw. zu verändern (Lewandoski, 2001).

Um die Expression der Zielgene zeitlich steuern zu können, erfolgte eine Fusion der Cre-Rekombinase mit einer mutierten Form des humanen Östrogenrezeptors. Das Fusionsprotein wird CreERT2 genannt. Durch die Fusion befindet sich CreERT2 im Cytosol (Feil et al., 1997). Erst durch Injektionen von Tamoxifen und Bindung an den Östrogenrezeptor erfolgt die Translokation in den Zellkern und ermöglichen so die Rekombinationsvorgänge an den Zielgenen.

Daneben erfolgte außerdem die örtliche Expressionskontrolle mittels eines CaMKII α -Promotors, der die Cre-Expression auf das Vorderhirn, insbesondere den Hippocampus, den Kortex und den Riechkolben, beschränkt. Um ein möglichst hohes Ansprechen von Cre auf das Zielgen zu erreichen, sollte dieses im Gegensatz zu Cre selbst möglichst ubiquitär exprimiert werden. Deshalb wurde ein *chicken- β -action*-Promotor (CAG) verwendet, der in Nagetieren eine relativ konstante Aktivität in vielen Geweben aufweist (Schönig et al., 2012). Im Grundzustand folgt dem Promotor ein durch loxP-Sequenzen flankierter offener Leserahmen (ORF, englisch *open reading frame*) mit einem Stoppcodon und einem Poly(A)-Schwanz. Im dahinter liegendem nicht abgelesenen Bereich liegt die miR(Stau2) und ein Gen für ein grün fluoreszierendes Protein (EGFP, englisch *enhanced green fluorescent protein*). Nach Aktivierung der Cre-Rekombinase erfolgt die Entfernung des ORFs und damit eine Verschiebung des Leserahmens, sodass nun die miR(Stau2) und EGFP translatiert werden können (Berger et al., 2017). Abbildung 6 fasst den konditionalen Knockdown von Stau2 zusammen.

Innerhalb des Hippocampus zeigte sich die höchste Konzentration an miR(Stau2) innerhalb der CA1-Region. Passend dazu zeigte sich hier auch die höchste Expression von EGFP in etwa 54% der Neuronen (Berger et al., 2017). Daher erfolgten die weiteren und im Folgendem beschriebenen morphologischen Analysen der Dendriten und Spines an Pyramidenzellen sowohl im basalem *Stratum oriens* (CA1b) als auch im apikalem *Stratum radiatum-lacunosum-moleculare* (CA1a) der CA1-Region.

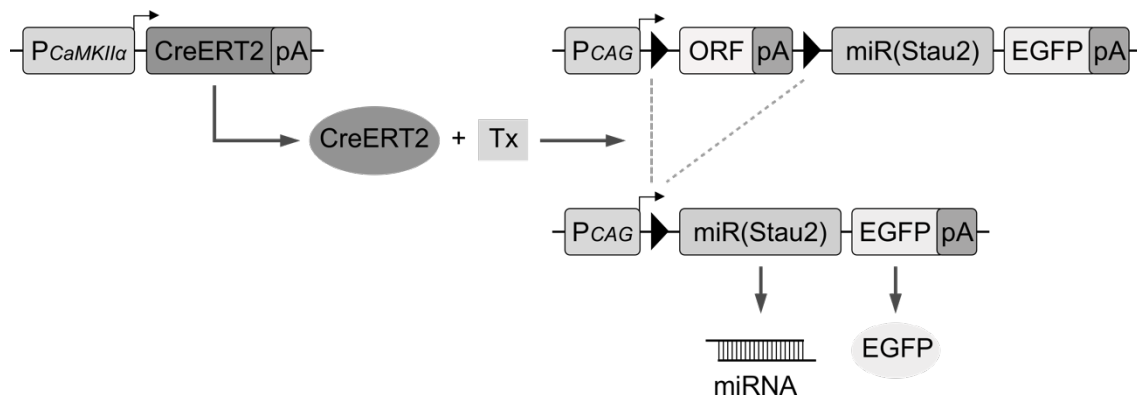


Abbildung 6: Schematische Darstellung des *Stau2*-Knockdowns. Die Expression der Cre-Rekombinase wird mittels eines $CaMKII\alpha$ -Promotors ($P_{CaMKII\alpha}$) auf das Vorderhirn beschränkt. Durch die Gabe von Tamoxifen (Tx) erfolgt aufgrund der Fusion von Cre mit einem mutierten humanen Östrogenrezeptor (ERT2) die Translokation in den Zellkern. Dort kommt es durch Deletion eines durch loxP-Sequenzen (►) markierten offenen Leserasters (ORF) zu einer Verschiebung des Leserasters und somit zur Expression einer gegen *Stau2* gerichteten miRNA (miR(*Stau2*)) und von EGFP. Der CAG-Promotor (P_{CAG}) sorgt für eine ubiquitäre Expression des Zielgens mit miR(*Stau2*) und EGFP. Modifiziert nach Berger et al., 2017.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebeaufbereitung

Die Tiere wurden mit einer Überdosis Ether euthanasiert. Nach einer transkardialen Perfusion über den linken Ventrikel mit phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) zur möglichst vollständigen Entfernung von Blut aus dem Gefäßsystem wurde das Gehirn frei präpariert. Die Freilegung des Gehirns erfolgte dabei durch Eröffnung des *Foramen magnum* und einem Schnitt entlang der Koronarnaht. Nach der Abtrennung der Hirnnerven wurde das Gehirn zur weiteren Fixierung für mindestens zwei Tage in 4% Paraformaldehydlösung (PFA) in PBS bei 4°C eingebracht.

2.2.2 Golgi-Färbung

Die Darstellung der Dendriten und der dendritischen Dornen erfolgte mittels Golgi-Cox-Imprägnierung. Das Verfahren stellt eine Modifikation der originalen von Golgi erstmals beschriebenen Färbemethode dar und beruht darauf, dass das Nervengewebe in einem ersten Schritt über mehrere Wochen in einer Kaliumdichromatlösung ausgehärtet wird und danach eine Imprägnierung mit Quecksilbernitrat über einige Tage erfolgt. Golgi verwendete in seinen Arbeiten Silber-

anstatt von Quecksilbernitrat (Levine et al., 2013). Durch dieses Färbeverfahren wird nur ein sehr geringer Anteil der vorhandenen Nervenzellen angefärbt, der Prozentsatz variiert zwischen unterschiedlichen Autoren und liegt etwa zwischen 1-5% (Koyama, 2013; Levine et al., 2013).

Für die Golgi-Cox-Imprägnierung wurde das GolgiStain Kit von FD Neuro Technologies verwendet. Die bereitgestellten Lösungen und das Färbeprotokoll des GolgiStain Kits basieren auf den Arbeiten von Ramón-Moliner (Ramón-Moliner, 1970) sowie Glaser und Van der Loos (Glaser et al., 1981).

Es wurden jeweils die linken Hemisphären nach folgendem Schema in die im GolgiStain Kit enthaltenen Lösungen gegeben:

1. Waschen der Hemisphäre mit A. dest.
2. Je 4,5 ml Lösung A und B für zwei Wochen bei Raumtemperatur im Dunkeln. Es erfolgte ein Lösungswechsel nach 24 Stunden.
3. Lösung C für eine Woche im Dunkeln bei 4°C. Auch hier erfolgte nach 24 Stunden ein Lösungswechsel.

Nach der Imprägnierung erfolgte das Schneiden der Hemisphären in 120 µm dicke koronare Schnitte mit einem Vibratom (Leica VT1000 S) in Lösung C. Jeweils vier Schnitte wurden mit einem Glasspatel auf gelatinisierte Objektträger übertragen und bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

Der eigentliche Färbeprozess begann mit der Waschung der Schnitte für dreimal 5 Minuten mit A. dest. zur Oxidation der eingelagerten Quecksilberionen wurden die Objektträger nachfolgend mit jeweils 1ml Mixtlösung, bestehend aus Lösung D und E des GolgiStain Kits und A. dest im Verhältnis 1:1:2 für 10 Minuten inkubiert. Danach erfolgten vier weitere Waschschrte mit A. dest. für jeweils 5 Minuten. Zur Dehydrierung der Schnitte kam für jeweils 4 Minuten eine aufsteigende Alkoholreihe mit 50, 70, 96 und 100% Ethanol zum Einsatz. Der Waschgang mit 100% Ethanol wurde viermal wiederholt. Vor dem Eindecken der Objektträger mit Merckoglas erfolgten drei Waschgänge mit Xylol für ebenfalls 4 Minuten. Die Schnitte wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.2.3 Sholl-Analyse

Zur morphologischen Beurteilung der Neuronen in der CA1-Region wurde die sogenannte Sholl-Analyse verwendet. Das Verfahren wurde erstmals 1953 von Sholl beschrieben, um den Aufbau von Dendriten im visuellen und motorischen Kortex von Katzen zu vergleichen. Um das Soma eines Neurons werden dabei konzentrisch Kreise mit einem stufenweisen zunehmenden Radius gezogen. Ausgewertet werden dann die Schnittpunkte von Dendriten mit den Kreisen, sowie Aufzweigungen und Endigungen (Sholl, 1953).

Es wurden Neuronen ausgewählt, die samt ihrer Dendriten vollständig abgrenzbar und gleichmäßig angefärbt waren. Mithilfe der Software AxioVision wurde bei 40-facher Vergrößerung an einem Zeiss AxioPlan 2 Mikroskop ein Bildstapel über die vollständige Tiefenausdehnung des Neurons mit einem Bildabstand von zwei Mikrometern mittels einer AxioCam HR 3 angefertigt. Die Bildstapel wurden in NeuroLucida geladen und die Neuronen dreidimensional rekonstruiert. Der Datensatz wurde gespeichert und zur weiteren Auswertung in den NeuroExplorer geladen. Als initialer Radius für den zentralen Kreis um das Soma wurden 25 Mikrometer festgelegt. Für die weiteren Umkreise wurden die Radien um jeweils 10 Mikrometer erhöht. Es folgte die automatische Berechnung der dendritischen Aufzweigungen, der Schnittpunkte mit den Umkreisen, der Endigungen der Dendriten sowie der aufsummierten Gesamtlänge aller Dendriten des Neurons. Die Ergebnisse wurden in eine Excel-Tabelle exportiert. Abbildung 7 verdeutlicht die Vorgänge der Sholl-Analyse beispielhaft.

Als Maß für die Verzweigung der Dendriten eines Neurons wurde zusätzlich der sogenannte *Branching Index* (BI) bestimmt. Der BI vergleicht die Anzahl an Schnittpunkten benachbarter Kreise und berechnet sich nach folgender Formel:

$$BI = \sum (Schnittpunkte Kreis_n - Schnittpunkte Kreis_{n-1})$$

Bei einem Neuron ohne dendritische Aufzweigungen ist der BI gleich 0. Der BI ist umso höher je mehr Aufzweigungen ein Neuron besitzt und je weiter entfernt die Aufzweigungen vom Soma des Neurons auftreten (Garcia-Segura et al., 2014).

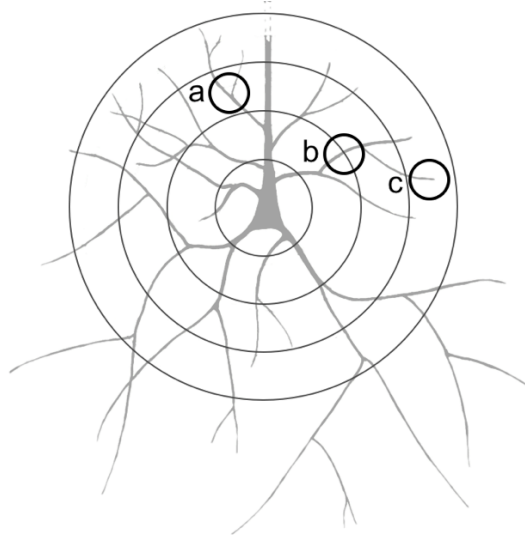


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Sholl-Analyse. Der zentrale Kreis um das Soma besitzt einen Radius von $25\ \mu\text{m}$, bei allen weiteren Kreisen erhöht sich der Radius um jeweils $10\ \mu\text{m}$. Ausgewertet wurden dann dendritische Aufzweigungen (a), Schnittpunkte mit den Umkreisen (b) und Endigungen der Dendriten (c) als Maßzahlen für die Morphologie und das Verzweigungsmuster eines Neurons. Modifiziert nach Sholl, 1953.

Es wurden pro Hemisphäre 10 Neurone im apikalen und basalen Bereich der CA1-Region zufällig über die gesamte sagittale Ausdehnung der CA1-Region ausgewählt. Pro Gehirn wurde aus den 10 Einzelwerten für jeden Parameter ein Mittelwert bestimmt.

2.2.4 Dendritenanalyse

Die Untersuchungen erfolgten an Hirnschnitten, die zuvor mittels Golgifärbung behandelt wurden. Es wurden nur durchgängig angefärbte Dendriten ausgewählt, die allseits von anderen Neuronen oder Artefakten abgrenzbar waren. Des Weiteren wurden nur Dendriten ohne Aufzweigungen über eine Länge von mindestens $40\ \mu\text{m}$ untersucht. Es erfolgte die dreidimensionale Rekonstruktion der Dendriten und der zugehörigen Spines mithilfe von Liveaufnahmen in NeuroLucida. Die Bilder wurden mit einer Zeiss AxioCam HR3 bei 100-facher Vergrößerung mit Ölimmersion (Numerische Apertur: 1,4) an einem Zeiss AxioPlan 2 Mikroskop aufgenommen. Die gewonnenen Datensätze wurden gespeichert. Die Auswertung mit Berechnung der Dendritenlänge sowie Anzahl, Länge und Dichte der Spines (Anzahl an Spines pro Mikrometer Dendrit) erfolgte mittels NeuroExplorer (von Bohlen und Halbach et al., 2006). Die Ergebnisse wurden als Excel-Tabelle exportiert.

Pro untersuchter Hirnhemisphäre wurden 30 Dendriten sowohl in der CA1a- als auch in der CA1b-Region untersucht. Die Auswahl erfolgte zufällig nach oben beschriebenen Kriterien gleichmäßig verteilt über die gesamte sagittale Ausdehnung der CA1-Region. Die Dendritenlänge und die Anzahl und Dichte der Spines pro Dendriten wurde für jede Hemisphäre gemittelt. Für die mittlere Spinelänge wurde der Durchschnittswert aller Spines pro Dendriten gebildet und dann, gewichtet nach der Anzahl der Spines des jeweiligen Dendriten, für jede untersuchte Hemispäre gemittelt. Zur statistischen Auswertung wurden aus den so gewonnenen Werten in der Kontroll- und Stau2^{KD}-Gruppe wiederum die Mittelwerte gebildet.

Als Limitation gilt zu beachten, dass die gewählte Methode zur Bestimmung der Spinedichte den wahren Dichtewert unterschätzt. Spines, die sich senkrecht zur Koronarebene des Dendriten nach oben oder unten erstrecken, konnten nicht erfasst werden, sodass der wahre Dichtewert höher liegen muss. Einen Überblick diesbezüglich liefert Leuner et al., 2003.

2.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der Software Prism (GraphPad Software Inc., USA) vorgenommen. Der Vergleich fand zwischen einer Stau2^{KD}-Gruppe und einer Kontrollgruppe mit normaler Stau2-Expression statt. Statistische Vergleiche erfolgten mittels Students-t-Tests. Zur statistischen Analyse der Häufigkeiten der Dendritenlängen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) eingesetzt. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt. Wenn nicht anders angegeben werden die Daten als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben.

3 Ergebnisse

Nachfolgend werden die im Rahmen dieser Arbeit selbst erhobenen Ergebnisse vorgestellt. Primärer Gegenstand der Untersuchungen war die CA1-Region des Hippocampus. Dabei wurde weiter unterteilt in Neuronen und Dendriten im Bereich des basalen *Stratum oriens* (CA1b) und des apikalen *Stratum radiatum-lacunosum-moleculare* (CA1a). Soweit nicht anders angegeben erfolgt ein Vergleich zwischen Tieren mit einem Knockdown für Stau2 (Stau2^{KD}) und Kontrolltieren mit normaler Stau2-Synthese (Kontrolle). Dabei gilt bei Prozentwerten die Kontrollgruppe als Bezugsgröße.

3.1 Morphologie der Neuronen in CA1

Mithilfe einer Shollanalyse wurde die Morphologie der Neuronen in der apikalen und basalen CA1-Region untersucht. Insgesamt wurden sieben Tiere analysiert. Vier Tiere stammten aus der Gruppe Stau2^{KD}-Tiere und dazu drei Kontrolltiere. Tabelle 1 zeigt die erhobenen Mittelwerte mit den zugehörigen Standardfehlern unterteilt nach apikaler und basaler CA1-Region.

	CA1 apikal		CA1 basal	
	Stau2 ^{KD} (n = 4)	Kontrolle (n = 3)	Stau2 ^{KD} (n = 4)	Kontrolle (n = 3)
Mittelwert ± Standardfehler				
Gesamtlänge in µm	1.212 ± 188	1.027 ± 141	709,5 ± 90,4	841,2 ± 105
Schnittpunkte	96,8 ± 14,7	81,3 ± 11,4	54,5 ± 7,0	63,3 ± 7,5
Aufzweigungen	9,5 ± 1,4	10,3 ± 0,7	10,7 ± 1,2	12,3 ± 1,8
Endigungen	18,6 ± 1,6	19,6 ± 1,3	14,8 ± 1,3	17,5 ± 1,8
Branching Index (BI)	34,5 ± 5,0	24,9 ± 3,2	18,3 ± 1,8	24,4 ± 3,9

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardfehler der Sholl-Analyse zur Beurteilung der Morphologie der Neuronen in CA1 bei Knockdowntieren (Stau2^{KD}) und Kontrollen.

Für die apikale CA1-Region zeigte sich in der Stau2^{KD}-Gruppe eine um 18% erhöhte Gesamtlänge aller Dendriten in den untersuchten Neuronen. Auch die Anzahl der Schnittpunkte mit den Radien als Ausdruck der Verzweigungen lag mit einem Zuwachs von 19% höher als in der Kontrollgruppe. Dagegen waren die

durchschnittliche Anzahl an dendritischen Aufzweigungen und Endigungen in den Knockdowntieren um 7,8% bzw. 5,1% erniedrigt. In den Vergleichen zwischen Stau2^{KD} und Kontrollgruppe zeigten sich für alle fünf Parameter keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen (p-Werte zwischen 0,1 und 0,33) in CA1a. Abbildung 8a-d zeigt eine Zusammenfassung der Daten.

