

### 3. Übergreifende Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Struktur-Funktion-Beziehungen an glyzinerigen/GABAergen Synapsen mit Hilfe von *gene targeting*, *epitope tagging*, *restriction fragment length polymorphism (RFLP)-polymerase chain reaction (PCR)*, zielgerichteter Mutagenese und morphometrischer Analyse nach gezielt gesetzter Hirnläsion untersucht.

#### 3.1 Historischer Hintergrund

Die Sichtweise des Gehirns hat sich seit dem neunzehnten Jahrhundert grundlegend geändert. Die bahnbrechenden Entdeckungen des tschechischen Physiologen Johannes Purkinje im Jahr 1837 legten den Grundstein für die Neurondoktrin. Erstmals war es gelungen, einzelne Neurone, die sogenannten Purkinje-Neurone im Kleinhirn, sichtbar zu machen (Purkinje, 1837). Im Jahr 1865 schließlich war es Otto Friedrich Karl Deiters, der die multiplen Ausläufer eines Motoneurons darstellen konnte. Er beschrieb zwei verschiedene Arten zellulärer Ausläufer, nämlich die multiplen Ausläufer variabler Geometrie und die singulären unverzweigten röhrenförmigen Ausläufer. Mit dieser Beobachtung konnte er schon vor 140 Jahren zwischen Dendriten und Axonen differenzieren. Währenddessen entwickelte Claude Bernard das Konzept der synaptischen Transmission. Seine Erkenntnis, daß Curare am motorischen Nerv und nicht am Muskel wirkt, erforderte die Gegenwart von Signalübertragungsstellen zwischen den zellulären Einheiten Nerv und Muskel (Bernard, 1856). Zwei Theorien hinsichtlich der Struktur-Funktion-Beziehungen im Gehirn waren geboren. Eine Gruppe von Wissenschaftlern verteidigte die retikuläre Theorie, nach der das Gehirn aus einer einheitlichen Masse bestand. Die andere Fraktion glaubte an die Existenz funktioneller Einheiten. Die Pionierarbeiten von Camillo Golgi, der selbst an die retikuläre Theorie glaubte, erbrachten schließlich den endgültigen Beweis für die Neurondoktrin. Ihm war es anhand einer neuartigen, selbst entwickelten Technik gelungen, die sogenannten Golgizellen darzustellen (Golgi, 1873). Glücklicherweise waren es nur einige wenige Neurone, die mit einer Kombination von Kalium(di)chromat und Silberimprägnierung gefärbt werden konnten, denn dadurch konnten sie in vollem morphologischen Umfang dargestellt werden. Darauf aufbauend konnten schließlich Ramón y Cajal und Sir Charles Sherrington feststellen, daß die funktionellen Einheiten über Zell-zu-Zell-Kontakte miteinander kommunizieren. Der Termini-

nus "Synapsis", welcher später im Zuge der Anglizierung in "Synapse" übersetzt wurde, war eingeführt worden (Sherrington, 1897). Ein halbes Jahrhundert später lieferte die Elektronenmikroskopie die ersten Einsichten in die Ultrastruktur einer Synapse (Palade & Palay, 1954).

