

# 5 Appendix

## 5.1 Recipes

### 5.1.1 Pentobarbitone Solution

4g/l sodium pentobarbitone (Synopharm, Germany) dissolved in a 1:1 solution of distilled water and propylene glycol (Carl Roth, Germany).

### 5.1.2 Phosphate buffer 0.2M, pH 7.4

- Solution A:

-35.61g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/2\text{H}_2\text{O}$  -2000ml aqua distillate

mix the  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/2\text{H}_2\text{O}$  with aqua distillate

- Lösung B:

-27.60g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$

-2000ml aqua distillate

mix the  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$  with aqua distillate

⇒ bring 1620ml solution A with solution B (approx. 380ml) to pH 7.4.

## 5.2 Abstract

Storage or processing of information underlies a mechanism able to change the efficacy of certain synapses depending on its activity. Long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) are two types of experimentally induced activity dependent change in synaptic efficacy (plasticity).

The aim of this study was to determine the subtype specific involvement of group I metabotropic glutamate receptors (mGlu) in both forms of synaptic plasticity, namely LTP and LTD. The mGlu activation underlying pathological processes was also investigated.

For all investigations, rats were chronically implanted with recording and stimulating electrodes to enable measurement of evoked potentials from medial perforant path – dentate gyrus granule cell synapses. An injection cannula was inserted into the ipsilateral cerebral ventricle to enable drug application. Experiments were begun 10d subsequent to the implantation procedure. Histological investigations of hippocampal tissue was used to determine possible changes in cell viability after the induction of chemical LTD.

Robust LTP which lasted for over 25h was generated using 200Hz tetanisation (HFT), whereas robust LTD was induced either by 1Hz low-frequency stimulation (LFS) or by pharmacological mGlu activation.

The potent mGlu5 receptor agonist MPEP (2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine), applied in concentrations which did not affect basal synaptic transmission, dose-dependently impaired the induction and expression of LTP. Application of MPEP 5 min after tetanisation inhibited late LTP (> 24h).

Injections of the potent mGlu1 agonist LY367385 ((S)-(+)- $\alpha$ -Amino-4-carboxy-2-methylbenzenacetic acid), in the concentrations

investigated, did not effect basal synaptic transmission. In contrast, a dose-dependent impairment of LTP expression was observed. The lowest concentration used, had no effect on LTP induction, whereas higher concentrations reduced both LTP induction and expression. In contrast to MPEP application, the injection of LY367385 5min after LTP induction did not effect LTP expression.

The results strongly implicate an involvement of mGlu1 in LTP induction, whereas the group I mGlu subtype 5 seems to be more involved in LTP expression.

Investigating the subtype specific group I mGlu involvement in LTD afford differential results. Whereas LFS-induced LTD strongly required mGlu1 activation during LFS, chemical LTD is induced by activation of mGlu5.

Induction of chemical LTD with the group I mGlu receptor agonist, (RS)-3,5-Dihydroxyphenylglycine (DHPG) occluded subsequent induction of LFS-induced LTD. Application of LFS following selective pharmacological activation of mGlu5 by (RS)-2-Chloro-5-hydroxyphenylglycine (CHPG) led to de-depression. Further analysis revealed that concurrent induction of chemically-induced and LFS-induced LTD led to an increase of intracellular calcium sufficient for the induction of LTP by LFS.

Whereas LFS-induced LTD required mGlu1 activation during LFS, activation of mGlu5-mediated chemical LTD did not influence responses during LFS.

In a next step, it was possible to induce stable LTD by application of the potent group III mGlu agonist AP4 (L-(+)-2-Amino-4-phosphonobutyric acid). The persistent LTD induced by the group I mGlu receptor agonist, DHPG, or the group III mGlu receptor agonist, AP4 were compared. Application of the protein synthesis inhibitor Anisomycin 2h prior to DHPG-injection inhibited the expression of LTD from 6h following DHPG injection. In contrast,

Anisomycin did not affect LTD induced by AP4. A paired pulse paradigm determined that AP4-LTD is presynaptic whereas DHPG-LTD has both pre-and postsynaptic components.

Histological evaluation at either *4h* or *7d* following AP4-injection showed that AP4-mediated LTD was associated with an acute increase in cell death in the CA1 region whereas the dentate gyrus was largely unaffected. Both hippocampal subfields demonstrated a significant deterioration of cell area and density 7d after AP4 application, with the CA1 region being more potently affected. This effects, however, were subtle in both regions under investigation.

In conclusion, this thesis work gives insights into the subtype specific regulation of synaptic plasticity investigated in the dentate gyrus of freely moving rats. Whereas the group I mGlu subtype 5 seems to be more related to long-term processes and thus useful in the formation of enduring memory templates, the subtype 1 seems to be more important in mechanisms underlying synaptic gain control (LTD and short-term plasticity) and therefore leading to the facilitation of synaptic events.

The synapse is a highly tuned system, which regulates several events underlying plasticity. A dysregulation of this system might occur due to pathological events (e.g. epilepsy, ischemia) or be experimentally induced by specific receptor overactivation. Such extensive receptor overstimulation might be more related to pathology than to plasticity. These findings support a role in the fine-tuning of synaptic excitability and plasticity in the hippocampus.