Vergleicht man Gesamtlänge, Schnittpunkte, Aufzweigungen und Endigungen zwischen Kontrollgruppe und Stau2^{KD}-Tieren gruppiert nach der Entfernung vom Neurosom entsprechend den festgelegten Radien in Schritten von 10 µm, so zeigte sich in einer einzigen Gruppe der Aufzweigungen ein signifikanter Unterschied (p-Wert < 0,0001). Insgesamt war aber keine eindeutige Tendenz zu einer Zunahme oder Abnahme der Werte im Vergleich der Gruppen abgrenzbar. Für die Gesamtlänge, Schnittpunkte und Endigungen lagen die Maximalwerte jeweils im Bereich eines Radius von 45 µm (Abbildung 8e-h).

In der basalen CA1-Region zeigte sich in der Stau2^{KD}-Gruppe eine Abnahme aller vier Messwerte. Die durchschnittliche Dendritenlänge war um 15,7% reduziert. Die Anzahl der Schnittpunkte mit den Radien, die Aufzweigungen der Dendriten sowie die Endungen zeigten sich im Vergleich der Kontrollgruppe um 13,9%, 13% bzw. 15,4% erniedrigt. Die einzelnen Mittelwerte lassen sich Tabelle 1 entnehmen. Insgesamt waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen allerdings auch hier nicht statistisch signifikant (p-Werte zwischen 0,09 und 0,23). Abbildung 9a-d zeigt den grafischen Vergleich zwischen Stau2^{KD} und Kontrollgruppe für CA1b.

Werden die untersuchten Parameter wiederum nach ihrem Abstand vom Neurosom gruppiert, zeigten sich ähnlich wie in CA1a nur einzelne statistisch signifikante Unterschiede in jeweils einer Gruppe der Aufzweigungen und der Endigungen (p-Werte 0,01 und 0,02). Für die Gesamtdendritenlänge und die Endigungen lag der Maximalwert wiederum im Bereich eines Radius von 45 µm, für die Aufzweigungen etwas höher im Bereich von 65 µm (Abbildung 9e-h).

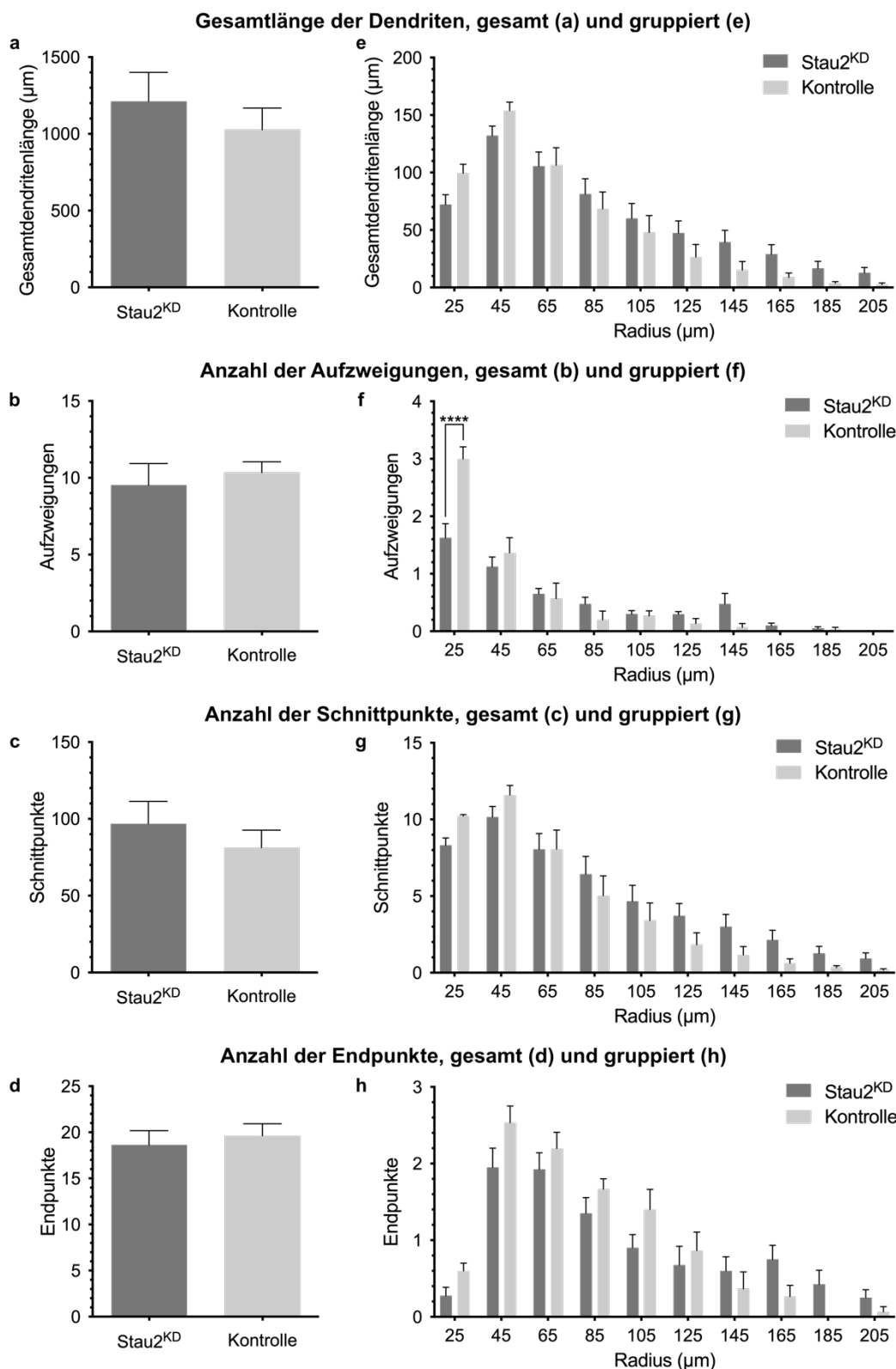


Abbildung 8: Vergleich der Morphologie der Neuronen in der Stau2^{KD}- und der Kontrollgruppe in der apikalen CA1-Region. Die Gesamtlänge der Dendriten (a) und die Anzahl an Schnittpunkten (c) war in den Stau2^{KD}-Tieren erhöht, die Anzahl an Aufzweigungen (b) und Endpunkten (d) dagegen reduziert. Es zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede. In den nach dem Abstand vom Soma gruppierten Übersichten (e-h) war ein einzelner statistisch signifikanter Unterschied in der Gruppe der Aufzweigungen nachweisbar (f). **** p-Wert < 0.0001.

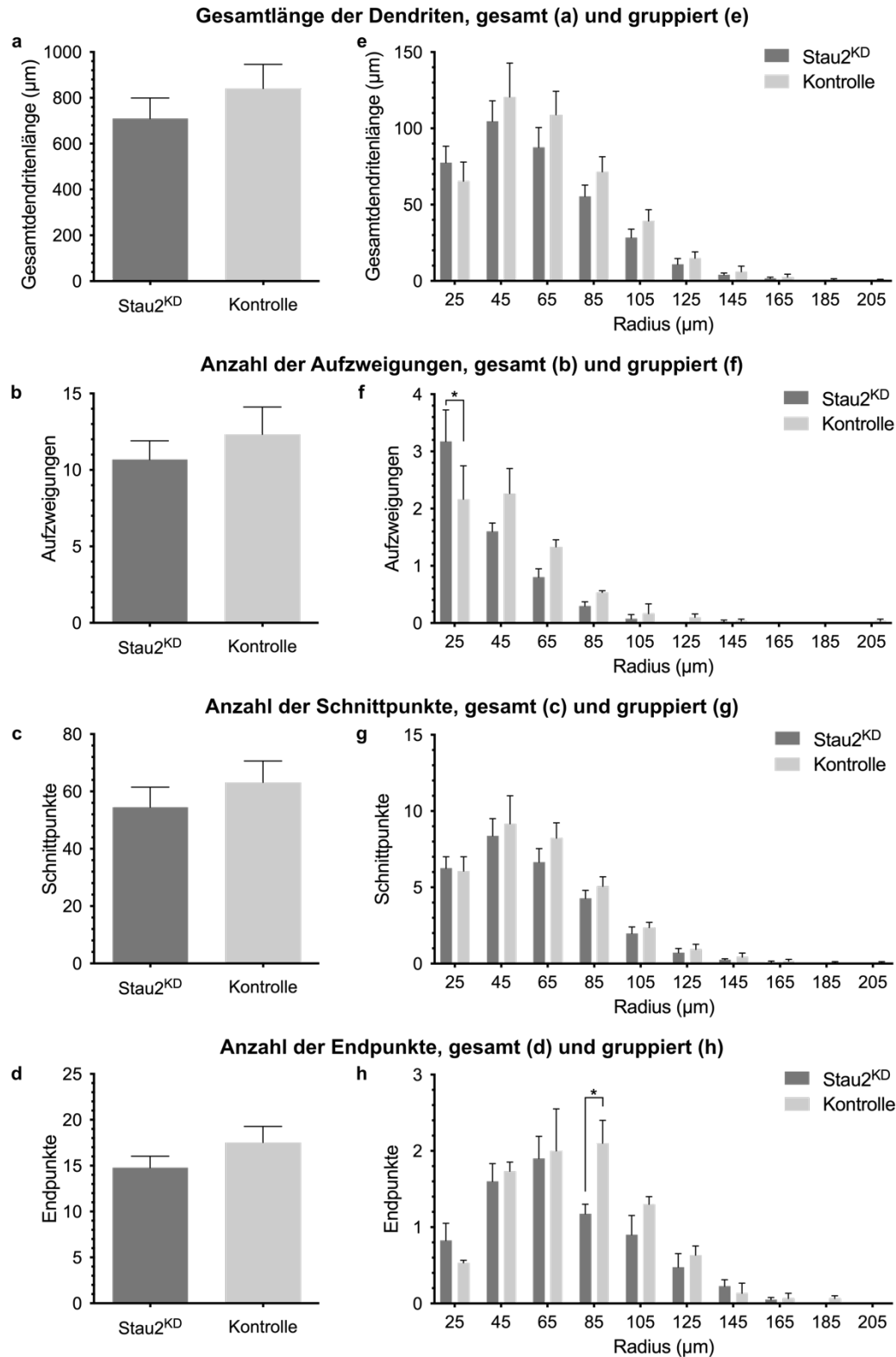


Abbildung 9: Vergleich der Morphologie der Neuronen in der *Stau2^{KD}*- und der Kontrollgruppe in der basalen CA1-Region. In der *Stau2^{KD}*-Gruppe waren die Gesamtlänge der Dendriten (a), sowie die Anzahl der Aufzweigungen (b), Schnittpunkte (c) und Endigungen (d) reduziert, jedoch ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. In den nach dem Abstand vom Soma gruppierten Übersichten (e-h) zeigten sich einzelne statistisch signifikante Unterschiede in den Gruppen der Aufzweigungen (f) und der Endigungen (h). * p-Wert < 0.05.

Der Branching Index als allein stehende Maßzahl für die Verzweigung eines Neurons war bei den Stau2^{KD}-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe in der apikalen CA1-Region um 38,4% erhöht (p-Wert 0,49). In CA1b zeigt sich eine Reduktion des BI um 24,9% (p-Wert 0,31). Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Abbildung 10 fasst die Ergebnisse grafisch zusammen.

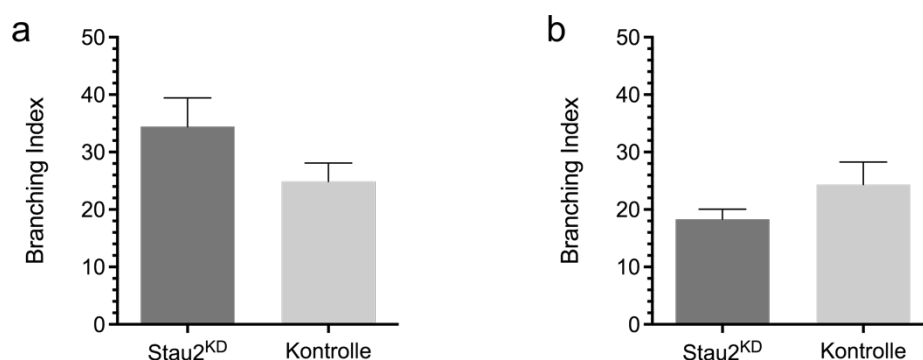


Abbildung 10: Branching Index im Vergleich zwischen Stau2^{KD}- und Kontrollgruppe. Im Vergleich zwischen Stau2^{KD}- und Kontrollgruppe zeigte sich in CA1a ein um 38,4% erhöhter Branching Index (a). In der CA1b-Region dagegen erschien er um 24,9% erniedrigt (b). Mit p-Werten von 0,49 bzw. 0,31 waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant.

3.2 Morphologie und Anzahl der dendritischen Spines in CA1

Insgesamt wurden 48.776 Spines bezüglich ihrer Länge und Dichte auf einem Dendriten ausgewertet. In CA1a wurden 11.204 Spines bei Stau2^{KD}-Tieren und 12.642 Spines in der Kontrollgruppe untersucht. Für CA1b zeigten sich ähnliche Spinezahlen mit 12.076 (Stau2^{KD}) und 12.854 (Kontrolle). Eine Übersicht über die untersuchten Parameter und die gefundenen Mittelwerte gibt Tabelle 2.

	CA1 apikal		CA1 basal	
	Stau2 ^{KD}	Kontrolle	Stau2 ^{KD}	Kontrolle
Mittelwert (\pm Standardfehler)	(n = 5)	(n = 5)	(n = 5)	(n = 5)
Gesamtanzahl an Spines	11.204	12.642	12.076	12.854
Spineanzahl pro untersuchten dendritischen Abschnitt	74,7	84,3	80,5	85,7
Spinedichte (1/ μ m)	1,26 \pm 0,04	1,39 \pm 0,02	1,37 \pm 0,04	1,45 \pm 0,04
Spinelänge (μ m)	0,901 \pm 0,04	0,999 \pm 0,02	0,878 \pm 0,04	0,925 \pm 0,03

Tabelle 2: Mittelwerte und Standardfehler der Dendritenanalyse zur Beurteilung der Morphologie und Anzahl der dendritischen Spines in CA1.

Bei den Stau2^{KD}-Tieren lag die durchschnittliche Anzahl an Spines pro untersuchten Dendritenabschnitt in CA1a bei 74,7 und in CA1b bei 80,7. In der Kontrollgruppe betrug die Spineanzahl pro untersuchten dendritischen Abschnitt 84,3 in CA1a und 85,7 in CA1b.

Für CA1a zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme der Spinelänge um 9,8% (p-Wert 0,027, siehe Abbildung 11a) im Vergleich zwischen Stau2^{KD} und Kontrolle. Auch für die Spinedichte war in der Stau2^{KD}-Gruppe eine statistisch signifikante Abnahme um 9,5% nachweisbar (p-Wert 0,011, Abbildung 11b).

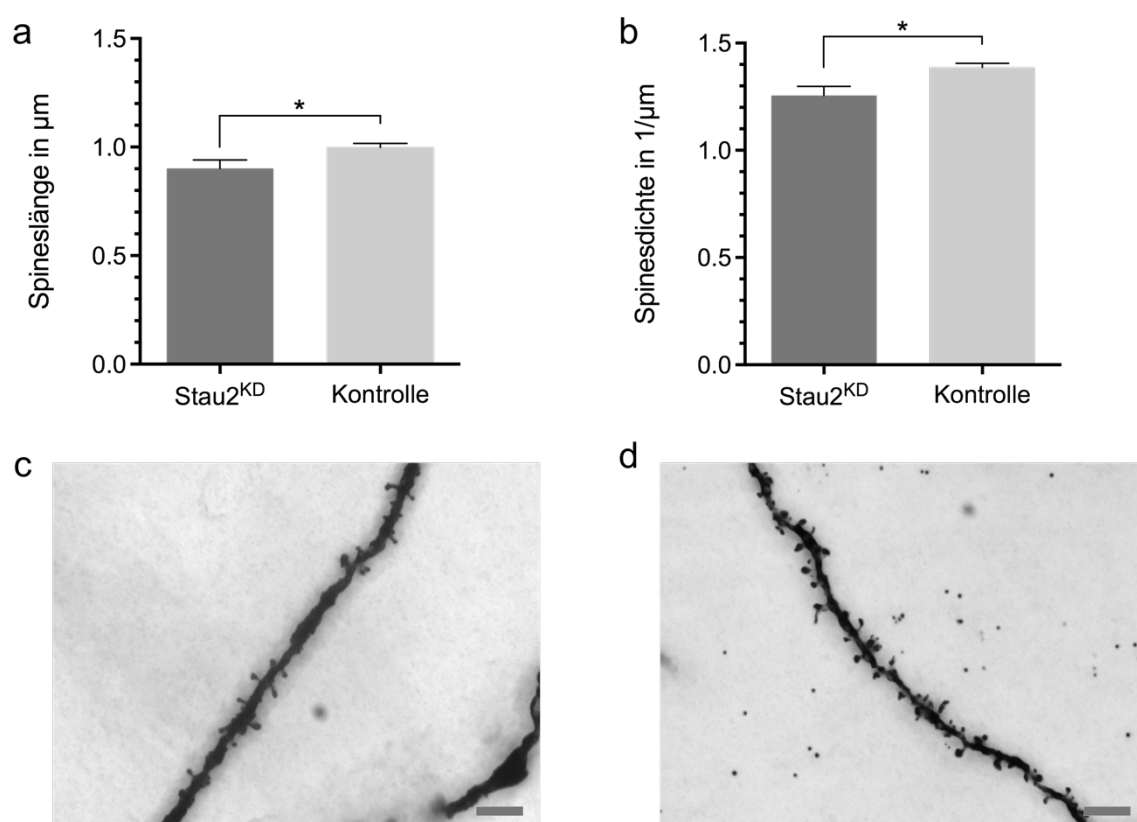


Abbildung 11: Länge und Dichte der Spines in der CA1a-Region. Es zeigten sich sowohl für die Spinelänge (a) als auch für die Spinedichte (b) eine statistisch signifikante Reduktion um 9,8% bzw. 9,5% (p-Werte 0,027 und 0,011) zwischen Stau2^{KD}-Tieren und der Kontrollgruppe. Beispielhafte Darstellung eines Dendriten in CA1a aus der Stau2^{KD}- (c) und Kontrollgruppe (d). Maßstabsbalken: 10µm. * p-Wert < 0.05.