### **3.2 Die postsynaptische Rezeptorverankerung ist dynamisch und reversibel**

Fortan gewährten morphologische Analysen zunehmend detailliertere Einblicke in die Struktur des Gehirns. Die auf diese Weise entstandene statische Sichtweise des Gehirns vermittelte jedoch zunächst ein falsches Bild vom Zusammenspiel der einzelnen funktionellen Einheiten sowohl auf zellulärer als auch auf subzellulärer Ebene. Mit der Darstellung von GlyR in lebenden Neuronen gelang es erstmals, einen Eindruck über die Dynamik, welche der subzellulären Lokalisierung dieser Rezeptoren zugrunde liegt, zu gewinnen (Meier et al., 2001). Wir konnten zeigen, daß postsynaptische GlyR-Anhäufungen keineswegs statisch zu interpretieren sind. Im Gegenteil, die postsynaptische GlyR-Stabilisierung ist reversibel. Dementsprechend können die sich lateral in der Plasmamembran beweglichen GlyR durch Interaktion mit einem postsynaptischen Gephyrin-Aggregat solange lokal stabilisiert werden, bis sie sich schließlich wieder davon lösen und weiterdiffundieren (Meier et al., 2001). Hierauf aufbauende Studien haben gezeigt, daß die GlyR-Bewegung sogar innerhalb eines postsynaptischen Gephyrin-Aggregats durch unterschiedliche Diffusionskonstanten gekennzeichnet ist (Dahan et al., 2003). Dabei verlangsamt das Eindringen der Rezeptoren in ein postsynaptisches Gephyrin-Aggregat die Diffusionsgeschwindigkeit mit zunehmender Eindringtiefe. Dieses Erkenntnis des dynamischen und reversiblen Charakters der postsynaptischen GlyR-Verankerung fand in anderen Neurotransmitter-Rezeptorsystemen zunehmend Bestätigung. Die Oberflächendiffusion von GluR und mGluR wird in vergleichbarer Weise durch die Bindung an die entsprechenden postsynaptischen Ankerproteine beeinflusst (Serge et al., 2002; Tardin et al., 2003). Hinsichtlich ihrer postsynaptischen Stabilisierung reagieren GluR und mGluR jedoch unterschiedlich auf Rezeptoraktivierung. GluR werden in ihrer Oberflächendiffusion infolge der Rezeptoraktivierung eingeschränkt (Borgdorff & Choquet, 2002), wohingegen die Oberflächendiffusion von mGluR zunimmt (Serge et al., 2002). Weiterhin unbekannt ist jedoch, wie sich die GlyR-Aktivierung auf die Oberflächendiffusion selbiger auswirkt. Dies herauszufinden wäre besonders inter-

essant hinsichtlich der Kalzium-Abhängigkeit der postsynaptischen GlyR-Stabilisierung und Synaptogenese (siehe 2.2.2).

### 3.3 Regulierung der postsynaptischen Rezeptorverankerung

Die Dynamik und Reversibilität der postsynaptischen GlyR-Verankerung ist insofern erstaunlich, als bisherige morphologische Studien ein vorwiegend statisches Bild postsynaptischer Rezeptoren vermittelt. Darüber hinaus wurde die GlyR-Gephyrin-Bindung *in vitro* als äußerst stabil beschrieben (Pfeiffer et al., 1982). Dementsprechend muß es Neuron-interne Mechanismen geben, die zu einer Abschwächung der GlyR-Gephyrin-Bindung führen. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die molekulare Vielfalt, die durch das Spleißen der Gephyrin-mRNA entsteht, einen wesentlichen Einfluß auf die Stabilität der postsynaptischen GlyR-Verankerung ausübt. Wir konnten eine Gephyrin-Variante isolieren und klonieren, welche durch Hinzufügen einer 13 Aminosäuren langen Sequenz (C5-Kassette) entsteht und sich nachteilig auf die GlyR-Bindung auswirkt (Meier et al., 2000a). Schließlich stellte sich heraus, daß diese C5-Gephyrin-Variante vorwiegend in GABAergen postsynaptischen Domänen anzutreffen ist (Meier & Grantyn, 2004a). Somit sorgt die Gegenwart der C5-Gephyrin-Variante in GABAergen Synapsen durch ein GlyR-Ausschlußverfahren für die wechselseitige Anpassung von Prä- und Postsynapse hinsichtlich des freigesetzten Neurotransmitters. C5-Gephyrin ist jedoch auch zu geringeren Anteilen in gemischten glyzineren/GABAergen und rein glyzineren Synapsen anzutreffen. Es ist daher davon auszugehen, daß C5-Gephyrin auch an der Regulierung der postsynaptischen GlyR-Verankerung gegenüber Glyzin-Freisetzungstellen beteiligt ist. Die Regulierung der postsynaptischen GABA<sub>A</sub>R-Verankerung hingegen gestaltet sich vielseitiger. Einerseits schlugen seither sämtliche Versuche fehl, eine Gephyrin-Variante zu isolieren, die direkt mit einer der GABA<sub>A</sub>R-Untereinheiten interagieren kann. Andererseits spielen posttranslationale Veränderungen wie beispielsweise Phosphorylierung eine wesentliche Rolle bei der postsynaptischen GABA<sub>A</sub>R-Verankerung. Die GABA<sub>A</sub>R- $\gamma$ 2-Untereinheit wird zur postsynaptischen Rezeptorverankerung benötigt (Essrich et al., 1998). Sie liegt in den zwei Varianten  $\gamma$ 2S und  $\gamma$ 2L vor, wobei die  $\gamma$ 2L-Untereinheit durch Hinzufügen einer 8 Aminosäuren langen Sequenz in die zytoplasmatische Schleife zwischen Transmembrandomänen 3 und 4 entsteht (Whiting et al., 1990). Innerhalb dieser 8 Aminosäu-

