

Aus dem Johannes-Müller-Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Glutamaterge Modulation der GABAergen
synaptischen Transmission durch
metabotrope Glutamatrezeptoren der
Gruppe I sowie deren Einfluss auf die
Synaptogenese in Hirnschnittpräparaten**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité
Universitätsmedizin Berlin

von
Jan Walter
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. R. Grantyn
 2. Prof. Dr. H.-J. Pflüger
 3. Priv.-Doz. Dr. I. E. Blasig

Datum der Promotion: 8. November 2006

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	INHIBITORISCHE SYNAPTISCHE TRANSMISSION IM <i>COLLICULUS SUPERIOR</i>	6
1.2	SYNAPTISCHE INHIBITION VIA Γ -AMINO BUTTERSÄURE	9
1.3	EIGENSCHAFTEN UND FUNKTIONEN METABOTROPER GLUTAMATREZEPTOREN	10
1.4	MODULATION DER GABAERGEN TRANSMISSION DURCH METABOTROPE GLUTAMAT- REZEPTOREN DER GRUPPE I	13
1.5	PERAKUTE SYNAPTOGENESE IN HIRNSCHNITTPRÄPARATEN	15
1.6	AUFGABENSTELLUNG.....	18
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	VERWENDETE CHEMIKALIEN UND HERSTELLUNG DER HIRNSCHNITTPRÄPARATE	20
2.2	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE MESSUNGEN	21
2.3	SEMIQUANTITATIVE mRNA-BESTIMMUNG DURCH RT-PCR	24
2.4	IMMUNHISTOCHEMIE UND KONFOKALE MIKROSKOPIE	25
2.5	PKC-AKTIVITÄTSBESTIMMUNG	27
2.6	BESTIMMUNG DER Ca^{2+} -KONZENTRATIONEN IN AKUTEN UND INKUBIERTEN HIRNSCHNITTEN	28
2.7	STATISTISCHE ANALYSE DER ERHOBENEN DATEN	29
3	ERGEBNISSE	30
3.1	METABOTROPE GLUTAMATREZEPTOREN DER GRUPPE I IM <i>COLLICULUS SUPERIOR</i> DER MAUS	30
3.1.1	<i>Änderung der entwicklungsabhängigen Verteilung der mGluR1- und mGluR5-mRNA- Expression sowie der Expression der PKC-Isoformen im Colliculus superior.....</i>	<i>30</i>
3.2	DIE EFFEKTE EINER AKUTEN TRANSIENTEN GRUPPE I MGLUR-AKTIVIERUNG AUF DIE GABAERGE SYNAPTISCHE TRANSMISSION IN SCHNITTEN DES <i>COLLICULUS SUPERIOR</i> ..	32
3.2.1	<i>Die Aktivierung von Gruppe I mGluR führt zu einer signifikanten Zunahme in der Ereignisfrequenz spontaner IPSCs.....</i>	<i>32</i>
3.2.2	<i>Die Frequenz der GABAergen mIPSCs wird durch Quisqualat-induzierte mGluR1/5- Aktivierung signifikant erhöht</i>	<i>34</i>

3.3	DIE MODULATION DER POSTSYNAPTISCHEN GABA _A -REZEPTOREN DURCH GRUPPE I mGLUR IST PKC-ABHÄNGIG	36
3.3.1	<i>Quisqualat senkt die Amplitude von GABA-induzierten inhibitorischen Strömen</i>	36
3.3.2	<i>Perforated-patch-clamp-Aufzeichnungen colliculärer mIPSCs zeigen einen PKC- vermittelten suppressiven Effekt von Gruppe I mGluR auf synaptische GABA_A- Rezeptoren</i>	37
3.4	ZUNAHME DER ANZAHL INHIBITORISCHER SYNAPTISCHER TERMINALIEN IN AKUTEN HIRNSCHNITTEN DES <i>COLLICULUS SUPERIOR</i> POSTNATALER MÄUSE.....	39
3.4.1	<i>Die VIAAT/Synapsin-Co-Lokalisation als Marker inhibitorischer Synapsen im Colliculus superior</i>	40
3.4.2	<i>Eine 2,5-stündige Inkubation in ACSF führt zu einer Zunahme der VIAAT/Syn- positiven synaptischen Terminalien.....</i>	41
3.5	DIE CHRONISCHE BLOCKADE DER mGLUR1/5 BESCHLEUNIGT DIE WIEDERHERSTELLUNG DER BASALEN INTRAZELLULÄREN Ca ²⁺ -KONZENTRATIONEN UND BEEINFLUSST DEN AKTIVITÄTSGRAD Ca ²⁺ -ABHÄNGIGER PKC-ISOFORMEN.....	43
3.5.1	<i>Eine chronische mGluR1/5-Blockade fördert die Normalisierung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration nach dem Schneiden von Hirngewebe.....</i>	43
3.5.2	<i>Zunahme der Aktivität Ca²⁺-abhängiger PKC-Isoformen nach chronischer Applikation von Gruppe I mGluR-Antagonisten</i>	44
3.6	EINE CHRONISCHE GRUPPE I mGLUR-BLOCKADE BESCHLEUNIGT DIE INHIBITORISCHE SYNAPTOGENESE IN AKUTEN HIRNSCHNITTEN	46
3.7	DIE ZUNAHME DER ZAHL INHIBITORISCHER SYNAPTISCHER TERMINALIEN IST MIT EINER VERSTÄRKTEN INHIBITORISCHEN SYNAPTISCHEN AKTIVITÄT ASSOZIIERT	48
4	DISKUSSION.....	51
4.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE UND SCHLUSSFOLGERUNG	51
4.2	ENTWICKLUNGSABHÄNGIGE VERTEILUNGSÄNDERUNG DER mGLUR1/5-MRNA- EXPRESSION.....	52
4.3	PRÄSYNAPTISCHE MODULATION DER GABAERGEN INHIBITION DURCH mGLUR1/5	53
4.4	POSTSYNAPTISCHE MECHANISMEN DER GRUPPE I mGLUR-WIRKUNG.....	55
4.5	STRUKTURELLE VERÄNDERUNGEN IN HIRNSCHNITTEN <i>IN VITRO</i>	59
4.6	DIE AKUTE INHIBITORISCHE SYNAPTOGENESE IN HIRNSCHNITTEN DES OBERFLÄCHLICHEN <i>COLLICULUS SUPERIOR</i> DER POSTNATALEN MAUS.....	61