Gruppier nach der Spinelänge in 0,5µm Abständen zeigte sich für Spines kleiner 0,5µm ein statistisch signifikant häufigeres Auftreten in der Stau2^{KD}-Gruppe mit einer Zunahme um 50,7% (p-Wert 0,0001) im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den Gruppen mit einer Länge von 1,0µm und größer gab es im Vergleich in der Stau2^{KD}-Gruppe weniger Spines. Dabei zeigte sich ein weiterer statistisch

signifikanter Unterschied beider Gruppen im Bereich von 1,0-1,5 μ m mit einer Reduktion um 14,7% (p-Wert 0,042). Abbildung 12 fasst die Verteilung der Spinelängen im Vergleich zusammen.

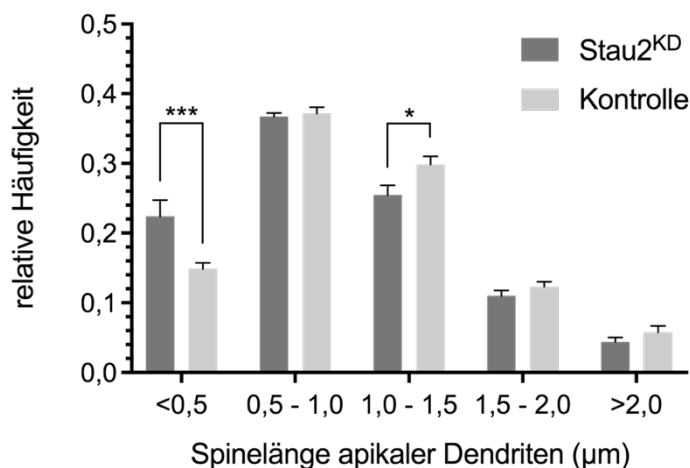


Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung der Spines in CA1a gruppiert nach ihrer Länge. Es zeigte sich ein statistisch signifikantes um 50,7% häufigeres Auftreten von kürzeren Spines, kleiner 0,5 μ m, in Stau2^{KD}-Tieren (p-Wert 0,0001). Dagegen waren längere Spines in der Kontrollgruppe häufiger, mit einem statistisch signifikanten Unterschied einzig im Bereich 1,0-1,5 μ m mit einer Reduktion der Spinelänge um 14,7% (p-Wert 0,042). * p-Wert < 0,05, *** p-Wert < 0,001.

In der basalen CA1-Region fand sich eine Abnahme der Spinelänge um 5,0% (Abbildung 13a) und der Spinedichte um 5,4% (Abbildung 13b) bei Stau2^{KD}-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Unterschiede waren allerdings nicht statistisch signifikant (p-Werte 0,20 und 0,09).

Betrachtet man die Häufigkeit der Spines gruppiert nach ihrer Länge, war in CA1b wie schon in CA1a ein vermehrtes Vorliegen von sehr kurzen Spines bis zu einer Länge von 0,5 μ m nachweisbar. In dieser Gruppe zeigte sich eine Zunahme des Auftretens um 19,5%. In den folgenden Gruppen längerer Spines war eine progrediente Abnahme der Häufigkeiten in der Stau2^{KD}-Gruppe um bis zu 11,4% bei Spines mit einer Länge von mehr als 2 μ m nachweisbar. Die Unterschiede zwischen Stau2^{KD}- und Kontrollgruppe waren statistisch nicht signifikant mit p-Werten zwischen 0,46 und 1,00. Abbildung 14 fasst die Ergebnisse grafisch zusammen.

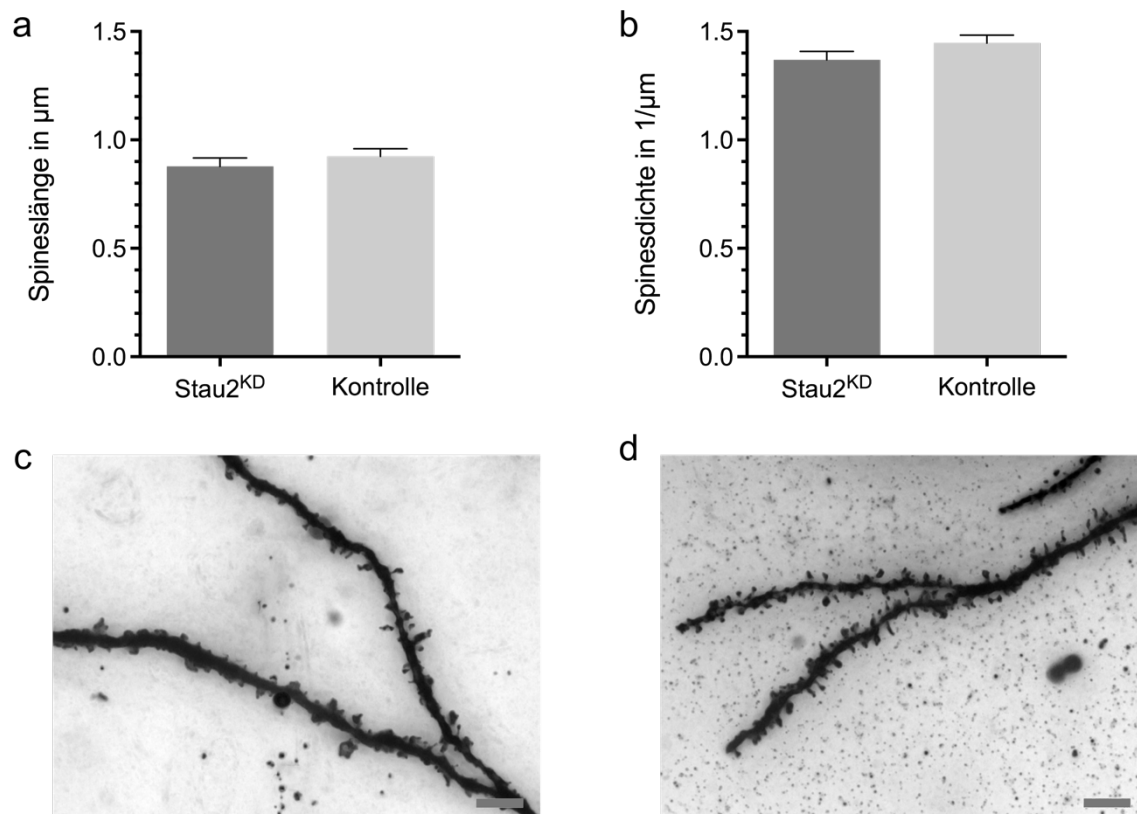


Abbildung 13: Länge und Dichte der Spines in der CA1b-Region. Es zeigte sich eine nicht statistisch signifikante Abnahme der Spinelänge (a) und -dichte (b) in der Stau2^{KD}-Gruppe um 5,0% bzw. 5,4% (p-Werte 0,20 und 0,09). Beispielhafte Darstellung eines Dendriten in CA1b eines Stau2^{KD}-Tieres (c) und der Kontrolle (d). Maßstabsbalken: 10µm.

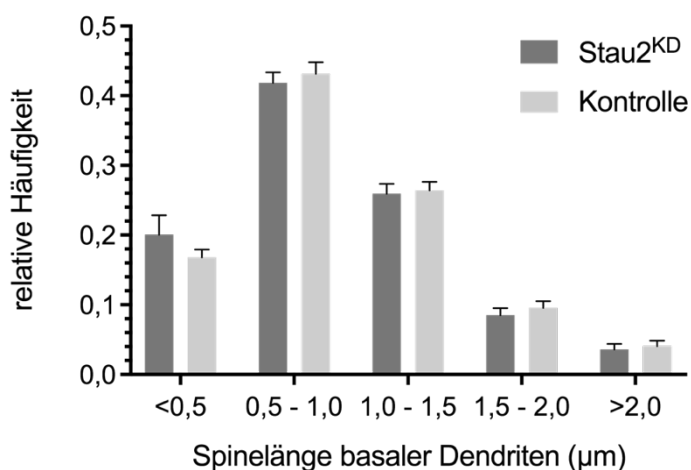


Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der Spines in CA1b gruppiert nach ihrer Länge. Es zeigte sich ein vermehrtes Auftreten von Spines mit einer Länge kleiner 0,5µm und ein vermindertes Auftreten längerer Spines in der Stau2^{KD}-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Statistisch signifikante Unterschiede waren nicht nachweisbar (p-Werte 0,46-1,00).

4 Diskussion

4.1 Der Einfluss von Stau2 auf die Morphologie der Dendriten und Spines

Mit der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das konditionale und medikamenteninduzierte Ausschalten von Stau2 im Hippocampus der Ratte auch in-vivo zu morphologischen Veränderungen an den dendritischen Dornen führt. Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte sich eine signifikante Reduktion der Spinelänge um 9,8% in der apikalen CA1-Region des Hippocampus, sowie eine um 9,5% signifikant geringere Spinedichte. In der basalen CA1-Region war ebenfalls eine Reduktion der Spineslänge um 5,0% und der Spinedichte um 5,4% nachweisbar, jedoch waren die Unterschiede nicht statistisch signifikant. Bezüglich der Morphologie der Dendriten mit Hinblick auf ihre Gesamtlänge und ihr Verzweigungsmuster ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Knockdowntieren und der Kontrollgruppe in beiden untersuchten Bereichen der CA1-Region.

In anderen Teilen des Hippocampus, wie CA3, zeigten sich im Gegensatz zur CA1-Region bei fehlendem bzw. reduziertem Stau2 keine signifikanten Veränderungen an den dendritischen Dornen. Eine mögliche Erklärung dafür ist die unterschiedliche Expression der gegen Stau2 gerichteten miRNA in den Knockdowntieren. So exprimierten 54,2% der Neurone in CA1 das an die miRNA gekoppelte EGFP und nur 47,6% in der CA3-Region (Berger et al., 2017). Im Umkehrschluss resultiert daraus eine geringere Expression von Stau2 in CA1 im Vergleich zu CA3. Die CA1-Region scheint damit für gezielte weitere Studien zur Funktion von Stau2 im Rahmen von Funktionsverlusts-Untersuchungen (englisch *loss-of-function experiments*) prädisponiert.

Eine Reduktion von Stau2 durch RNA-Interferenz führte in Zellkulturen zu morphologischen Veränderungen mit einer signifikanten Minderung der Anzahl an dendritischen Dornen und einer Änderung der normalen pilz-ähnlichen Form der Spines zu fadenförmigen Ausziehungen (Goetze et al., 2006). Eine erhöhte Spinelänge nach Knockdown von Stau2 konnten auch Lebeau et al. nachweisen, jedoch zeigte sich diese nur in jüngeren, 11 bis 14 Tage alten, kultivierten

Hippocampusschnitten. Während der zeitlichen Entwicklung der Neuronen scheint sich die Funktion von Stau2 zu ändern, da in älteren Zellen keine morphologischen Veränderungen mehr nachweisbar waren, stattdessen aber eine verminderte Fähigkeit zur LTD durch metabotrope Glutamatrezeptoren (Lebeau et al., 2011b).

Eine verminderte Dichte an dendritischen Dornen ist somit sowohl in Zellkulturen als auch in-vivo nach konditionalem Knockdown von Stau2 nachweisbar. Bezüglich der Spinemorphologie divergieren die unterschiedlichen Studien. Wie bereits in Abschnitt 1.4 dargestellt, gilt die Spinedichte als ein Maß für die Konnektivität von Neuronen. In Bezug auf LTP und LTD als physiologisches Korrelat für Lernen und Gedächtnis zeigen sich jeweils typische morphologische Veränderungen an den dendritischen Dornen im Sinne einer strukturellen Plastizität. Zwei Stunden nach der Induktion einer LTP konnten Ostroff et al. eine signifikante Translokation von Polyribosomen vom Dendritenschaft in die Spines und eine damit verbundene Vergrößerung der Spines nachweisen (Ostroff et al., 2002). Durch die Ausbildung neuer funktioneller Synapsen kommt es außerdem zu einer erhöhten Spinedichte (Toni et al., 1999; Muller et al., 2000). LTD dagegen geht mit einer anhaltenden Verringerung der synaptischen Übertragung einher und führt zu einer reduzierten Dichte an dendritischen Dornen (Monfils et al., 2004) und auch zu einer Reduktion der Spinelänge (Zhou et al., 2004).

Die bereits in Abschnitt 1.5.3 erwähnte Assoziation zwischen Stau2 und der LTD bzw. deren Regulation würde demnach bei einer reduzierten Expression von Stau2 eher eine Zunahme der Spinedichte erwarten lassen. In Zusammenschau mit den beschriebenen Beobachtungen von Lebeau et al., dass die morphologischen Veränderungen zeitlich unabhängig von den Einflüssen auf die LTD-Fähigkeit der Synapse auftreten (Lebeau et al., 2011b), spricht dies dafür, dass Stau2 eine zusätzliche Funktion bei der Ausbildung von Synapsen bzw. deren Aufrechterhaltung inne hat.

Einen möglichen Erklärungsansatz bietet eine Interaktion zwischen Stau2 und PSD-95. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Stau2 in Hippocampusneuronen konzentriert zusammen mit PSD-95, als einem typischen Protein der postsynaptischen Membran, auftritt. So konnten Goetze et al. neben einer verminderten Spinedichte auch eine verminderte Immunfluoreszenzreaktion von

PSD-95 im Bereich der Spines nachweisen (Goetze et al., 2006). Ebenso führt das Ausschalten von Stau1 zu morphologischen Veränderungen der Spines mit weniger nachweisbarem PSD-95 (Lebeau et al., 2008; Vessey et al., 2008; Lebeau et al., 2011a). PSD-95 ist ein elementarer Bestandteil der Spines, insbesondere der PSD, und bildet das Bindeglied zwischen postsynaptischer Membran und sowohl NMDA- (Kornau et al., 1995) als auch AMPA-Rezeptoren (Chen et al., 2000; Schnell et al., 2002). Dadurch beeinflusst PSD-95 die Rezeptorverteilung in der postsynaptischen Membran und damit schlussendlich die Größe und Stärke einer Synapse (Kim et al., 2004). Außerdem ist es ein wichtiger Faktor zur Bildung und vor allem zur Stabilisierung von dendritischen Dornen. So werden die meisten neu entstandenen Protrusionen an den Dendriten schnell wieder abgebaut. In diesem Stadium lässt sich kein PSD-95 nachweisen (De Roo et al., 2008; Lambert et al., 2017). Die Stabilisierung dieser neuen Spines geschieht innerhalb eines kritischen Zeitfensters von bis zu 24 Stunden und ist mit dem Auftreten von PSD-95 in den dendritischen Dornen verknüpft (De Roo et al., 2008). Passend zu diesen Beobachtungen führt ein Knockdown von PSD-95 mittels RNAi in hippocampalen Zellkulturen zu einem erhöhten Umsatz von Spines mit einer herabgesetzten Fähigkeit zur Ausildung bzw. Stabilisierung neuer dendritischer Dornen (Ehrlich et al., 2007). Eine Überexpression von PSD-95 dagegen geht mit einer Erhöhung sowohl der Spinedichte als auch der Spinelänge einher (El-Husseini et al., 2000).

Die Verankerung von AMPA-Rezeptoren (kurz AMPAR) in der postsynaptischen Membran kann als morphologisches Korrelat für die Stabilisierung eines Spines verstanden werden (Opazo et al., 2012). Der größte Teil der exzitatorischen synaptischen Übertragungen im Hirn erfolgt über diese AMPA-Rezeptoren und ihre Anzahl bestimmt somit die elektrophysiologische Kapazität und die Stärke einer Synapse (Opazo et al., 2011). Wie in Abschnitt 1.3 und Abbildung 5 beschrieben bilden sie zudem zusammen mit den NMDA-Rezeptoren die Grundlage für LTP und LTP im Rahmen der synaptischen Plastizität. AMPAR sind sehr mobil und unterliegen bereits im Ruhezustand einer ständigen Homöostase. So werden alle 10-15 Minuten ungefähr die Hälfte der Rezeptoren eine Synapse ausgetauscht (Ashby et al., 2006). AMPA-Rezeptoren bilden ein Tetramer aus einer beliebigen Kombination der vier Untereinheiten GluR1-4. Am häufigsten sind dabei

Kombinationen aus GluR1/2 oder GluR2/3 (Hollmann et al., 1994; Rosenmund et al., 1998).

Die Verankerung der Rezeptoren in der postsynaptischen Membran wird unter anderem durch PSD-95 ermöglicht, das auch als sogenanntes Slot-Protein bezeichnet wird. Die Kapazität für AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran wird über die Verfügbarkeit von freien „Steckplätzen“ (englisch *slots*) innerhalb des Zytoskeletts in der PSD bestimmt, ähnlich einem Eierkarton, indem freie Plätze für weitere AMPAR genutzt werden können. Die Anzahl verfügbarer Steckplätze ist dabei mit der Menge an PSD-95 an der postsynaptischen Membran assoziiert (Opazo et al., 2012; Bear et al., 2015), Seite 884f.). Auf molekularer Ebene bindet PSD-95 über transmembranöse AMPAR-Regulationsproteine (kurz TARP, englisch für *transmembrane AMPAR regulatory protein*), allen voran Stargazin, an die AMPAR und stellt somit eine Verbindung zum Grundgerüst der PSD her. Durch diese Verankerung wird eine weitere laterale Diffusion der Rezeptoren weg vom synaptischen Spalt verhindert (Schnell et al., 2002; Bats et al., 2007).

Zusammenfassend ergibt sich somit die Möglichkeit, dass Stau2 über eine regulatorische Verbindung zu PSD-95 an der Stabilisierung von Synapsen und deren Grundausstattung mit AMPA-Rezeptoren beteiligt ist und so Einfluss auf die Anzahl und Morphologie der dendritischen Dornen hat.