## 5.3 Zusammenfassung

Für die Speicherung von Informationen im Gehirn, muss es einen Mechanismus geben, der in Abhängigkeit von der Aktivität eine Veränderung der Effizienz von Synapsen ermöglicht. Experimentell wird eine solche aktivitätsabhängige Änderung (Plastizität) mit dem Phänomen der Langzeit-Potenzierung (LTP) oder Langzeit-Depression (LTD) beschrieben.

Ziel der Arbeit war die subtypspezifische Beteiligung der Gruppe I metabotropen Glutamatrezeptoren (mGlu) an beiden Formen synaptischer Plastizität, LTP und LTD, zu charakterisieren. Auch die Verbindung pathologischer Prozesse unterliegender mGlu Aktivierung sollte aufgezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Elektroden chronisch in adulte Wistar-Ratten implantiert. Eine bipolare Stimulationselektrode im tractus perforans ermöglichte die elektrische Reizung der Körnerzellen der Area Dentata. Die dort implantierte Ableitelektrode detektierte die aktivitätsabhängige Änderungen der synaptischen Effizienz. Eine chronisch implantierte Kanüle im ipsilateralen zerebralen Ventrikel ermöglichte die Applikation kleiner Mengen ( $5\mu\text{l}$ ) Drogen. Ein einfaches histologisches Verfahren sollte Aufklärung über mögliche Zellschäden nach pharmakologischer Induktion einer LTD geben.

LTP wurde zuverlässig durch hochfrequente ( $200\text{Hz}$ ,  $10 \times 15$ ) afferente Stimulation hervorgerufen, während LTD sowohl durch niederfrequente ( $1\text{Hz}$ , 900) afferente Stimulation als auch durch die Applikation von mGlu Agonisten zuverlässig induziert werden konnte.

Die Applikation des potenten mGlu5 Antagonisten 2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine, (MPEP) in einer Konzentration, die keinen

Einfluss auf die basale synaptische Transmission hat, veränderte dosisabhängig die Induktion und Expression einer normalen LTP. Erfolgte die Gabe des Antagonisten *5min* nach Induktion, resultierte daraus eine signifikante Blockade der späten Phase der LTP ( $> 24h$ ). Die Applikation des potenten mGlu1 Antagonisten (S)-(+)- $\alpha$ -Amino-4-carboxy-2-methylbenzenacetic Säure (LY367385) hat in verschiedenen Konzentrationen keinen Einfluss auf die basale synaptische Transmission. Eine konzentrationsabhängige Veränderung sowohl der Induktion, als auch der Ausprägung einer normalen LTP konnte aufgezeigt werden. Im Gegensatz zur Applikation von MPEP, verändert LY367385 nicht die Ausprägung der LTP, wenn es erst nach der Induktion dieser appliziert wird.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Gruppe I Subtyp mGlu1 eine wichtige Rolle bei der Induktion einer LTP spielt, während mGlu5 eher für die Ausprägung dieser verantwortlich zu sein scheint.

Die Ergebnisse bezüglich der LTD weisen eine unterschiedliche Regulierung durch die Gruppe I mGlu auf. Während die LTD induziert durch niederfrequente Stimulation durch die Applikation des mGlu1 Antagonisten LY367385 verhindert wird, hat MPEP, der mGlu5 Antagonist keinen Einfluss auf die Induktion und Ausprägung einer LTD.

Während die LTD induziert durch niederfrequenter Stimulation nicht der Aktivierung von mGlu5 bedarf, ist es möglich eine langanhaltende Depression der synaptischen Aktivität durch die Applikation des mGlu5 Agonisten (RS)-2-Chloro-5-hydroxyphenylglycine (CHPG) zu induzieren. Die Ausprägung dieser chemischen LTD unterscheidet sich nicht von der, die durch die Gabe des allgemeinen Gruppe I Agonisten (RS)-3,5-Dihydroxyphenylglycine (DHPG) ausgelöst werden kann. Induktion einer chemischen LTD durch DHPG verhindert die anschließende Induktion einer LTD, induziert durch niederfrequente Stimulation.

Wird die LTD durch CHPG Applikation verursacht, führt die anschließende niederfrequente Stimulation zu einer Umkehrung der Depression, es wird eine Potenzierung ausgelöst. Eine Untersuchung dieses Phänomens ergab, dass das Aufeinanderfolgen von niederfrequenter Stimulation und Agonisten Gabe zu einer intrazellulären Kalziumkonzentration geführt hat, die eine LTP auslöste.

Während also die LTD ausgelöst durch niederfrequente Stimulation einer Aktivierung von mGlu1 bedarf, ist die Aktivierung von mGlu5 ausreichend, eine chemische LTD auszulösen.

In einem nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Gruppe III mGlu durch L-(+)-2-Amino-4-phosphonobutyric Säure (AP4) auch zu einer chemischen LTD führt. Im Gegensatz zu der LTD ausgelöst durch DHPG, ist diese Depression jedoch nicht abhängig von Proteinsynthese. Dieses Ergebnis erbrachte eine vergleichende Untersuchung mit dem Proteinsynthese Inhibitor Anisomycin.