ren befindet sich eine Serin-/Threonin-Proteinkinase-Konsensussequenz (Moss et al., 1992). Die physiologische Relevanz des GABA<sub>A</sub>R- $\gamma$ 2-mRNA-Spleißens wurde erstmals in der klinischen Forschung beschrieben. In Schizophreniepatienten wurde eine Veränderung im Verhältnis  $\gamma$ 2S-zu- $\gamma$ 2L zugunsten der  $\gamma$ 2L-Untereinheit festgestellt (Huntsman et al., 1998). Gleichzeitig findet eine Abregulierung der Expressionsstärken des GABA-Transporters GAT1 sowie des GABA-synthetisierenden Enzyms GAD67 statt, welche sich in einer Abschwächung der GABAergen Hemmung widerspiegelt (Volk & Lewis, 2002). Möglicherweise ist die Aufregulierung der  $\gamma$ 2L-Untereinheit in Schizophreniepatienten als Bestandteil eines kompensatorischen Mechanismus anzusehen, denn die  $\gamma$ 2L-Untereinheit ist signifikant effektiver hinsichtlich der postsynaptischen GABA<sub>A</sub>R-Verankerung (Meier & Grantyn, 2004b). Zudem weisen transgene Mäuse, welche ausschließlich die  $\gamma$ 2S-Untereinheit exprimieren, eine niedrigere Schwelle zur Entwicklung von Angstzuständen auf (Quinlan et al., 2000). Es besteht also kein Zweifel daran, daß alternatives Spleißen der GABA<sub>A</sub>R- $\gamma$ 2-Untereinheit (patho-)physiologisch relevant ist. Die Effizienz der postsynaptischen Verankerung der GABA<sub>A</sub>R- $\gamma$ 2-Untereinheit kann durch Phosphorylierung der Serin-/Threonin-Proteinkinase-Konsensussequenz innerhalb der  $\gamma$ 2L-Untereinheit noch gesteigert werden (Meier & Grantyn, 2004b). Diese  $\gamma$ 2L-vermittelte Regulierung der postsynaptischen GABA<sub>A</sub>R-Verankerung wird sich jedoch vorwiegend in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien auswirken, denn die  $\gamma$ 2L-Untereinheit wird in juvenilem Gewebe nicht exprimiert (Roberts & Kellogg, 2000; Henneberger et al., 2005). Daher ist davon auszugehen, daß neben der GABA<sub>A</sub>R- $\gamma$ 2-Untereinheit andere GABA<sub>A</sub>R-Untereinheiten regulatorisch in die postsynaptische Rezeptor-Verankerung eingreifen. Ein Kandidat hierfür stellt die GABA<sub>A</sub>R- $\beta$ 3-Untereinheit dar. Sie akkumuliert in postsynaptischen Domänen während der *in vitro*-Differenzierung von Neuronen des Hippocampus zeitlich vor und unabhängig von der GABA<sub>A</sub>R- $\gamma$ 2-Untereinheit (Danglot et al., 2003). Zudem konnte gezeigt werden, daß die GABA<sub>A</sub>R- $\beta$ 3-Untereinheit in transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) mit Gephyrin-Aggregaten kolokalisiert (Kirsch et al., 1995).