Außerdem nehmen sowohl LTP als auch LTD Einfluss auf die Verteilung der AMPAR. So geht eine LTP mit einer Vermehrung von AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran einher. Durch die Phosphorylierung vor allem der Untereinheit GluR1 durch Kinasen wie die Calcium-Calmodulin-Kinase II (Barria et al., 1997) und die Proteinkinase A (Roche et al., 1996) werden die Rezeptoren vermehrt in die extrasynaptische Membran eingebaut. Danach erfolgt eine laterale Diffusion zur postsynaptischen Membran, wo sie wie zuvor beschrieben verankert werden. Im Rahmen der LTD wird die Phosphatase Calcineurin aktiviert und die GluR1-Untereinheit dephosphoryliert. In der Folge diffundieren die AMPA-Rezeptoren wiederum lateral entlang der Membran in extrasynaptische Bereiche und werden dann mittels Endozytose aus der postsynaptischen Membran entfernt (Beattie et al., 2000). An der Regulation der Endozytose von AMPAR ist auch das Mikrotubuli-assoziierte Protein 1b (MAP1B) beteiligt (Benoist et al.,

2013). Generell dienen Mikrotubuli-assoziierte Proteine zum einem der Stabilisierung der Mikrotubuli als einer wichtigen Komponente des Zytoskeletts und des intrazellulären Transports und zum anderen der Interaktion mit benachbarten Strukturen (Halpain et al., 2006). Wie Benoist et al. zeigen konnten, führt ein konditionales Ausschalten von MAP1B zu einer verminderten LTD, da die Endozytose von AMPA-Rezeptoren nicht regelrecht initiiert werden konnte (Benoist et al., 2013).

Heraud-Farlow et al. konnten nachweisen, dass MAP1B und dessen mRNA der Kontrolle von Stau2 unterliegen (Heraud-Farlow et al., 2013). In der Zellkultur führte der Knockout von Stau2 zu einer reduzierten Synthese von MAP1B und in der Folge passend zu den Ergebnissen von Benoist et al. wiederum zu einer eingeschränkten LTD durch verminderte Internalisierung von AMPA-Rezeptoren (Lebeau et al., 2011b). Somit ergibt sich neben der Einflussnahme auf die postsynaptische Kapazität über PSD-95 ein weiterer regulatorischer Ansatzpunkt für Stau2 über die Kontrolle der Endozytose der Rezeptoren.

Die bis hierher aufgezeigten Studien zusammen mit den eigens im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass Stau2 Einfluss auf die Morphologie der dendritischen Dornen und ihre Funktion, insbesondere im Hinblick auf ihre Ausstattung mit AMPA-Rezeptoren, nimmt. Stau2 scheint multiple Funktionen an der postsynaptischen Membran zu beeinflussen und sowohl an der grundlegenden Ausstattung der Spines als auch an deren Veränderungen im Rahmen der synaptischen Plastizität beteiligt zu sein.

In Abschnitt 1.5 wurde bereits auf die strukturellen Unterschiede zwischen Stau2 und dem zweiten Staufenhomolog Stau1 eingegangen. Als mRNA-bindende Proteine sind beide Bestandteile von RNPs, die mRNA entlang von Mikrotubuli transportieren (Köhrmann et al., 1999). Wie bereits für Stau2 aufgezeigt, ist auch Stau1 für eine regelrechte Ausbildung der dendritischen Dornen erforderlich. So führt ein Knockdown von Stau1 in hippocampalen Zellkulturen sowie in Mäusen ebenfalls zu einer Veränderung der Spinemorphologie, jedoch mit anderen Auswirkungen als bei den hier untersuchten Stau2^{KD}-Tieren im Sinne von längeren und dünneren Spines (Lebeau et al., 2008; Vessey et al., 2008; Lebeau et al., 2011a). Phänotypisch zeigen diese Knockdown-Mäuse keine relevanten Defizite in Bezug auf das Lernvermögen und die Gedächtnisleistung. Es war lediglich eine

reduzierte lokomotorische Aktivität bei den Tieren nachweisbar (Vessey et al., 2008). In Bezug auf die synaptische Plastizität ist Stau1 im Gegensatz zu Stau2 an einer korrekten Etablierung der proteinsynthese-abhängige späten Phase der LTP im Hippocampus beteiligt (Lebeau et al., 2008). Vessey et al. konnten zeigen, dass das Fehlen von Stau1 im Gegenzug nicht zu einer Erhöhung der Stau2-Konzentration führt (Vessey et al., 2008). Zusammen mit den zuvor beschrieben verschiedenen Funktionen, spricht dies gegen eine kompensatorische Wirkung der beiden Proteine. Als eine mögliche Erklärung für diese divergierenden Funktionen kommen zum einen unterschiedliche Ziel-RNAs aufgrund unterschiedlicher Bindungsstellen in Frage, aber auch anderweitige Wirkmechanismen der beiden RNPs auf ihre Ziel-RNAs (Heraud-Farlow et al., 2014).

Schlussendlich weisen Stau1 und Stau2 aber auch redundante Funktionen auf. So ist in Zellkulturen eine Beteiligung von Stau1 an der Degradierung von mRNAs (*Staufen-mediated decay*, kurz SMD) nachweisbar. Dazu bindet Stau1 an die Ziel-mRNA in der 3'-UTR. Anschließend kommt es durch eine direkte Interaktion mit der Helikase Upf-1 zu einem Abbau der mRNA (Kim et al., 2005). In späteren Studien konnte auch für Stau2 eine direkte Bindung an Upf-1 und somit eine Beteiligung am SMD gezeigt werden (Park et al., 2013a; Park et al., 2013b). Zusätzlich beschreiben Park et al. in ihrer Studie, dass beide Staufenproteine Heterodimere bilden (Park et al., 2013a), sodass auch weitere redundante bzw. kompensatorische Funktionen der beiden Proteine möglich erscheinen.

4.2 Stau2^{KD} führt zur vermehrter LTP und Verhaltensänderungen

Die hier bisher diskutierten morphologischen Veränderungen durch einen konditionalen Knockdown von Stau2 in-vivo sind jedoch nur ein Teil, der an diesen Tieren festgestellten Veränderungen. So bietet das verwendete Tiermodell ein breites Spektrum an neuen Möglichkeiten für weitere und komplexere Untersuchungen. Im Rahmen der Etablierung des Tiermodells wurden daher neben den hier beschriebenen morphologischen Untersuchungen sowohl elektrophysiologische Auswertungen bezüglich LTP und LTD innerhalb des Hippocampus als auch Verhaltenstests zur Beurteilung der kognitiven Leistungsfähigkeit und der Auswirkungen von Stau2 auf das Lernverhalten und die Gedächtnisleistung

durchgeführt. Die im folgendem vorgestellten Ergebnisse sowie auch die innerhalb dieser Arbeit erhobenen Daten wurden in einer Kooperation verschiedener Arbeitsgruppen erstellt und zusammengefasst in der Arbeit von Berger et al. veröffentlicht (Berger et al., 2017).

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen erfolgte die Implantation von Stimulationselektroden zur Aktivierung des *Tractus perforans*, der einen Großteil der Efferenzen des Hippocampus aus dem entorhinalen Kortex in den *Gyrus dentatus* leitet, sowie von Aufnahmeelektroden in den Ausgangsstationen CA1 und CA3 von Ratten mit *Stau2^{KD}* sowie zwei Kontrollgruppen. Die Ableitungen erfolgten dabei passend zu dem in Abschnitt 1.2.2 und Abbildung 4 beschriebenen Verschaltungsmodellen des Hippocampus. Nach einer Hochfrequenzstimulation zeigten sich in allen Gruppen deutlich erhöhte exzitatorische postsynaptische Potenziale (EPSP) in CA1 und CA3 im Sinne einer LTP, die aber in den *Stau2^{KD}*-Tieren signifikant länger anhielten. Nach Induktion einer LTD durch eine Niederfrequenzstimulation war in den Kontrolltieren die zu erwartende Reduktion der EPSPs messbar. In den *Stau2^{KD}*-Ratten dagegen ließ sich statt einer LTD wiederum eine LTP nachweisen. Die verstärkte synaptische Verbindung durch vermehrtes Auftreten von LTP in *Stau2^{KD}*-Tieren passt zu früheren Erkenntnissen von Lebeau et al., die zeigen konnten, dass ein Knockdown von *Stau2* in kultivierten Hippocampusschnitten zu einer signifikanten Reduktion der durch metabotrope Glutamatrezeptoren induzierten und proteinsynthese-abhängigen Langzeitdepression führt (Lebeau et al., 2011b).

Um die Auswirkungen der morphologischen und elektrophysiologischen Veränderungen auf die kognitiven Funktionen der *Stau2^{KD}*-Tiere zu bestimmen, wurden umfangreiche Verhaltens- und Gedächtnistests unternommen. In den Verhaltenstests zeigte sich, dass *Stau2^{KD}*-Ratten eine verminderte Fähigkeit zur Detektion räumlicher Veränderungen zu haben scheinen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren sie weniger gut in der Lage, bekannte Objekte an einer neuen Position zu erkennen. In Bezug auf die Diskriminationsfähigkeit zwischen bekannten und bisher unbekanntem Objekten waren keine Unterschiede in den Gruppen nachweisbar. Zur Beurteilung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses wurden sogenannte „*delayed matching to place*“ (DMTP) und „*delayed non-matching to place*“ (DNMTP) Aufgaben mit den Tieren trainiert. Bei der DMTP-Aufgabe

mussten die Tiere viermal nacheinander in einem Morris-Wasserlabyrinth eine versteckte Plattform finden. Die Zeit bis zum Auffinden der Plattform verkürzt sich dabei im Normalfall von Versuch zu Versuch, als Zeichen eines funktionierenden räumlichen Arbeitsgedächtnisses. Im DNMT-Test dagegen sollten die Tiere zwischen einem bereits besuchten und einem nicht-besuchten Arm innerhalb eines achtarmigen „*radial maze*“ unterscheiden. Eine Belohnung erhielten sie dabei nur, wenn sie im Testversuch einen vorher nicht besuchten Arm aufsuchten. In beiden Versuchen zeigte sich kein Unterschied zwischen Stau2^{KD}- und Kontrolltieren, wenn die Abstände zwischen den Versuchen sehr kurz, bspw. eine Minute, waren. Bei längeren Abständen, von 30 Minuten bis zu 6 Stunden, zwischen dem ersten und zweiten Versuch in der DNMT-Aufgabe bzw. zwischen Trainings- und Testversuch im DNMT-Test zeigten die Knockdown-Tiere jedoch eine deutlich schlechtere Leistung. Diese Ergebnisse implizieren damit eine Verschlechterung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses der Stau2^{KD}-Ratten. Das räumliche Langzeitgedächtnis erschien in weiteren Versuchen im Morris-Wasserlabyrinth nicht betroffen.

In weiteren Tests konnte außerdem gezeigt werden, dass Stau2^{KD}-Tiere Defizite sowohl beim zeitlichen als auch beim räumlichen Assoziationsgedächtnis haben. Zur Beurteilung des zeitlichen Assoziationsgedächtnisses erhielten die Tiere 20 Sekunden nach einem Tonsignal einen Elektroschock. Sowohl Knockdown- als auch Kontrolltiere entwickelten eine Angstreaktion auf das Tonsignal, jedoch wiesen die Stau2^{KD}-Ratten eine deutlich verzögerte Assoziationsreaktion zwischen Hinweiston und Angstreiz auf. Das räumliche Assoziationsgedächtnis wurde mithilfe einer Plattform getestet, die von einem unter Strom befindlichem Gitter umgeben war. Die Tiere erhielten einen Elektroschock, wenn sie die Plattform verließen. Der Test wurde mit zwei verschiedenen Plattformstandorten wiederholt. Dabei erlernten beide Gruppen, die Plattform möglichst nicht zu verlassen, die Knockdowntiere benötigten hierfür aber signifikant mehr Zeit.

Zusammenfassend zeigen die Stau2^{KD}-Tiere Defizite im räumlichen Arbeitsgedächtnis sowie im räumlichen und zeitlichen Assoziationsgedächtnis. Außerdem waren die Tiere im Vergleich deutlich weniger flexibel bei der Anpassung an neue Bedingungen und bei der Herstellung neuer Assoziationen. Im Gegensatz zu Stau1 geht ein Defizit an Stau2 somit mit einer Beeinträchtigung der Lern- und

Gedächtnisleistung einher. Eine Erklärung für diese Veränderungen bietet das beschriebene verschobene Verhältnis zwischen LTP und LTD zugunsten einer gesteigerten Langzeitpotenzierung und einer verminderten Fähigkeit zur LTD. So scheint eine direkte Korrelation zwischen der Ausprägung der LTD im Hippocampus von Ratten und dem räumlichen Arbeitsgedächtnis zu bestehen (Nakao et al., 2002). Auch Zeng et al. konnten durch den Knockout von Calcineurin in transgenen Mäusen zeigen, dass eine verminderte LTD zu einer Verschlechterung des Arbeitsgedächtnisses führt. Passend zu den *Stau2^{KD}*-Ratten zeigten diese Mäuse keine Beeinträchtigungen des deklarativen Gedächtnisses (Zeng et al., 2001). Daneben erscheint die LTD bedeutsam im Rahmen der Objekterkennung und der Erkundung neuer räumlicher Umgebungen. So zeigten Ratten eine deutlich vermehrte LTD in der CA1-Region, wenn sie einer neuen räumlichen Situation ausgesetzt wurden. Nach Habituation an die neue Umgebung war keine LTD mehr nachweisbar (Manahan-Vaughan et al., 1999). Bei Knockout-Mäusen führte ein Überangebot von Dopamin an den Synapsen zu einer verminderten Anpassungsfähigkeit an räumliche Veränderungen. Elektrophysiologisch ließ sich bei diesen Tieren, ähnlich wie in den *Stau2^{KD}*-Ratten, eine Verminderung der LTD und eine Verschiebung hin zu einer vermehrten LTP nachweisen (Morice et al., 2007). Kemp et al. konnten zeigen, dass LTD vor allem im Zusammenhang mit dem Erfassen und Lokalisieren von neuen Objekten innerhalb einer Umgebung auftritt. So ist bei Ratten eine verstärkte Langzeitdepression innerhalb der CA1-Region messbar, wenn in einer neuen Umgebung Objekte zum Erkunden vorhanden waren. Die LTP dagegen war während der Erkundung vor allem leerer unbekannter Räumlichkeiten verstärkt nachweisbar (Kemp et al., 2004). Eine verstärkte LTP trat dabei nur im Zusammenhang mit der Erforschung neuer, bisher unbekannter Umgebungen auf. In bereits bekannten Umgebungen konnte keine weitere LTP nachgewiesen werden (Xu et al., 1998). Die Gedächtnisfunktionen scheinen somit auf einem komplexen Zusammenspiel aus LTP und LTD und damit auch auf komplexen Anpassungen der synaptischen Morphologie zu beruhen.

4.3 Synaptische Plastizität als bidirektionaler Prozess

Durch den stetigen Einfluss extrinsischer Reize kommt es zu einer fortwährenden Anpassung der neuronalen Netzwerke. Synaptische Plastizität als Grundlage für das korrekte Funktionieren von Lernen und Gedächtnis kann wie viele physiologische Prozesse auch als eine Art der Homöostase aus stabilen Verbindungen und fortwährenden Veränderungen betrachtet werden. Die mnestische Informationsspeicherung innerhalb eines neuronalen Netzwerkes kann daher als ein bidirektionaler Vorgang im Sinne eines Zusammenspiels aus Stärkung und Schwächung synaptischer Verbindungen verstanden werden (Bear, 1996).

Aus elektrophysiologischer Sicht wurde eine zentrale Rolle der LTP zur Stärkung synaptischer Verbindung und im Rahmen der Gedächtniskonsolidierung in zahlreichen Studien untersucht und nachgewiesen (Lynch, 2004; Nicoll, 2017). Die Rolle der LTD in diesen Prozessen ist weitaus weniger betrachtet worden. In frühen Arbeiten dazu wurde sie auch als Möglichkeit zur Löschung von Engrammen aus dem Gedächtnis diskutiert (Tsumoto, 1993). Die hier zusammengetragenen Ergebnisse sprechen jedoch dafür, dass die LTD nicht nur eine bloße Umkehrung der LTP ist, sondern ein gleichwertiges Prinzip zur Repräsentation von Lernen und Gedächtnis auf elektrophysiologischer und synaptischer Ebene.

Die in Abschnitt 4.1 beschriebene aktivitätsabhängige Endo- und Exozytose von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran sowie die Anpassung der Rezeptorkapazitäten innerhalb der postsynaptischen Membran entsprechend dem beschriebenen Eierkartonmodell, aber auch die Ausbildung neuer und der Abbau nicht benötigter Synapsen stellen das morphologische Korrelat dieser Vorgänge dar.

Neben diesen aktivitätsabhängigen funktionellen Anpassungen bedarf es einer präzisen Kontrolle und Reglementierung dieser Prozesse, da es ansonsten zu einem Verlust der gespeicherten Informationen kommen kann (Thiagarajan et al., 2007). In einem begrenzten Umfang können LTP und LTD direkt an einzelnen Synapsen durch modulierende Neurotransmitter wie Acetylcholin, GABA oder andere Zytokine begrenzt werden (Abraham, 2008). Andererseits gibt es Mechanismen wie die synaptische Skalierung und Metaplastizität, die Synapsen, Neuronen und ganze neuronale Netze langfristig modulieren können. Metaplastizität

beschreibt dabei die generelle Fähigkeit die Regeln für die synaptische Plastizität aktivitätsabhängig anpassen zu können (Abraham, 2008; Diering et al., 2018).

Abschließend sei erwähnt, dass Bienenstock, Cooper und Munro bereits 1982 die nach ihnen benannte BCM-Theorie als umfassendes Modell zur Gedächtniskonsolidierung innerhalb neuronaler Netzwerke vorschlugen (Cooper et al., 2012). Als Erweiterung der in Abschnitt 1.3 vorgestellten Hebb'schen Lernregel integriert sie die Vorstellungen einer verteilten Informationsspeicherung im Sinne des Multiple-trace-Modells und der Erstellung kognitiver Karten (Abschnitt 1.2.3) mit den hier beschriebenen Mechanismen der synaptischen Plastizität und ihren Kontrollprozessen wie der Metaplastizität (Bienenstock et al., 1982; Cooper et al., 2012).

Das zentrale Element der Theorie ist die für jede Synapse individuelle Modifikationsschwelle, die den kritischen Umschlagpunkt in der postsynaptischen Erregung markiert, an dem die synaptische Reaktion von einer Schwächung in eine Stärkung der Verbindung umschlägt (Bienenstock et al., 1982). Die Modifikationsschwelle ist dabei kein starrer Fixpunkt, sondern je nach Aktivitätsniveau des Neurons variabel (Bienenstock et al., 1982). Entsprechend zu den Vorstellungen der Metaplastizität führt ein vermehrtes Auftreten von LTP zu einer Erhöhung der Modifikationsschwelle. LTD dagegen geht mit einer Senkung der Modifikationsschwelle einher.