Einen Einblick vom Ausprägungsort dieser beiden Formen der LTD ergab eine sogenannte 'Paired-Pulse' Studie. Während die Proteinsyntheseabhängigkeit der LTD ausgelöst durch DHPG eine postsynaptische Ausprägung impliziert, wiesen Veränderungen im 'Paired-Pulse' Verhalten auf einen presynaptischen Ort der Ausprägung hin. Die Veränderungen im 'Paired-Pulse' Verhalten nach AP4 Applikation bestätigten die durch die Proteinsyntheseunabhängigkeit und die bekannte Lokalisation dieser Rezeptoren postulierte presynaptische Ausprägung.

Histologische Untersuchungen ergaben, dass die Induktion der LTD durch Gabe von AP4 neurotoxisch ist. So ergaben sich erhöhte Anzahlen toter Zellen in dem hippocampalen Areal CA1 4h nach AP4 Injektion. Die Area Dentata hingegen war weitgehend unbeschädigt nach 4h. Interessanterweise nahm die Größe des zellbesiedelten Areals, als auch die Zelldichte 7d nach AP4 Behandlung in beiden

Arealen sichtbar ab. Auch in diesem Fall zeigte die Area Dentata sich weniger beschädigt. Hervorzuheben ist, dass die Auswirkungen der AP4 Applikation in beiden Arealen minimal war.

Die zusammenfassende Betrachtung der erbrachten Ergebnisse gibt Einblicke in die subtypspezifische Regulation der synaptischen Plastizität der Area Dentata der freibeweglichen Ratte. Während der Gruppe I Subtyp 5 eher für langanhaltende Prozesse zuständig zu sein scheint, reguliert der Subtyp 1 mehr die kurzzeitigen Mechanismen, die zu einer allgemeinen Verstärkung plastischer Ereignisse führt.

Das hochgradig aufeinander abgestimmte System, welches plastische Ereignisse reguliert, kann ins Ungleichgewicht geraten. Experimentell wird dies durch Überaktivierung eines Rezeptors hervorgerufen, physiologisch eventuell während unterschiedlicher Krankheitsbilder (Epilepsie, Ischämie). Eine solche Überaktivierung eines Rezeptortyps führt eher zur Neurotoxizität als zur Informationsverarbeitung.



## 5.4 Curriculum Vitae

### Katja Naie

#### Persönliche Daten

Geburtsdatum: 9. Januar 1974  
 Geburtsort: Dinslaken, Deutschland  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Familienstand: verheiratet mit Jens Naie

#### Beruflicher Werdegang

Seit 06/2000                   Anfertigung der Dissertation  
                                       Johannes Müller Institute für  
                                       Physiologie  
                                       Charité, Berlin  
                                       Betreuung durch:  
                                       Prof. Dr. D. Manahan-Vaughan

01/2000–04/2000           *Honorary Research Assistant*  
                                       Institut für *Child Health*  
                                       UCL, London  
                                       Betreuung durch:  
                                       Dr. T. Baldeweg

#### Studium

1994–1999                    Studium der Biologie  
                                       Ruhr-Universität Bochum

12/1999                     Diplombiologin  
                                       Thema der Diplomarbeit:  
                                       *Projektionen des PMLS/LSA*  
                                       *zum NOT/DTN der Katze*  
                                       Betreuung durch:  
                                       PD. Dr. C. Distler

## 5.5 List of Publications

### Articles

Naie K, Manahan-Vaughan D, 2004  
Regulation by Metabotropic Glutamate Receptor 5 of LTP in the Dentate Gyrus of Freely Moving Rats: Relevance for Learning and Memory Formation  
Cerebral Cortex, In press

Naie K, Manahan-Vaughan D, submitted  
Subtype Specific Involvement of Group I Metabotropic Glutamate Receptors in Agonist- and Stimulus-Induced Long-term Depression in the Dentate Gyrus of Freely Moving Rats

Naie K, Manahan-Vaughan D, submitted  
Requirement of Metabotropic Glutamate Receptor 1 (mGlu1) for LTP and Spatial Reference Memory in the Dentate Gyrus of Freely Moving Rats

Naie K, Manahan-Vaughan D, submitted  
Protein Synthesis Dependency of Chemically Induced Long-term Depression by Activation of Metabotropic Glutamate Receptors in the Dentate Gyrus of Freely Moving Rats – Difference between Group I and Group III Receptors

### Abstracts

Schütz K, Manahan-Vaughan D, 2002  
Contribution of Metabotropic Glutamate Receptor mGlu5 to Spatial Learning and Hippocampal Long-Term Potentiation in Vivo.  
FENS Forum Abstracts. 16 532, 214-216

Naie K, Manahan-Vaughan D, 2003  
Differential Protein Synthesis Dependency of Chemically Induced  
Long-Term Depression by Activation of Groups I and III Metabotropic  
Glutamate Receptors in the Dentate Gyrus of Freely Moving Rats.  
Society Neuroscience Abstracts. 170.5