### 3.4 Plastizität inhibitorischer Synapsen

Die zuvor beschriebenen regulatorischen Mechanismen der postsynaptischen GlyR- und GABA<sub>A</sub>R-Verankerung dienen einerseits der wechselseitigen Anpassung von Prä- und Postsynapse hinsichtlich des freigesetzten Neurotransmitters und andererseits der Feineinstellung der postsynaptischen Antwortfähigkeit. Möglicherweise liefern sie damit auch eine Erklärung für die Variabilität der postsynaptischen Antwort auf evozierte Neurotransmitterfreisetzung (Kirischuk et al., 1999a). Die Plastizität des inhibitorischen Systems stellt eine Grundvoraussetzung für die Entstehung adaptiver Prozesse im ZNS dar. Um diese eingehender zu studieren, haben wir die Auswirkungen pharmakologischer Manipulationen in einem Läsionsmodell studiert, welches erstmals von Kristen Harris und Kollegen vorgestellt wurde (Kirov et al., 1999). Harris und Kollegen konnten zeigen, daß während der Inkubation von Hirnschnitten in ACSF vielseitige Reorganisationsprozesse stattfinden. Beispielsweise verdoppelt sich die Anzahl glutaminerger Dornen während dieser sogenannten *slice recovery* (Kirov et al., 1999). Wir haben herausgefunden, daß sich auch die Anzahl GABAerger Synapsen im Schnittpräparat des embryonalen Superior Colliculus während der *slice recovery* verdoppelt (Meier et al., 2003). Damit ist dieses Versuchsmodell zur Studie der Mechanismen, welche solchen Reorganisationsprozessen zugrunde liegen, sehr gut geeignet. Gleichzeitig zeigen diese Erkenntnisse, daß der Synapsenneubildungsprozeß ähnlich wie die postsynaptische Rezeptorverankerung hochdynamisch ist. Glutaminerge Synapsen können sogar innerhalb von 30 Minuten entstehen (Niell et al., 2004). Durch die pharmakologische Manipulation ausgewählter Signalsysteme während der *slice recovery* erkannten wir, daß sich GABA<sub>A</sub>R- und L-Typ-Kalziumkanal-Aktivierung nachteilig auf die Neubildung GABAerger Synapsen auswirkt. Diese Beobachtung war insofern unerwartet (siehe 2.2.2), als Heinrich Betz und Kollegen das Erfordernis einer L-Typ-Kalziumkanal-Aktivierung für die Synapsenneubildung zeigten (Kirsch & Betz, 1998). Die eingehendere Analyse der während der *slice recovery* stattfindenden Kalzium-abhängigen Prozesse ergab jedoch schließlich, daß die Neubildung inhibitorischer Synapsen im wesentlichen von der PKC-Aktivität gesteuert wird (Meier et al., 2003). Die Aktivität membranständiger PKC hängt wiederum vom intrazellulären Kalziumspiegel ab. Während der ersten Stunden der *slice recovery* sind Neurone im Schnitt depolarisiert und weisen eine deutliche Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration auf (Walter et al.,