Die in Abschnitt 4.2 beschriebene vermehrte Induktion von LTP bereits bei niederfrequenten Reizen in der CA1-Region der *Stau2^{KD}*-Ratten kann daher im Einklang mit der BCM-Theorie als eine Verschiebung der Modifikationsschwelle und somit als metaplastische Anpassung angesehen werden. In Zusammenschau mit den in Abschnitt 4.1 beschriebenen Interaktionen zwischen *Stau2* und PSD-95, sowie MAP1B ergibt sich zudem ein möglicher Einfluss von *Stau2* auf die grundlegende Stabilität der dendritischen Dornen sowie der AMPA-Rezeptorkapazität und -ausstattung der postsynaptischen Membran als direktes morphologisches Korrelat dieser metaplastischen Anpassungsprozesse. Damit erscheint neben den bereits beschriebenen aktivitätsabhängigen Funktionen im direkten Zusammenhang mit dem Auftreten einer LTD auch eine Funktion von *Stau2* im Rahmen einer langfristigen Modulation und Stabilisierung von synaptischen Verbindungen wahrscheinlich. Die genaue Integration von *Stau2* innerhalb dieser komplexen

Prozesse der Gedächtniskonsolidierung und -homöostase bleiben jedoch weiterhin offen. Dabei scheint auch eine Beteiligung von Stau2 an den proteinbiosynthese-abhängigen Endphasen sowohl der LTD als auch der Modifikationskaskaden möglich.

4.4 Stellenwert mRNA-bindender Proteine

Neben Stau2 gibt es eine ganze Reihe weiterer mRNA-bindender Proteine mit einer Funktion im Rahmen der synaptischen Plastizität. Dazu gehören unter anderem Stau1, FMRP, Pur α , CPEP oder auch ZBP1 (Knowles et al., 1996; Tang et al., 2001; Kanai et al., 2004). Für Neuronen und ihre Adaption an äußere Reize ist die zeitliche und räumliche Kontrolle der Genexpression essenziell und als Teil dessen auch die lokale Proteinbiosynthese (Kandel, 2001). In diesem Zusammenhang nehmen RBPs eine bedeutende Rolle sowohl in Bezug auf die Verteilung von mRNAs als auch bei der Kontrolle deren Translation ein und gewährleisten so eine regelrechte Funktion der Neuronen innerhalb ihrer Netzwerke (Lukong et al., 2008). Die verschiedenen RBPs unterscheiden sich unter anderem bezüglich ihrer Ziel-mRNAs und damit auch in der Art ihrer Beteiligung an plastischen Veränderungen im Bereich der Spines. So hat die Zusammensetzung von Ribonukleopartikeln aus unterschiedlichen RBPs einen erheblichen Einfluss auf das weitere Schicksal der enthaltenen mRNAs (Tolino et al., 2012). Grundlegend weisen alle RBPs innerhalb des ZNS jedoch wichtige Gemeinsamkeiten auf. Dabei sind sie meist an mehr als einer Aufgabe im Rahmen der Lokalisation von mRNAs in die Dendriten beteiligt. Dies beginnt bereits im Zellkern, wo RBPs am Spleißen der mRNAs und deren Qualitätskontrolle beteiligt sein können und führt weiter zum Export aus dem Kern ins Zytoplasma und schließlich zur Zusammensetzung von Ribonukleopartikeln und dem Transport entlang des Zytoskeletts zur Zielregion. Zusätzlich sind sie auch, wie in Abschnitt 1.5.3 beschrieben, an der Translationskontrolle, der Stabilisierung und schlussendlich auch der Degradierung von mRNAs beteiligt (Marchand et al., 2012).

Auch Stau2 ist in mindestens zwei Aufgaben innerhalb der Kaskade der lokalen Proteinbiosynthese involviert. So zeigen die in Abschnitt 4.1 beschriebenen Interaktionen zwischen Stau2 und PSD-95 sowie auch MAP1B zum einen eine Beteiligung von Stau2 am Mikrotubuli-assoziierten Transport von PSD-95-mRNA in

die Dendriten und Spines (Goetze et al., 2006) und zum anderen eine Funktion im Rahmen der lokalen Translationskontrolle von MAP1B (Heraud-Farlow et al., 2013).

Aufgrund ihrer zentralen Rolle für die lokale Proteinsynthese insbesondere im Zusammenhang mit der synaptischen Plastizität sind mRNA-bindende Proteine selbst wichtige Ziele für Regulationsmechanismen. Durch eine solche posttranslationale Modifikation einzelner RBPs ist zum einen eine spezifische und effiziente Regulation des mRNA-Transports und zum anderen durch Kontrolle der Translation eine Einflussnahme auf die Stabilität und letztendlich auch auf die Degradierung von mRNAs möglich (Tolino et al., 2012). So verringert beispielsweise die Phosphorylierung von ZBP1 dessen mRNA-Bindungsfähigkeit und sorgt für eine vermehrte Translation der zuvor gebundenen mRNAs (Hüttelmaier et al., 2005).

Ob solche Regulationsmechanismen auch für die Stau-Proteine, insbesondere Stau2, existieren, ist bisher nicht bekannt. Aufgrund der bisher in dieser Arbeit vorgestellten Funktionen und Interaktionen im Rahmen der synaptischen Plastizität erscheint es jedoch höchst wahrscheinlich, dass auch der von Stau2 vermittelte Transport von mRNAs und deren lokale Translation in den Spines genau kontrolliert und reguliert werden. Die Frage, wie eine solche Regulation genau aussehen könnte und ob Stau2 in seiner Funktion ebenfalls durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung modifiziert werden kann, bietet somit Anlass für weitere Forschung.

Alles in allem zeigt sich eine wichtige Rolle der RBPs bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Lernen und Gedächtnis, sowie im Rahmen der Neurogenese bzw. Synaptogenese. Es ist daher nicht verwunderlich, dass Defekte innerhalb dieser Funktionsketten beispielsweise durch Mutationen in bestimmten RNA-bindenden Proteinen mit den verschiedensten neurologischen Krankheitsbildern einhergehen (Lukong et al., 2008). Die Betrachtung des Zusammenhangs zwischen RNA-Lokalisierung und neurologischen Erkrankungen ist dabei ein sehr junges Forschungsfeld mit noch vielen Unbekannten. Doch liefert es bereits jetzt neue Einsichten in die Pathogenese von Erkrankungen sowie mögliche neue Therapieansätze (Tolino et al., 2012). Erkrankungen des ZNS mit Dysfunktionen von RBPs betreffen ein breites Spektrum von neurologischen Entwicklungs-

störungen, neurodegenerativen Erkrankungen und auch neuropsychiatrischen Krankheitsbildern (Lukong et al., 2008; Cooper et al., 2009; Liu-Yesucevitz et al., 2011).

Die erste beschriebene genetische Erkrankung mit einer nachgewiesenen Verbindung zwischen gestörter mRNA-Regulation und phenotypisch kognitiven Funktionsstörungen war das Fragile-X-Syndrom (Bassell et al., 2008). Es stellt mit einer Inzidenz von weltweit ca. 1:4.000 unter männlichen Neugeborenen die häufigste vererbte Ursache für geistige Behinderung dar und ist außerdem die häufigste monogenetisch bedingte Ursache für Autismus (Crawford et al., 2001; Garber et al., 2008). Hervorgerufen wird das Fragile-X-Syndrom durch eine Expansion eines CGG-Triplets im *FMR1*-Gens auf dem X-Chromosom (Lukong et al., 2008). Das Proteinprodukt des *FMR1*-Gens ist das bereits erwähnte RBP *fragile x mental retardation protein* (FMRP). In gesunden Individuen befinden sich zwischen 6 und 55 Wiederholungen des CGG-Triplets im 5'-UTR des *FMR1*-Gens. Bei 55-200 Wiederholungen spricht man von einer Prämutation, die mit mildereren Symptomen als sogenanntes Fragiles-X-assoziiertes Tremor- und Ataxiesyndrom einhergeht (Penagarikano et al., 2007). Es wird deutlich vermehrt FMRP-mRNA gebildet, doch können nur geringe Mengen davon in das eigentliche Protein translatiert werden (Jacquemont et al., 2007). Die volle Mutation tritt bei mehr als 200 Tripletwiederholungen auf und zeigt eine Penetranz von nahezu 100% in männlichen Patienten. Frauen sind aufgrund der X-chromosomalen Vererbung weniger stark betroffen. In den Neuronen ist wenig bis keine FMRP-mRNA nachweisbar und entsprechend auch kein FMRP (Penagarikano et al., 2007). Klinisch zeigt sich ein breites Spektrum an kognitiven Störungen, die vor allem das visuelle Gedächtnis sowie das Kurzzeitgedächtnis betreffen. Dazu kommen psychiatrische Symptome wie Phobien oder atypisches Sozialverhalten. Der Intelligenzquotient von Männern mit einer Vollmutation liegt bei durchschnittlich 40. Typische somatische Symptome sind ein langes Gesicht und große Ohren. Zusätzlich treten in bis zu 20% der Fälle epileptische Anfälle auf (Garber et al., 2008; Tolino et al., 2012).

Das Fragile-X-Syndrom wird für bis zu 5% der Fälle autistischer Störungen verantwortlich gemacht, die häufig mit anderen syndromalen Erkrankungen einhergehen. Klassischerweise zeigen autistische Patienten eine Trias aus Störungen

des Sozialverhaltens, Sprachdefiziten und stereotypischen Verhaltensweisen (Abrahams et al., 2008).

Auch für die zwei neurodegenerativen Erkrankungen amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und frontotemporale Demenz (FTD) konnten Funktionsstörungen von RBPs als mögliche Ursachen nachgewiesen werden (Tolino et al., 2012). ALS ist gekennzeichnet durch einen rasch progredienten Verlust von Motorneuronen, der zumeist innerhalb von 3-5 Jahren ab Symptombeginn zum Tod führt (Grad et al., 2017). Dabei sind sowohl das erste als auch das zweite Motorneuron betroffen. Frühe Symptome sind meist unspezifisch, dazu gehören Muskelkrämpfe und -faszikulationen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer distal beginnenden Schwäche der Muskulatur, die zu einem Verlust der Gehfähigkeit führt und final auch die Atemmuskulatur betrifft. Parallel treten häufig auch psychiatrische Symptome auf (Grad et al., 2017; Hulisz, 2018). FTD ist nach der Alzheimerdemenz die zweithäufigste Demenzform bei Patienten mit einem Symptombeginn vor dem 65. Lebensjahr (Vieira et al., 2013). Sie geht einher mit einer betonten Atrophie der Frontal- und Temporallappen und manifestiert sich klinisch hauptsächlich durch Persönlichkeits- und Verhaltensänderungen sowie Sprach- und Gedächtnisstörungen (Devenney et al., 2019). Es hat sich gezeigt, dass ALS und FTD zwei klinisch überlappende Erkrankungen darstellen, die mit Mutationen in den beiden mRNA-bindenden Proteinen FUS (*Fused in sarcoma*) und TDP-43 (*TAR DNA-binding protein of 43 kDa*) einhergehen (Lagier-Tourenne et al., 2010). Beide Proteine konnten in den Spines nachgewiesen werden. FUS erscheint wichtig für die Verzweigung von Dendriten sowie für die Morphogenese der Spines (Fujii et al., 2005). TDP-43 ist beteiligt am mRNA-Transport sowie an der Translationskontrolle in den Dendriten (Wang et al., 2008). Im Rahmen der beiden Erkrankungen scheinen beide Proteine im Zytoplasma zu akkumulieren (Neumann et al., 2006; Liu-Yesucevitz et al., 2011). Dabei ist es noch Gegenstand aktueller Forschungen, in welchem Verhältnis und Umfang der Funktionsverlust zum einen und die Proteinablagerungen zum anderen zur Entstehung der beiden Krankheiten beitragen (Liu-Yesucevitz et al., 2011).

Eine weitere Erkrankung mit wahrscheinlicher Beteiligung eines RBP ist die spinale Muskelatrophie, eine hereditäre Krankheit mit progredientem Untergang von

Vorderhornzellen im Rückenmark und der häufigsten genetischen Ursache von Kindstod (Tolino et al., 2012).

4.5 Staufen2 und FMRP

Das Fragile-X-Syndrom und damit das Fehlen von FMRP in den Neuronen geht mit einer erhöhten Spinedichte sowie verlängerten, unreifen Spines einher (He et al., 2013). Im Vergleich zu den hier vorgestellten *Stau2^{KD}*-Tieren zeigt sich somit ein umgekehrter Effekt. FMRP ist wie auch *Stau2* am mRNA-Transport und der Translationskontrolle an den Synapsen beteiligt (Dichtenberg et al., 2008). Zu den von FMRP transportierten und regulierten mRNAs zählen eine Reihe von Proteinen, die wichtig für eine regelrechte synaptische Funktion sind, darunter MAP1B, CaMKII α , PSD-95 und vor allem auch FMRP selbst (Antar et al., 2005; Zalfa et al., 2007; Kao et al., 2010). Diesbezüglich ergibt sich hier eine weitere Überlappung zu *Stau2*. Eine wichtige Funktion von FMRP wird der Translationskontrolle zugeschrieben, da es assoziiert mit Polyribosomen auftritt (Darnell et al., 2011). Primär scheint FMRP dabei als ein Inhibitor der Translation zu fungieren (Laggebauer et al., 2001). So werden unter anderem die Translation der Proteine MAP1B, CaMKII α und *Arc* gehemmt (Zalfa et al., 2003). Durch synaptische Aktivität kann die Hemmung jedoch aufgehoben werden (Narayanan et al., 2008). Das Fehlen von FMRP wie im Fragilen-X-Syndrom führt daher zu einer vermehrten und beschleunigten Translation, die in der Folge für die kognitiven Beeinträchtigungen verantwortlich gemacht wird (Darnell et al., 2011). In Bezug auf die synaptische Plastizität wird für FMRP eine starke Interaktion mit der aktivitätsabhängigen Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren (mGluR) angenommen. Die Aktivierung dieser Rezeptoren im Rahmen einer LTD kumuliert schlussendlich in der Biosynthese für die LTD wichtiger Proteine (Huber et al., 2002). Zusätzlich wird aber auch die Bildung von FMRP selbst getriggert, das die mGluR-abhängige Translation hemmt und somit die LTD bremst (Krueger et al., 2011). Die Funktion von FMRP kann in Bezug auf die BCM-Theorie somit als eine Regulation der Modifikationsschwelle im Sinne einer Verschiebung nach links mit einer Begünstigung einer LTP verstanden werden. Dies erklärt auch die zuvor beschriebene vermehrte Translation in Abwesenheit von FMRP (Huber et al., 2002).

Im Vergleich mit Stau2 ergibt sich die beschriebene Überschneidung bezüglich der transportierten mRNAs, wie PSD-95, MAP1B und CaMKII α . Im Übrigen scheinen sich die beiden RBPs in ihren Rollen im Rahmen der synaptischen Plastizität eher gegensätzlich gegenüberzustehen. Wie in Abschnitt 1.5.3 auf Seite 25 bereits erwähnt gilt Stau2 eher als ein Aktivator der Translation und ist an der Induktion einer LTD beteiligt. Auch die morphologischen Veränderungen bei fehlendem Stau2 bzw. FMRP sind gegensätzlich. Ein Vergleich der beiden Proteine scheint dennoch interessant, da eine antagonistische Rolle beider Proteine in der Regulation von LTP und LTD möglich erscheint. Dafür spricht unter anderem die in Abschnitt 4.3 dargestellte mögliche Rolle von Stau2 bei der Anpassung der Modifikationsschwelle. Zusätzlich ergeben sich Hinweise für eine mögliche Interaktion beider Proteine. In der Fruchtfliege werden Stau2 und FMRP zusammen für die Formierung des Langzeitgedächtnisses benötigt (Bolduc et al., 2008). In neuronalen Zellkulturen mit fehlendem Stau2 zeigen sich ERK 1 und 2 deutlich missreguliert (Heraud-Farlow et al., 2013). ERK 1 und 2 werden zusammen mit mTOR für die Phosphorylierung und hierdurch bedingte Aktivierung von FMRP benötigt (Narayanan et al., 2008). Außerdem lässt sich FMRP neben anderen RBPs in Stau2-Ribonukleinprotein-Partikeln nachweisen (Fritzsche et al., 2013).

4.6 Schlussfolgerungen

Das Fehlen von Stau2 in den Neuronen des Hippocampus geht mit morphologischen Veränderungen im Sinne einer reduzierten Spinedichte und verkürzter Spines einher. Zusätzlich zeigt sich eine verringerte Fähigkeit zur LTD und eine vermehrte LTP. In Verhaltenstest zeigten die Versuchstiere eine Verschlechterung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses sowie des Assoziationsgedächtnisses.

In Zusammenschau mit den im Rahmen dieser Diskussion vorgestellten Studien lässt dies den Schluss zu, dass Stau2 als mRNA-bindendes Protein eine wichtige Rolle im Rahmen der synaptischen Plastizität spielt. Die genaue Integration in die sehr vielfältigen Schaltkreise, die an der neuronalen Repräsentation von Lernen und Gedächtnis beteiligt sind, bleibt jedoch weiterhin nur zu einem geringen Teil verstanden. Stau2 zeigt eine Assoziation zur LTD und aufgrund seiner Funktion als RBP ist eine Rolle in der späten, proteinsynthese-abhängigen Phase der

LTD wahrscheinlich. Mögliche Fragen für zukünftige Studien betreffen zum einen die Interaktion von Stau2 mit PSD-95 sowie MAP1B und einer möglichen Rolle im Rahmen der Synaptogenese und Stabilisierung der Spines. Zum anderen sollte auch die mögliche regulatorische Rolle von Stau2 im Sinne der aktivitätsabhängigen Anpassung der Modifikationsschwelle weiter untersucht werden. Diesbezüglich ist der Vergleich zwischen Stau2 und FMRP interessant, da FMRP eines der wohl am besten erforschten RBPs darstellt. Obwohl beide Proteine insgesamt eher antagonistische Funktionen aufzuweisen scheinen, ergeben sich aus dem Wissen über FMRP neue Untersuchungsansätze, um die genaue Beteiligung von Stau2 zu verstehen. Betrachtet man die nachgewiesenen Gedächtnisstörungen der Stau2^{KD}-Tiere und die schweren kognitiven Störungen, die das Fehlen von FMRP im Rahmen des Fragilen-X-Syndroms verursacht, so ergibt sich die Frage, nach dem Krankheitswert, der sich durch ein Fehlen bzw. eine Dysregulation von Stau2 ergibt. Dahingehend wäre es interessant zu klären, ob dies auch beim Menschen zu merkbaren Symptomen oder Einschränkungen führt oder ob Stau2 nicht sogar an bereits bekannten neurologischen Erkrankungen beteiligt ist.

Ein genaueres Verständnis über eine Beteiligung von RBPs, wie bspw. Stau2 oder FMRP, an der Pathogenese neurologischer Erkrankungen kann so zukünftig möglicherweise neue Therapieansätze für diese bisher meist unheilbaren und oft tödlich verlaufenden Krankheiten bieten.

Das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell mit der Möglichkeit eines konditionalen Knockdowns von Stau2 durch die Injektion von Tamoxifen erlaubt es die Funktionen von Stau2 in adulten Tieren zu untersuchen, die eine regelrechte neuronale Entwicklung durchlaufen haben. Es bietet sich daher für weitere Untersuchungen bezüglich des Zusammenhanges zwischen Stau2 und plastischen Veränderungen in den Neuronen an. Außerdem erscheint es auch auf andere Gene übertragbar und könnte somit zukünftig als Basis für eine ganze Reihe von neuen Forschungsfragen dienen, nicht nur im Bereich der Neurowissenschaften.

Zusammenfassung

Staufen2 ist ein mRNA-bindendes Protein (RBP), das in Säugetieren vor allem cerebral exprimiert wird und an der neuronalen Plastizität innerhalb des Hippocampus beteiligt ist. RBPs spielen dabei eine wichtige Rolle in der strengen örtlichen und zeitlichen Regulation der neuroplastischen Vorgänge.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen eines Knockdowns von Staufen2 auf die Morphologie von Dendriten und dendritischen Dornen im Hippocampus der Ratte erstmalig in-vivo zu untersuchen. Als Grundlage dienten transgene Ratten, in denen durch Tamoxifen-Injektion ein RNA-Interferenz-Mechanismus zum Knockdown von Staufen2 aktiviert werden konnte. Die maximale Wirkung zeigte sich in der CA1-Region des Hippocampus, die in der Folge zum Gegenstand der weiteren Untersuchungen genutzt wurde. Mithilfe der Golgi-Cox-Silberimprägnierung konnte gezeigt werden, dass die Spinelänge und die Spinedichte in der apikalen CA1-Region in den Knockout-Tieren signifikant geringer waren. In den basalen Anteilen sowie bei der Morphologie des Dendritenbaums waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass diese Tiere Defizite im räumlichen Arbeitsgedächtnis sowie im räumlichen und zeitlichen Assoziationsgedächtnis haben. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass das normalerweise ausgewogene Verhältnis zwischen LTP und LTD zugunsten der LTP verschoben erscheint.

Mit seiner Funktion als RBP und einer Assoziation der LTD scheint Staufen2 eine Rolle in der späten, proteinsynthese-abgängigen Phase der LTD zu spielen, wobei die genauen Funktionsweisen des Proteins weiterhin nicht vollständig verstanden sind. Neben Staufen2 gibt es eine Reihe weitere RBPs mit wichtigen Funktionen innerhalb der neuronalen Plastizität. Einige davon sind mit schweren neurologischen Krankheitsbildern wie dem Fragilen-X-Syndrom, Autismus-Spektrum-Störungen, amyotropher Lateralsklerose und frontotemporaler Demenz assoziiert. Ein besseres Verständnis der RBPs im Allgemeinen und von Staufen2 im Besonderen kann somit zukünftig zu einem besseren Verständnis von Lernen und Gedächtnis sowie der Pathogenese schwerer neurologischer Erkrankungen beitragen und möglicherweise auch zu neuen Therapiemöglichkeiten führen.

Literaturverzeichnis

- Abraham WC. (2008). *Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity*. Nat Rev Neurosci, 9(5):387–387.
- Abrahams BS, Geschwind DH. (2008). *Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology*. Nat Rev Genet, 9(5):341–355.
- Allison R, Czaplinski K, Git A, Adegbenro E, Stennard F, Houlston E, Standart N. (2004). *Two distinct Staufen isoforms in Xenopus are vegetally localized during oogenesis*. Rna, 10(11):1751–1763.
- Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne B. (1990). *Neurons, numbers and the hippocampal network*. Prog Brain Res, 83:1–11.
- Antar LN, Dictenberg JB, Plociniak M, Afroz R, Bassell GJ. (2005). *Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons*. Genes Brain Behav, 4(6):350–359.
- Ashby MC, Maier SR, Nishimune A, Henley JM. (2006). *Lateral Diffusion Drives Constitutive Exchange of AMPA Receptors at Dendritic Spines and Is Regulated by Spine Morphology*. J Neurosci, 26(26):7046–7055.
- Banko JL. (2006). *Regulation of Eukaryotic Initiation Factor 4E by Converging Signaling Pathways during Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Long-Term Depression*. Journal of Neuroscience, 26(8):2167–2173.
- Banko JL, Hou L, Klann E. (2004). *NMDA receptor activation results in PKA- and ERK-dependent Mnk1 activation and increased eIF4E phosphorylation in hippocampal area CA1*. J Neurochem, 91(2):462–470.
- Banko JL, Poulin F, Hou L, DeMaria CT, Sonenberg N, Klann E. (2005). *The Translation Repressor 4E-BP2 Is Critical for eIF4F Complex Formation, Synaptic Plasticity, and Memory in the Hippocampus*. J Neurosci, 25(42):9581–9590.
- Barlan K, Gelfand VI. (2017). *Microtubule-Based Transport and the Distribution, Tethering, and Organization of Organelles*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 9(5):a025817-14.
- Barria A, Derkach V, Soderling T. (1997). *Identification of the Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Regulatory Phosphorylation Site in the α -Amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type Glutamate Receptor**. J Biol Chem, 272(52):32727–32730.
- Bartsch T, Dohring J, Rohr A, Jansen O, Deuschl G. (2011). *CA1 neurons in the human hippocampus are critical for autobiographical memory, mental time travel, and auto-noetic consciousness*. Proc Natl Acad Sci USA, 108(42):17562–17567.
- Bassell GJ, Warren ST. (2008). *Fragile X Syndrome: Loss of Local mRNA Regulation Alters Synaptic Development and Function*. Neuron, 60(2):201–214.
- Basu J, Siegelbaum SA. (2015). *The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 7(11):a021733-27.

- Basu J, Srinivas KV, Cheung SK, Taniguchi H, Huang ZJ, Siegelbaum SA. (2013). *A Cortico-Hippocampal Learning Rule Shapes Inhibitory Microcircuit Activity to Enhance Hippocampal Information Flow*. *Neuron*, 79(6):1208–1221.
- Batish M, Bogaard P van den, Kramer FR, Tyagi S. (2012). *Neuronal mRNAs travel singly into dendrites*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(12):4645–4650.
- Bats C, Groc L, Choquet D. (2007). *The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking*. *Neuron*, 53(5):719–734.
- Bear MF. (1996). *A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex*. *Proc National Acad Sci*, 93(24):13453–13459.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. (2015). *NEUROSCIENCE: Exploring the Brain, Fourth Edition*.
- Beattie EC, Carroll RC, Yu X, Morishita W, Yasuda H, Zastrow M von, Malenka RC. (2000). *Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD*. *Nat Neurosci*, 3(12):1291–1300.
- Bello B, Reichert H, Hirth F. (2006). *The brain tumor gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the larval central brain of Drosophila*. *Development*, 133(14):2639–2648.
- Benoist M, Palenzuela R, Rozas C, Rojas P, Tortosa E, Morales B, González-Billault C, Ávila J, Esteban JA. (2013). *MAP1B-dependent Rac activation is required for AMPA receptor endocytosis during long-term depression*. *Embo J*, 32(16):2287–2299.
- Berger SM, Fernández-Lamo I, Schönig K, Moya SMF, Ehses J, Schieweck R, Clementi S, Enkel T, Grothe S, von-Bohlen-und-Halbach O, Segura I, Delgado-García JM, Gruart A, Kiebler MA, Bartsch D. (2017). *Forebrain-specific, conditional silencing of Stauf2 alters synaptic plasticity, learning, and memory in rats*. *Genome Biol*, 18(1):222.
- Berleth T, Burri M, Thoma G, Bopp D, Richstein S, Frigerio G, Noll M, Nüsslein-Volhard C. (1988). *The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the Drosophila embryo*. *Embo J*, 7(6):1749–1756.
- Berlucchi G, Buchtel HA. (2008). *Neuronal plasticity: historical roots and evolution of meaning*. *Exp Brain Res*, 192(3):307–319.
- Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA. (2006). *Asymmetric Segregation of the Tumor Suppressor Brat Regulates Self-Renewal in Drosophila Neural Stem Cells*. *Cell*, 124(6):1241–1253.
- Bienenstock E, Cooper L, Munro P. (1982). *Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex*. *J Neurosci*, 2(1):32–48.
- Boccaro CN, Kjonigsen LJ, Hammer IM, Bjaalie JG, Leergaard TB, Witter MP. (2015). *A three-plane architectonic atlas of the rat hippocampal region*. *Hippocampus*, 25(7):838–857.
- Bolduc FV, Bell K, Cox H, Broadie KS, Tully T. (2008). *Excess protein synthesis in Drosophila Fragile X mutants impairs long-term memory*. *Nat Neurosci*, 11(10):1143–1145.

- Bramham CR, Wells DG. (2007). *Dendritic mRNA: transport, translation and function*. Nature Reviews Neuroscience, 8(10):776–789.
- Brevini TAL, Cillo F, Antonini S, Gandolfi F. (2007). *Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes*. Anim Reprod Sci, 98(1–2):23–38.
- Broadus J, Doe CQ. (1997). *Extrinsic cues, intrinsic cues and microfilaments regulate asymmetric protein localization in Drosophila neuroblasts*. Curr Biol, 7(11):827–835.
- Broadus J, Fuerstenberg S, Doe CQ. (1998). *Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate*. Nature, 391(6669):792–795.
- Buchner G, Bassi MT, Andolfi G, Ballabio A, Franco B. (1999). *Identification of a Novel Homolog of the Drosophila staufen Protein in the Chromosome 8q13–q21.1 Region*. Genomics, 62(1):113–118.
- Buzsáki G, Moser EI. (2013). *Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system*. Nat Neurosci, 16(2):130–138.
- Cajigas IJ, Tushev G, Will TJ, Dieck S tom, Fuerst N, Schuman EM. (2012). *The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging*. Neuron, 74(3):453–466.
- Calder MD, Madan P, Watson AJ. (2007). *Bovine oocytes and early embryos express Staufen and ELAVL RNA-binding proteins*. Zygote, 16(2):161–168.
- Caroni P, Chowdhury A, Lahr M. (2014). *Synapse rearrangements upon learning: from divergent–sparse connectivity to dedicated sub-circuits*. Trends Neurosci, 37(10):604–614.
- Casadio A, Martin KC, Giustetto M, Zhu H, Chen M, Bartsch D, Bailey CH, Kandel ER. (1999). *A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis*. Cell, 99(2):221–237.
- Chatterjee S, Pal JK. (2012). *Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases*. Biology of the Cell, 101(5):251–262.
- Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS, Nicoll RA. (2000). *Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms*. Nature, 408(6815):936–943.
- Chevaleyre V, Siegelbaum SA. (2010). *Strong CA2 Pyramidal Neuron Synapses Define a Powerful Disynaptic Cortico-Hippocampal Loop*. Neuron, 66(4):560–572.
- Choksi SP, Southall TD, Bossing T, Edoff K, Wit E de, Fischer BE, Steensel B van, Micklem G, Brand AH. (2006). *Prospero Acts as a Binary Switch between Self-Renewal and Differentiation in Drosophila Neural Stem Cells*. Dev Cell, 11(6):775–789.
- Conde C, Cáceres A. (2009). *Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites*. Nature Reviews Neuroscience, 10(5):319–332.
- Cooper LN, Bear MF. (2012). *The BCM theory of synapse modification at 30: interaction of theory with experiment*. Nat Rev Neurosci, 13(11):798–810.

- Cooper TA, Wan L, Dreyfuss G. (2009). *RNA and Disease*. Cell, 136(4):777–793.
- Costa-Mattioli M, Sossin WS, Klann E, Sonenberg N. (2009). *Translational Control of Long-Lasting Synaptic Plasticity and Memory*. Neuron, 61(1):10–26.
- Cramer SC, Sur M, Dobkin BH, O'Brien C, Sanger TD, Trojanowski JQ, Rumsey JM, Hicks R, Cameron J, Chen D, Chen WG, Cohen LG, deCharms C, Duffy CJ, Eden GF, Fetz EE, Filart R, Freund M, Grant SJ, Haber S, Kalivas PW, Kolb B, Kramer AF, Lynch M, Mayberg HS, McQuillen PS, Nitkin R, Pascual-Leone A, Reuter-Lorenz P, Schiff N, Sharma A, Shekim L, Stryker M, Sullivan EV, Vinogradov S. (2011). *Harnessing neuroplasticity for clinical applications*. Brain, 134(6):1591–1609.
- Crawford DC, Acuña JM, Sherman SL. (2001). *FMR1 and the fragile X syndrome: Human genome epidemiology review*. Genet Med, 3(5):359–371.
- Dahm R, Kiebler M. (2005). *Cell biology: silenced RNA on the move*. Nature, 438(7067):432–435.
- Darnell JC, Richter JD. (2012). *Cytoplasmic RNA-Binding Proteins and the Control of Complex Brain Function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 4(8):a012344–a012344.
- Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KYS, Mele A, Fraser CE, Stone EF, Chen C, Fak JJ, Chi SW, Licatalosi DD, Richter JD, Darnell RB. (2011). *FMRP Stalls Ribosomal Translocation on mRNAs Linked to Synaptic Function and Autism*. Cell, 146(2):247–261.
- Darnell RB. (2013). *RNA Protein Interaction in Neurons*. Annu Rev Neurosci, 36(1):243–270.
- Davis L, Banker GA, Steward O. (1987). *Selective dendritic transport of RNA in hippocampal neurons in culture*. Nature, 330(6147):477–479.
- De Roo M, Klauser P, Mendez P, Poglia L, Muller D. (2008). *Activity-Dependent PSD Formation and Stabilization of Newly Formed Spines in Hippocampal Slice Cultures*. Cereb Cortex, 18(1):151–161.
- Dedovic K, Duchesne A, Andrews J, Engert V, Pruessner JC. (2009). *The brain and the stress axis: The neural correlates of cortisol regulation in response to stress*. NeuroImage, 47(3):864–871.
- DeFelipe J. (2006). *Brain plasticity and mental processes: Cajal again*. Nature Reviews Neuroscience, 7(10):811–817.
- Devenney EM, Ahmed RM, Hodges JR. (2019). *Frontotemporal dementia*. Handb Clin Neurology, 167:279–299.
- Dictenberg JB, Swanger SA, Antar LN, Singer RH, Bassell GJ. (2008). *A Direct Role for FMRP in Activity-Dependent Dendritic mRNA Transport Links Filopodial-Spine Morphogenesis to Fragile X Syndrome*. Dev Cell, 14(6):926–939.
- Diering GH, Haganir RL. (2018). *The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity*. Neuron, 100(2):314–329.