2005). Diese Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels löst eine PKC-Depletion aus, welche durch pharmakologische Blockade von GABA<sub>A</sub>R, L-Typ-Kalziumkanälen und sogar mGluR während der *slice recovery* verhindert werden kann (Walter et al., 2005). Die pharmakologischen Manipulationen führen damit indirekt zu einer Erhöhung der Aktivität membranständiger PKC und fördern die Neubildung inhibitorischer Synapsen. Mit dieser Beobachtung bestätigten wir frühere Untersuchungen, nach denen eine GluR-Aktivierung bereits innerhalb von 15 Minuten zu einem Kalziumbedingten Verlust membranständiger PKC-Aktivität führt (Durkin et al., 1996). Interessanterweise leitet eine PKC-Depletion auch das Absterben von Neuronen ein (Durkin et al., 1997). Die intrazelluläre Kalziumhomöostase wird dadurch zu einem Primärziel in der Entwicklung neuroprotektiver Therapien (siehe 3.5). Im Hinblick auf die Neubildung inhibitorischer Synapsen während der *slice recovery* ist bekannt, daß die PKC-Aktivierung die axonalen (Kabir et al., 2001; Rosdahl et al., 2002) und dendritischen (Schrenk et al., 2002) Verästelungen begünstigt. Zunehmende dendritische Verästelungen werden schließlich die Neubildung inhibitorischer Synapsen fördern, indem sie die Kontaktoberfläche am rezeptiven Neuron vergrößern. Unsere Beobachtung, wonach die Anzahl der Synapsen mit dem Ausmaß der Dendritenverästelung korreliert (Singh et al., 2005), spricht für diese Annahme. Die Mechanismen, welche die Dendritenverästelung beeinflussen, sind jedoch vielseitiger. Diesbezüglich konnten wir feststellen, daß sich auch die Zelldichte auf die Anzahl der Primärdendriten sowie deren Verästelung und Längenwachstum auswirkt (Salama-Cohen et al., 2005). Die Vergrößerung der rezeptiven dendritischen Fläche vermittelt jedoch keine Spezifität in Bezug auf die Synapsen-neubildung. Insofern müssen weitere, Spezifität-vermittelnde Mechanismen existieren. In diesem Zusammenhang wurde deutlich, daß es bestimmte Zelladhäsionsmoleküle sind, die einen spezifischen Beitrag zur inhibitorischen Synaptogenese leisten. Es sind dies die Zelladhäsionsmoleküle Neurexin und Neuroligin. Neuroligin-1 hat die Eigenschaft, die präsynaptische Differenzierung glutaminerger Terminalien zu induzieren (Scheiffele et al., 2000; Fu et al., 2003), wohingegen Neuroligin-2 spezifisch die Entwicklung inhibitorischer präsynaptischer Terminalien bewirkt (Varoqueaux et al., 2004; Graf et al., 2004). Die Mechanismen, welche in die Läsions-induzierte Restrukturierung neuronaler Netzwerke eingreifen, sind demnach vielseitig und betreffen verschiedene Ebenen der intra- und interzellulären Signalverarbeitung. Die intrazelluläre Kalzium-

homöostase betrifft Veränderungen, welche Zelldifferenzierung, Zelltod und Neuritenwachstum umfassen, wohingegen die Spezifität hinsichtlich der wechselseitigen Anpassung zwischen prä- und postsynaptischen Domänen durch die Interaktion bestimmter Zelladhäsionsmolekülpaare auf interzellulärer Ebene gewährleistet wird.