- Doe CQ, Chu-LaGraff Q, Wright DM, Scott MP. (1991). *The prospero gene specifies cell fates in the drosophila central nervous system*. Cell, 65(3):451–464.
- Dougherty KA, Nicholson DA, Diaz L, Buss EW, Neuman KM, Chetkovich DM, Johnston D. (2013). *Differential expression of HCN subunits alters voltage-dependent gating of h-channels in CA1 pyramidal neurons from dorsal and ventral hippocampus*. Journal of Neurophysiology, 109(7):1940–1953.
- Doyle M, Kiebler MA. (2011). *Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging*. EMBO J, 30(17):3540–3552.
- Driever W, Nüsslein-Volhard C. (1988). *A gradient of bicoid protein in Drosophila embryos*. Cell, 54(1):83–93.
- Dubnau J, Chiang A-S, Grady L, Barditch J, Gossweiler S, McNeil J, Smith P, Buldoc F, Scott R, Certa U, Broger C, Tully T. (2003). *The staufer/pumilio Pathway Is Involved in Drosophila Long-Term Memory*. Curr Biol, 13(4):286–296.
- Duchaîne TF, Hemraj I, Furic L, Deitinghoff A, Kiebler MA, DesGroseillers L. (2002). *Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles*. J Cell Sci, 115(16):3285–3295.
- Dudman JT, Tsay D, Siegelbaum SA. (2007). *A Role for Synaptic Inputs at Distal Dendrites: Instructive Signals for Hippocampal Long-Term Plasticity*. Neuron, 56(5):866–879.
- Duncan K, Ketz N, Inati SJ, Davachi L. (2011). *Evidence for area CA1 as a match/mismatch detector: A high-resolution fMRI study of the human hippocampus*. Hippocampus, 22(3):389–398.
- Dynes JL, Steward O. (2006). *Dynamics of bidirectional transport of Arc mRNA in neuronal dendrites*. J Comp Neurol, 500(3):433–447.
- Ehrlich I, Klein M, Rumpel S, Malinow R. (2007). *PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization*. Proc National Acad Sci, 104(10):4176–4181.
- Eichenbaum H, Cohen NJ. (2014). *Can We Reconcile the Declarative Memory and Spatial Navigation Views on Hippocampal Function?* Neuron, 83(4):764–770.
- El-Husseini AE-D, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS. (2000). *PSD-95 Involvement in Maturation of Excitatory Synapses*. Science, 290(5495):1364–1368.
- Ergorul C. (2004). *The Hippocampus and Memory for 'What,' 'Where,' and 'When'*. Learning & Memory, 11(4):397–405.
- Falougy HE, Benuska J. (2006). *History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation*. Bratisl Lek Listy, 107(4):103–106.
- Fanselow MS, Dong H-W. (2010). *Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures?* Neuron, 65(1):7–19.
- Fatimy RE, Davidovic L, Tremblay S, Jaglin X, Dury A, Robert C, Koninck PD, Khandjian EW. (2016). *Tracking the Fragile X Mental Retardation Protein in a Highly Ordered Neuronal RiboNucleoParticles Population: A Link between*

- Stalled Polyribosomes and RNA Granules*. In: Darnell JC (ed) PLoS Genet, 12(7):e1006192-31.
- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. (1997). *Regulation of Cre Recombinase Activity by Mutated Estrogen Receptor Ligand-Binding Domains*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 237(3):752–757.
- Fernández-Moya SM, Bauer KE, Kiebler MA. (2014). *Meet the players: local translation at the synapse*. Front Mol Neurosci, 7(22):84.
- Ferreira FRM, Nogueira MI, DeFelipe J. (2014). *The influence of James and Darwin on Cajal and his research into the neuron theory and evolution of the nervous system*. Front Neuroanat, 8.
- Fiala JC, Spacek J, Harris KM. (2002). *Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders?* Brain Res Brain Res Rev, 39(1):29–54.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. (2008). *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet, 2008(2):102–114.
- Frey U, Krug M, Brödemann R, Reymann K, Matthies H. (1989). *Long-term potentiation induced in dendrites separated from rat's CA1 pyramidal somata does not establish a late phase*. Neurosci Lett, 97(1–2):135–139.
- Frey U, Morris RG. (1997). *Synaptic tagging and long-term potentiation*. Nature, 385(6616):533–536.
- Frey U, Morris RG. (1998). *Weak before strong: dissociating synaptic tagging and plasticity-factor accounts of late-LTP*. Neuropharmacology, 37(4–5):545–552.
- Fritzsche R, Karra D, Bennett KL, Ang F yee, Heraud-Farlow JE, Tolino M, Doyle M, Bauer KE, Thomas S, Planyavsky M, Arn E, Bakosova A, Jungwirth K, Hörmann A, Palfi Z, Sandholzer J, Schwarz M, Macchi P, Colinge J, Superti-Furga G, Kiebler MA. (2013). *Interactome of two diverse RNA granules links mRNA localization to translational repression in neurons*. CellReports, 5(6):1749–1762.
- Fujii R, Okabe S, Urushido T, Inoue K, Yoshimura A, Tachibana T, Nishikawa T, Hicks GG, Takumi T. (2005). *The RNA Binding Protein TLS Is Translocated to Dendritic Spines by mGluR5 Activation and Regulates Spine Morphology*. Curr Biol, 15(6):587–593.
- Fujita A, Kurachi Y. (2000). *SAP Family Proteins*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 269(1):1–6.
- Furic L, Maher-Laporte M, DesGroseillers L. (2007). *A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes*. Rna New York N Y, 14(2):324–35.
- Gallagher C, Ramos A. (2018). *Joining the dots – protein-RNA interactions mediating local mRNA translation in neurons*. FEBS Letters, 592(17):2932–2947.
- Gao Y, Tatavarty V, Korza G, Levin MK, Carson JH. (2008). *Multiplexed dendritic targeting of alpha calcium calmodulin-dependent protein kinase II, neurogranin, and activity-regulated cytoskeleton-associated protein RNAs by the A2 pathway*. In: Weis K (ed) Mol Biol Cell, 19(5):2311–2327.

- Garber KB, Visootsak J, Warren ST. (2008). *Fragile X syndrome*. Eur J Hum Genet, 16(6):666–672.
- Garcia-Segura LM, Perez-Marquez J. (2014). *A new mathematical function to evaluate neuronal morphology using the Sholl analysis*. Journal of Neuroscience Methods, 226:103–109.
- Gavis ER. (1997). *Expeditions to the pole: RNA localization in Xenopus and Drosophila*. Trends Cell Biol, 7(12):485–492.
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. (1999). *eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation*. Annu Rev Biochem, 68(1):913–963.
- Gispén WH. (1993). *Neuronal Plasticity and Function*. Clin Neuropharmacol, 16:S5.
- Glaser EM, Loos HV der. (1981). *Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain*. J Neurosci Methods, 4(2):117–125.
- Goetze B, Tuebing F, Xie Y, Dorostkar MM, Thomas S, Pehl U, Boehm S, Macchi P, Kiebler MA. (2006). *The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Stauf2 is required for dendritic spine morphogenesis*. J Cell Biol, 172(2):221–231.
- Grad LI, Rouleau GA, Ravits J, Cashman NR. (2017). *Clinical Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)*. Csh Perspect Med, 7(8):a024117.
- Graeve FD, Besse F. (2018). *Neuronal RNP granules: from physiological to pathological assemblies*. Biological Chemistry, 399(7):623–635.
- Groen T van, Wyss JM. (1990). *Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections*. J Comp Neurol, 302(3):515–528.
- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser M-B, Moser EI. (2005). *Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex*. Nature, 436(7052):801–806.
- Halpain S, Dehmelt L. (2006). *The MAP1 family of microtubule-associated proteins*. Genome Biol, 7(6):224–224.
- Harris KM, Jensen FE, Tsao B. (1992). *Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation*. Journal of Neuroscience, 12(7):2685–2705.
- He CX, Portera-Cailliau C. (2013). *The trouble with spines in fragile X syndrome: density, maturity and plasticity*. Neuroscience, 251:120–128.
- He Y, Kulasiri D, Samarasinghe S. (2014). *Systems biology of synaptic plasticity: A review on N-methyl-D-aspartate receptor mediated biochemical pathways and related mathematical models*. BioSystems, 122:7–18.
- Heraud-Farlow JE, Kiebler MA. (2014). *The multifunctional Stauf proteins: conserved roles from neurogenesis to synaptic plasticity*. Trends Neurosci, 37(9):470–479.
- Heraud-Farlow JE, Sharangdhar T, Li X, Pfeifer P, Tauber S, Orozco D, Hörmann A, Thomas S, Bakosova A, Farlow AR, Edbauer D, Lipshitz HD, Morris

- QD, Bilban M, Doyle M, Kiebler MA. (2013). *Staufen2 Regulates Neuronal Target RNAs*. Cell Reports, 5(6):1511–1518.
- Hollmann M, Heinemann S. (1994). *Cloned Glutamate Receptors*. Annu Rev Neurosci, 17(1):31–108.
- Homem CCF, Knoblich JA. (2012). *Drosophila neuroblasts: a model for stem cell biology*. Development, 139(23):4297–4310.
- Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, Ellis-Davies GCR, Kasai H. (2008). *The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines*. Neuron, 57(5):719–729.
- Hotulainen P, Hoogenraad CC. (2010). *Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function*. J Cell Biol, 189(4):619–629.
- Hu X, Viesselmann C, Nam S, Merriam E, Dent EW. (2008). *Activity-Dependent Dynamic Microtubule Invasion of Dendritic Spines*. Journal of Neuroscience, 28(49):13094–13105.
- Huber KM, Gallagher SM, Warren ST, Bear MF. (2002). *Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation*. Proc National Acad Sci, 99(11):7746–7750.
- Huber KM, Kayser MS, Bear MF. (2000). *Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression*. Science, 288(5469):1254–1257.
- Hulisz D. (2018). *Amyotrophic lateral sclerosis: disease state overview*. Am J Managed Care, 24(15 Suppl):S320–S326.
- Hüttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH. (2005). *Spatial regulation of β -actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1*. Nature, 438(7067):512–515.
- Hutten S, Sharangdhar T, Kiebler M. (2014). *Unmasking the messenger*. RNA Biology, 11(8):992–997.
- Igarashi KM. (2016). *The entorhinal map of space*. Brain Res, 1637(C):177–187.
- Insausti R. (1993). *Comparative anatomy of the entorhinal cortex and hippocampus in mammals*. Hippocampus, 3 Spec No:19–26.
- Ishikawa A, Nakamura S. (2006). *Ventral Hippocampal Neurons Project Axons Simultaneously to the Medial Prefrontal Cortex and Amygdala in the Rat*. Journal of Neurophysiology, 96(4):2134–2138.
- Jacquemont S, Hagerman RJ, Hagerman PJ, Leehey MA. (2007). *Fragile-X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of FMR1*. Lancet Neurology, 6(1):45–55.
- James W. (2007). *The Principles of Psychology*. Cosimo, Inc. (Cosimo, Inc.).
- Jarsky T, Mady R, Kennedy B, Spruston N. (2008). *Distribution of bursting neurons in the CA1 region and the subiculum of the rat hippocampus*. Journal of Comparative Neurology, 506(4):535–547.
- Jaworski J, Kapitein LC, Gouveia SM, Dortland BR, Wulf PS, Grigoriev I, Camera P, Spangler SA, Stefano PD, Demmers J, Krugers H, Defilippi P,

- Akhmanova A, Hoogenraad CC. (2009). *Dynamic Microtubules Regulate Dendritic Spine Morphology and Synaptic Plasticity*. *Neuron*, 61(1):85–100.
- Jia M, Shan Z, Yang Y, Liu C, Li J, Luo Z-G, Zhang M, Cai Y, Wen W, Wang W. (2015). *The structural basis of Miranda-mediated Staufen localization during Drosophila neuroblast asymmetric division*. *Nat Commun*, 6(1):8381.
- Jones EG. (1994). *The neuron doctrine 1891*. *Journal of the History of the Neurosciences*, 3(1):3–20.
- Jourdain P, Fukunaga K, Muller D. (2003). *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to activity-dependent filopodia growth and spine formation*. *J Neurosci*, 23(33):10645–10649.
- Jung MW, Wiener SI, McNaughton BL. (1994). *Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat*. *Journal of Neuroscience*, 14(12):7347–7356.
- Jung M-Y, Lorenz L, Richter JD. (2006). *Translational Control by Neuroguidin, a Eukaryotic Initiation Factor 4E and CPEB Binding Protein*. *Molecular and Cellular Biology*, 26(11):4277–4287.
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. (2004). *Kinesin Transports RNA*. *Neuron*, 43(4):513–525.
- Kandel ER. (2001). *The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses*. *Science*, 294(5544):1030–1038.
- Kang H, Schuman EM. (1996). *A Requirement for Local Protein Synthesis in Neurotrophin-Induced Hippocampal Synaptic Plasticity*. *Science*, 273(5280):1402–1406.
- Kao D-I, Aldridge GM, Weiler IJ, Greenough WT. (2010). *Altered mRNA transport, docking, and protein translation in neurons lacking fragile X mental retardation protein*. *Proc National Acad Sci*, 107(35):15601–15606.
- Kelleher RJ, Govindarajan A, Tonegawa S. (2004). *Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity*. *Neuron*, 44(1):59–73.
- Kemp A, Manahan-Vaughan D. (2004). *Hippocampal long-term depression and long-term potentiation encode different aspects of novelty acquisition*. *P Natl Acad Sci Usa*, 101(21):8192–8197.
- Kennedy MJ, Ehlers MD. (2006). *Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity*. *Annu Rev Neurosci*, 29(1):325–362.
- Kiebler MA, Bassell GJ. (2006). *Neuronal RNA Granules: Movers and Makers*. *Neuron*, 51(6):685–690.
- Kiebler MA, Hemraj I, Verkade P, Köhrmann M, Fortes P, Marión RM, Ortín J, Dotti CG. (1999). *The Mammalian Staufen Protein Localizes to the Somatodendritic Domain of Cultured Hippocampal Neurons: Implications for Its Involvement in mRNA Transport*. *J Neurosci*, 19(1):288–297.
- Kim E, Sheng M. (2004). *PDZ domain proteins of synapses*. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(10):771–781.
- Kim YK, Furic L, DesGroseillers L, Maquat LE. (2005). *Mammalian Staufen1 Recruits Upf1 to Specific mRNA 3'UTRs so as to Elicit mRNA Decay*. *Cell*, 120(2):195–208.

- Kim-Ha J, Smith JL, Macdonald PM. (1991). *oskar mRNA is localized to the posterior pole of the Drosophila oocyte*. Cell, 66(1):23–35.
- Knierim JJ, Neunuebel JP, Deshmukh SS. (2013). *Functional correlates of the lateral and medial entorhinal cortex: objects, path integration and local-global reference frames*. Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci, 369(1635):20130369–20130369.
- Knoblich JA. (2008). *Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division*. Cell, 132(4):583–597.
- Knowles RB, Sabry JH, Martone ME, Deerinck TJ, Ellisman MH, Bassell GJ, Kosik KS. (1996). *Translocation of RNA granules in living neurons*. Journal of Neuroscience, 16(24):7812–7820.
- Köhrmann M, Luo M, Kaether C, DesGroseillers L, Dotti CG, Kiebler MA. (1999). *Microtubule-dependent Recruitment of Staufen-Green Fluorescent Protein into Large RNA-containing Granules and Subsequent Dendritic Transport in Living Hippocampal Neurons*. Mol Biol Cell, 10(9):2945–2953.
- Kornau H-C, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH. (1995). *Domain Interaction Between NMDA Receptor Subunits and the Postsynaptic Density Protein PSD-95*. Science, 269(5231):1737–1740.
- Korobova F, Svitkina T. (2010). *Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis*. In: Forscher P (ed) Mol Biol Cell, 21(1):165–176.
- Kosik KS. (2006). *The neuronal microRNA system*. Nature Reviews Neuroscience, 7(12):911–920.
- Koyama Y. (2013). *The unending fascination with the Golgi method*. OA Anatomy, 1(3).
- Kropff E, Carmichael JE, Moser M-B, Moser EI. (2015). *Speed cells in the medial entorhinal cortex*. Nature, 523(7561):419–424.
- Krueger DD, Bear MF. (2011). *Toward Fulfilling the Promise of Molecular Medicine in Fragile X Syndrome*. Medicine, 62(1):411–429.
- Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel E-M, Ostareck-Lederer A, Fischer U. (2001). *Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation*. Hum Mol Genet, 10(4):329–338.
- Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW. (2010). *TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration*. Hum Mol Genet, 19(R1):R46–R64.
- Lambert JT, Hill TC, Park DK, Culp JH, Zito K. (2017). *Protracted and asynchronous accumulation of PSD95-family MAGUKs during maturation of nascent dendritic spines*. Dev Neurobiol, 77(10):1161–1174.
- Laver JD, Li X, Ancevicus K, Westwood JT, Smibert CA, Morris QD, Lipshitz HD. (2013). *Genome-wide analysis of Staufen-associated mRNAs identifies secondary structures that confer target specificity*. Nucleic Acids Res, 41(20):9438–9460.

- Lebeau G, DesGroseillers L, Sossin W, Lacaille J-C. (2011)(a). *mRNA binding protein staufen 1-dependent regulation of pyramidal cell spine morphology via NMDA receptor-mediated synaptic plasticity*. Mol Brain, 4(1):22–22.
- Lebeau G, Maher-Laporte M, Topolnik L, Laurent CE, Sossin W, DesGroseillers L, Lacaille J-C. (2008). *Staufen1 Regulation of Protein Synthesis-Dependent Long-Term Potentiation and Synaptic Function in Hippocampal Pyramidal Cells*. Mol Cell Biol, 28(9):2896–2907.
- Lebeau G, Miller LC, Tartas M, McAdam R, Laplante I, Badeaux F, DesGroseillers L, Sossin WS, Lacaille J-C. (2011)(b). *Staufen 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons*. Learn Memory, 18(5):314–326.
- Lee C-Y, Wilkinson BD, Siegrist SE, Wharton RP, Doe CQ. (2006). *Brat Is a Miranda Cargo Protein that Promotes Neuronal Differentiation and Inhibits Neuroblast Self-Renewal*. Dev Cell, 10(4):441–449.
- Leuner B, Falduto J, Shors TJ. (2003). *Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus*. J Neurosci, 23(2):659–665.
- Levine ND, Rademacher DJ, Collier TJ, O'Malley JA, Kells AP, Sebastian WS, Bankiewicz KS, Steece-Collier K. (2013). *Advances in thin tissue Golgi-Cox impregnation: Fast, reliable methods for multi-assay analyses in rodent and non-human primate brain*. J Neurosci Methods, 213(2):214–227.
- Lewandoski M. (2001). *Conditional control of gene expression in the mouse*. Nat Rev Genet, 2(10):35093537–755.
- Liu-Yesucevitz L, Bassell GJ, Gitler AD, Hart AC, Klann E, Richter JD, Warren ST, Wolozin B. (2011). *Local RNA Translation at the Synapse and in Disease*. J Neurosci, 31(45):16086–16093.
- Lukong KE, Chang K, Khandjian EW, Richard S. (2008). *RNA-binding proteins in human genetic disease*. Trends Genet, 24(8):416–425.
- Lunde BM, Moore C, Varani G. (2007). *RNA-binding proteins: modular design for efficient function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 8(6):479–490.
- Lynch MA. (2004). *Long-Term Potentiation and Memory*. Physiol Rev, 84(1):87–136.
- Mader S, Lee H, Pause A, Sonenberg N. (1995). *The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins*. Molecular and Cellular Biology, 15(9):4990–4997.
- Maher-Laporte M, DesGroseillers L. (2010). *Genome wide identification of Staufen2-bound mRNAs in embryonic rat brains*. Bmb Rep, 43(5):344–348.
- Mallardo M, Deitinghoff A, Müller J, Goetze B, Macchi P, Peters C, Kiebler MA. (2003). *Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain*. Proc Natl Acad Sci USA, 100(4):2100–2105.
- Manahan-Vaughan D, Braunewell K-H. (1999). *Novelty acquisition is associated with induction of hippocampal long-term depression*. Proc National Acad Sci, 96(15):8739–8744.