### 3.5 RNA-Editierung und neuroprotektive Therapieansätze

Wie schon in Paragraph 3.4 erwähnt, stellt die intrazelluläre Kalziumhomöostase ein zukünftiges Primärziel in der Entwicklung neuroprotektiver Therapien dar. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß die gezielte Manipulation intrazellulärer Kalziumspiegel einen großen Stellenwert in der Behandlung von Hypererregbarkeitserkrankungen sowie in der Prävention neurotoxischer Prozesse einnehmen wird (Pisani et al., 2004). Daher schätzen wir die Entdeckung einer hocheffizienten GlyR- $\alpha$ 3-Untereinheit als äußerst bedeutsam ein (Meier et al., 2005). Verglichen mit der ursprünglich publizierten DNA-Sequenz (Kuhse et al., 1990) trägt diese atypische GlyR- $\alpha$ 3-Untereinheit ein Uracil an Position 554 anstelle eines Cytidins. Dieser Einzelnukleotidpolymorphismus zieht schließlich die Aminosäuresubstitution Prolin-zu-Leucin an Position 185 (P185L) nach sich. GlyR- $\alpha$ 3<sub>P185L</sub> zeichnet sich durch eine deutlich erhöhte apparente Affinität gegenüber den Agonisten Glyzin und Taurin aus. Die Wirksamkeit des Cytidineaminase-Antagonisten Zebularine sowie die Abwesenheit des Einzelnukleotidpolymorphismus vom Genom sprechen dafür, daß GlyR- $\alpha$ 3<sub>P185L</sub> das Ergebnis einer C-zu-U-mRNA-Editierung ist. Dank der Prionierarbeiten von Peter Seeburg und Kollegen wurde bereits in den 90er Jahren erkannt, daß RNA-Editierungsprozesse eine wesentliche Rolle bei der Signalverarbeitung im ZNS spielen (siehe 1 und 2.1.3.3) (Seeburg & Hartner, 2003). Interessanterweise ist das GlyR- $\alpha$ 3<sub>P185L</sub>-Vorkommen regulierbar. Während der *slice recovery* von juvenilen Superior Colliculus-Schnitten, in denen die Wirkungsweise von Chloridkanälen bereits hyperpolarisierend ist, findet eine Aufregulierung des  $\alpha$ 3<sub>P185L</sub>-Vorkommens statt. In adulten Schnitten des Superior Colliculus hingegen findet eine Abregulierung des  $\alpha$ 3<sub>P185L</sub>-Vorkommens statt. Wie bereits in Paragraph 3.4 erwähnt, ist die Mehrheit der Neurone während der *slice recovery* stark depolarisiert und weist erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel auf. Gleichzeitig ist bekannt, daß die neuronale intrazelluläre Kalziumpufferkapazität stetig bis hin zu adulten Entwicklungsstadien abnimmt (Fierro & Llano, 1996). Demzufolge könnte die intra-

zelluläre Kalziumpufferkapazität eine wesentliche Rolle bei der Regulierung des  $\alpha_3\text{P}_{185\text{L}}$ -Vorkommens spielen. Zumindest spricht die Abregulierung des  $\alpha_3\text{P}_{185\text{L}}$ -Vorkommens in Hirnschnitten, die in Nifedipin-haltiger ACSF inkubiert wurden, für diese Arbeitshypothese. Möglicherweise paßt sich das  $\alpha_3\text{P}_{185\text{L}}$ -Vorkommen an den intrazellulären Kalziumspiegel an und wird somit zum Angriffspunkt in der Therapie und Prävention von Hypererregbarkeitserkrankungen. Leider wissen wir bislang jedoch nicht, wie das  $\alpha_3\text{P}_{185\text{L}}$ -Vorkommen pharmakologisch aufreguliert werden kann. Weiterhin ist zu bedenken, daß in der Krebstherapie versucht wird, DNA-Hypermethylierung und damit das *silencing* von Tumorsuppressorgenen mittels Zebularine zu unterbinden (Esteller, 2005). Neben seiner Eigenschaft, die Cytidineaminase zu blockieren, hemmt Zebularine die Hypermethylierung von CpG-*islands* innerhalb bestimmter Tumorsuppressorgene und ruft dadurch eine gesteigerte Transkription dieser Gene hervor. Dies würde bedeuten, daß eine Zebularine-basierte Krebstherapie das Auftreten von Hypererregbarkeitserkrankungen möglicherweise begünstigen könnte. Dies ist und wird jedoch Gegenstand unserer zukünftigen Forschungsaktivitäten sein.