- Manahan-Vaughan D, Kulla A, Frey JU. (2000). *Requirement of Translation But Not Transcription for the Maintenance of Long-Term Depression in the CA1 Region of Freely Moving Rats*. *J Neurosci*, 20(22):8572–8576.
- Marchand V, Gaspar I, Ephrussi A. (2012). *An Intracellular Transmission Control Protocol: assembly and transport of ribonucleoprotein complexes*. *Curr Opin Cell Biol*, 24(2):202–210.
- Marión RM, Fortes P, Beloso A, Dotti C, Ortín J. (1999). *A Human Sequence Homologue of Staufen Is an RNA-Binding Protein That Is Associated with Polysomes and Localizes to the Rough Endoplasmic Reticulum*. *Mol Cell Biol*, 19(3):2212–2219.
- Martin KC, Casadio A, Zhu H, Yaping E, Rose JC, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. (1997). *Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage*. *Cell*, 91(7):927–938.
- Martin KC, Kosik KS. (2002). *Synaptic tagging — who’s it?* *Nature Reviews Neuroscience*, 3(10):813–820.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RGM. (2000). *Synaptic Plasticity and Memory: An Evaluation of the Hypothesis*. *Annu Rev Neurosci*, 23(1):649–711.
- McConnell SK. (1995). *Constructing the cerebral cortex: Neurogenesis and fate determination*. *Neuron*, 15(4):761–768.
- Megías M, Emri Z, Freund TF, Gulyás AI. (2001). *Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells*. *Neuroscience*, 102(3):527–540.
- Mikl M, Vendra G, Kiebler MA. (2011). *Independent localization of MAP2, CaMKII α and β -actin RNAs in low copy numbers*. *EMBO Rep*, 12(10):1077–1084.
- Mishkin M, Ungerleider LG, Macko KA. (1983). *Object vision and spatial vision: two cortical pathways*. *Trends Neurosci*, 6:414–417.
- Monfils M-H, Teskey GC. (2004). *Induction of long-term depression is associated with decreased dendritic length and spine density in layers III and V of sensorimotor neocortex*. *Synapse*, 53(2):114–121.
- Monshausen M, Putz U, Rehbein M, Schweizer M, DesGroseillers L, Kuhl D, Richter D, Kindler S. (2001). *Two rat brain Staufen isoforms differentially bind RNA*. *J Neurochem*, 76(1):155–165.
- Morice E, Billard J-M, Denis C, Mathieu F, Betancur C, Epelbaum J, Giros B, Nosten-Bertrand M. (2007). *Parallel Loss of Hippocampal LTD and Cognitive Flexibility in a Genetic Model of Hyperdopaminergia*. *Neuropsychopharmacol*, 32(10):2108–2116.
- Moser EI, Kropff E, Moser M-B. (2008). *Place Cells, Grid Cells, and the Brain’s Spatial Representation System*. *Annu Rev Neurosci*, 31(1):69–89.
- Moser MB, Trommald M, Andersen P. (1994). *An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(26):12673–12675.

- Muller D, Toni N, Buchs PA. (2000). *Spine changes associated with long-term potentiation*. Hippocampus, 10(5):596–604.
- Muller R. (1996). *A quarter of a century of place cells*. Neuron, 17(5):813–822.
- Naber PA, Silva FHL da, Witter MP. (2001). *Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum*. Hippocampus, 11(2):99–104.
- Naber PA, Witter MP, Silva FHL. (2000). *Networks of the hippocampal memory system of the rat. The pivotal role of the subiculum*. Ann N Y Acad Sci, 911:392–403.
- Nadel L, Samsonovich A, Ryan L, Moscovitch M. (2000). *Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results*. Hippocampus, 10(4):352–368.
- Nakao K, Ikegaya Y, Yamada MK, Nishiyama N, Matsuki N. (2002). *Hippocampal long-term depression as an index of spatial working memory*. Eur J Neurosci, 16(5):970–974.
- Narayanan U, Nalavadi V, Nakamoto M, Thomas G, Ceman S, Bassell GJ, Warren ST. (2008). *S6K1 Phosphorylates and Regulates Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) with the Neuronal Protein Synthesis-dependent Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Cascade**. J Biol Chem, 283(27):18478–18482.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. (2006). *Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Science, 314(5796):130–133.
- Nicoll RA. (2017). *A Brief History of Long-Term Potentiation*. Neuron, 93(2):281–290.
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. (2002). *Structure and function of dendritic spines*. Annu Rev Physiol, 64(1):313–353.
- Okamoto K-I, Nagai T, Miyawaki A, Hayashi Y. (2004). *Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity*. Nat Neurosci, 7(10):1104–1112.
- O'Keefe J, Dostrovsky J. (1971). *The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat*. Brain Res, 34(1):171–175.
- Opazo P, Choquet D. (2011). *A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors*. Mol Cell Neurosci, 46(1):1–8.
- Opazo P, Sainlos M, Choquet D. (2012). *Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots*. Curr Opin Neurobiol, 22(3):453–460.
- Ostroff LE, Fiala JC, Allwardt B, Harris KM. (2002). *Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices*. Neuron, 35(3):535–545.

- Park E, Gleghorn ML, Maquat LE. (2013)(a). *Staufen2 functions in Staufen1-mediated mRNA decay by binding to itself and its paralog and promoting UPF1 helicase but not ATPase activity*. Proc National Acad Sci, 110(2):405–412.
- Park E, Maquat LE. (2013)(b). *Staufen-mediated mRNA decay*. Wiley Interdiscip Rev Rna, 4(4):423–435.
- Park HY, Lim H, Yoon YJ, Follenzi A, Nwokafor C, Lopez-Jones M, Meng X, Singer RH. (2014). *Visualization of dynamics of single endogenous mRNA labeled in live mouse*. Science, 343(6169):422–424.
- Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donzé O, Lin TA, Lawrence JC, Sonenberg N. (1994). *Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function*. Nature, 371(6500):762–767.
- Paxinos G, Watson C. (2007). *The Rat Brain*. 6th ed. Elsevier (Elsevier).
- Penagarikano O, Mulle JG, Warren ST. (2007). *The Pathophysiology of Fragile X Syndrome*. Annu Rev Genom Hum G, 8(1):109–129.
- Peters A, Kaiserman-Abramof IR. (1970). *The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines*. Am J Anat, 127(4):321–355.
- Pfeiffer BE, Huber KM. (2006). *Current advances in local protein synthesis and synaptic plasticity*. J Neurosci, 26(27):7147–7150.
- Ramón-Moliner E. (1970). *The Golgi-Cox Technique*. In: Contemporary Research Methods in Neuroanatomy. Contemporary Research Methods in Neuroanatomy (Contemporary Research Methods in Neuroanatomy), pp. 32–55.
- Ramón y Cajal S. (1888). *Estructura de los centros nerviosos de las aves*. Rev Trim Histol Norm Patol, 1:1–10.
- Ramón y Cajal S. (1894). *Consideraciones generales sobre la morfología de la célula nerviosa*. La Veterinaria Española, 37:257-260-273-275-289–291.
- Rangaraju V, Dieck S tom, Schuman EM. (2017). *Local translation in neuronal compartments: how local is local?* EMBO Rep, 18(5):693–711.
- Roche KW, O'Brien RJ, Mammen AL, Bernhardt J, Huganir RL. (1996). *Characterization of Multiple Phosphorylation Sites on the AMPA Receptor GluR1 Subunit*. Neuron, 16(6):1179–1188.
- Roegiers F, Jan YN. (2000). *Staufen: a common component of mRNA transport in oocytes and neurons?* Trends Cell Biol, 10(6):220–224.
- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF. (1998). *The Tetrameric Structure of a Glutamate Receptor Channel*. Science, 280(5369):1596–1599.
- Sargolini F, Fyhn M, Hafting T, McNaughton BL, Witter MP, Moser M-B, Moser EI. (2006). *Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex*. Science, 312(5774):758–762.
- Sauer B, Henderson N. (1988). *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*. Proc Natl Acad Sci USA, 85(14):5166–5170.

- Schiller D, Eichenbaum H, Buffalo EA, Davachi L, Foster DJ, Leutgeb S, Ranganath C. (2015). *Memory and Space: Towards an Understanding of the Cognitive Map*. J Neurosci, 35(41):13904–13911.
- Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. (2011). *Physiologie des Menschen*. 31st ed. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (eds) Springer Berlin Heidelberg (Springer Berlin Heidelberg).
- Schnapp BJ. (1999). *RNA localization: A glimpse of the machinery*. Curr Biol, 9(19):R725–R727.
- Schnell E, Sizemore M, Karimzadegan S, Chen L, Bredt DS, Nicoll RA. (2002). *Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number*. Proc National Acad Sci, 99(21):13902–13907.
- Schönig K, Weber T, Frömmig A, Wendler L, Pesold B, Djandji D, Bujard H, Bartsch D. (2012). *Conditional gene expression systems in the transgenic rat brain*. BMC Biology, 10(1):77.
- Schuldt AJ, Adams JHJ, Davidson CM, Micklem DR, Haseloff J, Johnston DS, Brand AH. (1998). *Miranda mediates asymmetric protein and RNA localization in the developing nervous system*. Gene Dev, 12(12):1847–1857.
- Schüpbach T, Wieschaus E. (1986). *Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the Drosophila embryo*. Roux's Archives Dev Biology, 195(5):302–317.
- Scoville WB, Milner B. (1957). *Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 20(1):11–21.
- Semon R. (1925). *The mneme*. J Nerv Ment Dis, 62(3):332.
- Sholl DA. (1953). *Dendritic Organization in the Neurons of the Visual and Motor Cortices of the Cat*. J Anat, 87(4):387-.
- Silva AJ, Giese KP, Fedorov NB, Frankland PW, Kogan JH. (1998). *Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning*. Neurobiology of Learning and Memory, 70(1–2):44–61.
- Solstad T, Boccara CN, Kropff E, Moser M-B, Moser EI. (2008). *Representation of geometric borders in the entorhinal cortex*. Science, 322(5909):1865–1868.
- Špaček J. (1985). *Three-dimensional analysis of dendritic spines. II. Spine apparatus and other cytoplasmic components*. Anat Embryol, 171(2):235–243.
- Spence EF, Soderling SH. (2015). *Actin Out: Regulation of the Synaptic Cytoskeleton*. J Biol Chem, 290(48):28613–28622.
- Squire LR. (2004). *Memory systems of the brain: A brief history and current perspective*. Neurobiology of Learning and Memory, 82(3):171–177.
- Squire LR, Genzel L, Wixted JT, Morris RG. (2015). *Memory Consolidation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 7(8):a021766-22.
- Squire LR, Zola-Morgan S. (1991). *The medial temporal lobe memory system*. Science, 253(5026):1380–1386.
- St Johnston D, Beuchle D, Nüsslein-Volhard C. (1991). *staufer, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg*. Cell, 66(1):51–63.

- Steffl R, Skrisovska L, Allain FHT. (2005). *RNA sequence- and shape-dependent recognition by proteins in the ribonucleoprotein particle*. EMBO Rep, 6(1):33–38.
- Steward O, Schuman EM. (2003). *Compartmentalized Synthesis and Degradation of Proteins in Neurons*. Neuron, 40(2):347–359.
- Tang SJ, Meulemans D, Vazquez L, Colaco N, Schuman E. (2001). *A Role for a Rat Homolog of Staufen in the Transport of RNA to Neuronal Dendrites*. Neuron, 32(3):463–475.
- Thiagarajan TC, Lindskog M, Malgaroli A, Tsien RW. (2007). *LTP and adaptation to inactivity: Overlapping mechanisms and implications for metaplasticity*. Neuropharmacology, 52(1):156–175.
- Tolino M, Köhrmann M, Kiebler MA. (2012). *RNA-binding proteins involved in RNA localization and their implications in neuronal diseases*. European Journal of Neuroscience, 35(12):1818–1836.
- Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Müller D. (1999). *LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite*. Nature, 402(6760):421–425.
- Tsumoto T. (1993). *Long-term depression in cerebral cortex: a possible substrate of “forgetting” that should not be forgotten*. Neurosci Res, 16(4):263–270.
- Vaessin H, Grell E, Wolff E, Bier E, Jan LY, Jan YN. (1991). *prospero is expressed in neuronal precursors and encodes a nuclear protein that is involved in the control of axonal outgrowth in Drosophila*. Cell, 67(5):941–953.
- van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP. (2009). *The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network*. Nature Reviews Neuroscience, 10(4):272–282.
- Vessey JP, Macchi P, Stein JM, Mikl M, Hawker KN, Vogelsang P, Wieczorek K, Vendra G, Riefler J, Tübing F, Aparicio SAJ, Abel T, Kiebler MA. (2008). *A loss of function allele for murine Staufen1 leads to impairment of dendritic Staufen1-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis*. Proc National Acad Sci, 105(42):16374–16379.
- Vieira RT, Caixeta L, Machado S, Silva AC, Nardi AE, Arias-Carrión O, Carta MG. (2013). *Epidemiology of early-onset dementia: a review of the literature*. Clin Pract Epidemiology Ment Heal Cp Emh, 9(1):88–95.
- von Bohlen und Halbach O. (2009). *Structure and function of dendritic spines within the hippocampus*. Ann Anat, 191(6):518–531.
- von Bohlen und Halbach O, Krause S, Medina D, Sciarretta C, Minichiello L, Unsicker K. (2006). *Regional- and Age-Dependent Reduction in *trkB* Receptor Expression in the Hippocampus Is Associated with Altered Spine Morphologies*. Biol Psychiatry, 59(9):793–800.
- Wang I-Fan, Wu L, Chang H, Shen C-K. J. (2008). *TDP-43, the signature protein of FTL-D-U, is a neuronal activity-responsive factor*. J Neurochem, 105(3):797–806.
- Wells DG. (2006). *RNA-Binding Proteins: A Lesson in Repression*. J Neurosci, 26(27):7135–7138.

- Wickham L, Duchaîne T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L. (1999). *Mammalian Staufen Is a Double-Stranded-RNA- and Tubulin-Binding Protein Which Localizes to the Rough Endoplasmic Reticulum*. *Mol Cell Biol*, 19(3):2220–2230.
- Wienholds E, Plasterk RHA. (2005). *MicroRNA function in animal development*. *FEBS Letters*, 579(26):5911–5922.
- Wilson MA, McNaughton BL. (1993). *Dynamics of the hippocampal ensemble code for space*. *Science*, 261(5124):1055–1058.
- Witter MP, Amaral DG. (1991). *Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex*. *Journal of Comparative Neurology*, 307(3):437–459.
- Xu L, Anwyl R, Rowan MJ. (1998). *Spatial exploration induces a persistent reversal of long-term potentiation in rat hippocampus*. *Nature*, 394(6696):891–894.
- Yang Y, Wang J-Z. (2017). *From Structure to Behavior in Basolateral Amygdala-Hippocampus Circuits*. *Front Neural Circuits*, 11:179–8.
- Yoon YJ, Wu B, Buxbaum AR, Das S, Tsai A, English BP, Grimm JB, Lavis LD, Singer RH. (2016). *Glutamate-induced RNA localization and translation in neurons*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113(44):E6877–E6886.
- Yuste R, Bonhoeffer T. (2001). *Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity*. *Annu Rev Neurosci*, 24(1):1071–1089.
- Zalfa F, Eleuteri B, Dickson KS, Mercaldo V, Rubeis SD, Penta A di, Tabolacci E, Chiurazzi P, Neri G, Grant SGN, Bagni C. (2007). *A new function for the fragile X mental retardation protein in regulation of PSD-95 mRNA stability*. *Nat Neurosci*, 10(5):578–587.
- Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, Moro A, Penta AD, Reis S, Oostra B, Bagni C. (2003). *The Fragile X Syndrome Protein FMRP Associates with BC1 RNA and Regulates the Translation of Specific mRNAs at Synapses*. *Cell*, 112(3):317–327.
- Zeng H, Chattarji S, Barbarosie M, Rondi-Reig L, Philpot BD, Miyakawa T, Bear MF, Tonegawa S. (2001). *Forebrain-Specific Calcineurin Knockout Selectively Impairs Bidirectional Synaptic Plasticity and Working/Episodic-like Memory*. *Cell*, 107(5):617–629.
- Zhou Q, Homma KJ, Poo M. (2004). *Shrinkage of Dendritic Spines Associated with Long-Term Depression of Hippocampal Synapses*. *Neuron*, 44(5):749–757.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Konzept der neuronalen Plastizität.	2
Abbildung 2: Schematische Übersicht des Hippocampus der Ratte.....	5
Abbildung 3: Klassischer corticohippocampaler Schaltkreis.....	6
Abbildung 4: Erweiterte Verschaltungen des Hippocampus.	8
Abbildung 5: Molekulare Mechanismen von Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD).....	13
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Stau2-Knockdowns.	30
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Sholl-Analyse.	33
Abbildung 8: Vergleich der Morphologie der Neuronen in der Stau2 ^{KD} - und der Kontrollgruppe in der apikalen CA1-Region.	37
Abbildung 9: Vergleich der Morphologie der Neuronen in der Stau2 ^{KD} - und der Kontrollgruppe in der basalen CA1-Region.	38
Abbildung 10: Branching Index im Vergleich zwischen Stau2 ^{KD} - und Kontrollgruppe.....	39
Abbildung 11: Länge und Dichte der Spines in der CA1a-Region.	40
Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung der Spines in CA1a gruppiert nach ihrer Länge.	41
Abbildung 13: Länge und Dichte der Spines in der CA1b-Region.	42
Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der Spines in CA1b gruppiert nach ihrer Länge.	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardfehler der Sholl-Analyse zur Beurteilung der Morphologie der Neuronen in CA1 bei Knockdowntieren (Stau2 ^{KD}) und Kontrollen.	35
Tabelle 2: Mittelwerte und Standardfehler der Dendritenanalyse zur Beurteilung der Morphologie und Anzahl der dendritischen Spines in CA1.....	39

Publikation

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurden zusammen mit den in Abschnitt 4.2 vorgestellten Ergebnissen weiterer Arbeitsgruppen 2017 in folgender Arbeit publiziert:

Berger SM, Fernández-Lamo I, Schönig K, Moya SMF, Ehses J, Schieweck R, Clementi S, Enkel T, Grothe S, von Bohlen und Halbach O, Segura I, Delgado-García JM, Gruart A, Kiebler MA, Bartsch D. (2017). *Forebrain-specific, conditional silencing of Stauf2 alters synaptic plasticity, learning, and memory in rats*. *Genome Biol*, 18(1):222.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, 24.02.2023

Sascha Grothe

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Oliver von Bohlen und Halbach für die Möglichkeit einen Einblick in die Neurowissenschaften zu erhalten und diese Arbeit umzusetzen, für die gute Zusammenarbeit, die immerwährende Unterstützung, die konstruktiven Diskussionen und vor allem für seine unendliche Geduld.

Außerdem möchte ich mich bei Sabine Hanisch für die Einführung in die Laborarbeit und ihre unermüdliche Unterstützung bei der Umsetzung dieses Projektes bedanken. Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universität Greifswald danke ich für die sehr gute und familiäre Zusammenarbeit während meiner Zeit im Institut.

Abschließend danke ich meiner Familie, allen voran meiner Frau Friederike und unseren Kindern, für die Unterstützung und für die manchmal notwendigen aufmunternden Worte.