4.7	DIE CHRONISCHE APPLIKATION VON GRUPPE I mGLUR-ANTAGONISTEN UND PDBU BESCHLEUNIGT DIE INHIBITORISCHE SYNAPTOGENESE	64
4.7.1	<i>Die Aktivität der für die Synaptogenese essentiellen PKC-Isoformen unterliegt einer [Ca²⁺]_i-Abhängigkeit und wird durch Gruppe I mGluR-Antagonisten moduliert</i>	66
5	ZUSAMMENFASSUNG	70
A.	LITERATURVERZEICHNIS.....	72
B.	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	95
C.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	97
D.	TABELLENVERZEICHNIS.....	98
E.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	99
F.	DANKSAGUNG	101
G.	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	102
H.	LEBENS LAUF	103

B. Eigene Veröffentlichungen

Artikel in wissenschaftlichen Zeitschriften

Henneberger C, Jüttner R, Schmidt SA, Walter J, Meier JC, Rothe T, Grantyn R (2005) GluR- and TrkB-mediated maturation of GABA receptor function during the period of eye opening. *Eur. J. Neurosci.* 21(2): 431-40

Walter J, Henneberger C, Akyeli J, Schmidt SA, Henning M, Erdmann B, Mueller U, Meier JC, Grantyn R (2006) Activity and formation of GABAergic synapses in neonatal brain slices under the control of group I mGluRs. *Manuskript in Vorbereitung*

Abstrakta

J. Walter, J. Meier, C. Henneberger, U. Müller, R. Grantyn. Pre- and Postsynaptic group I metabotropic glutamate receptors modulate GABAergic synaptic transmission and inhibitory synaptogenesis. In *FENS Abstr.*, A109.27, 2004

R. Grantyn, C. Henneberger, J. Walter, S. Kirischuk, J. Meier. GABAergic and glutamatergic synptogenesis in acute brain slices: age dependency and the influence of BDNF, TrkB and neuronal resting calcium levels. In *FENS Abstr.*, A006.14, 2004

J. Walter, R. Jüttner, R. Grantyn. Activation of group I metabotropic glutamate receptors facilitates the GABAergic inhibition in mouse superior colliculus. *Berlin Neuroscience Forum (BNF) Abstr.*, 2002

Vorträge

Glutamatergic modulation of GABAergic inhibition: The role of group I mGluRs and PKC.,
Development and disease of the brain - Next Neuroscience Generation Meeting, Berlin, 2003

The role of group I mGluRs in the developmental plasticity of inhibitory synapses., *GRK 238, Berlin, 2002*

C. Abbildungsverzeichnis

1.1	Der <i>Colliculus superior</i> (CS) der Maus.	7
1.3	Die mGluR-Proteinstruktur, Funktionsweise und Sequenz Homologie	13
2.2	Schematische Darstellung und Ersatzschaltbild der <i>whole-cell</i> Konfiguration	23
2.2	Ableitung von spannungsaktivierten K ⁺ -Strömen im <i>perforated patch</i>	25
3.1.1	Durch semiquantitative RT-PCR bestimmte altersabhängige Expression von mGluR1-, mGluR5-, PKC α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, η - und PKC θ - mRNA in den oberflächlichen Schichten des <i>Colliculus superior</i> der Maus.....	31
3.2.1	Akute Effekte der Gruppe I mGluR-Aktivierung auf spontane inhibitorische postsynaptische Ströme (sIPSCs).....	34
3.2.2	Akute Effekte der mGluR1/5-Aktivierung auf Miniatur-IPSCs (mIPSCs)	36
3.3.2	Akute postsynaptische Suppression der mIPSC-Aktivität nach Gruppe I mGluR Aktivierung.....	38
3.4.1	<i>In situ</i> Synaptogenese im <i>Colliculus superior</i> postnataler Mäuse	40
3.4.2	EM-Aufnahmen der <i>in situ</i> Synaptogenese in Hirnschnitten des sCS	42
3.5.1	Regeneration der Ruhe-Konzentration intrazellulären Kalziums ($[Ca^{2+}]_i$) in akuten Schnitten.....	44
3.5.2	Die chronische Blockade der Gruppe I mGluRs durch AIDA und MPEP in der Inkubationslösung steigert die PKC-Aktivität in der Gegenwart von Ca ²⁺	45
3.6	Beschleunigung der inhibitorischen Synaptogenese in akuten Hirnschnitten durch Blockade der Gruppe I mGluR.....	47
3.7	Gesteigerte synaptische Aktivität in P0 sCS-Schnitten der Maus, die für 2,5h mit Gruppe I mGluR Antagonisten behandelt wurden	49
4.7.1	Vereinfachte schematische Darstellung der Wirkung verschiedener Effektoren auf die reaktive <i>in situ</i> Synaptogenese	68

D. Tabellenverzeichnis

2.3	Aufstellung der für semiquantitative mRNA-Bestimmung verwendeten Primer-Paare	25
3.6	VIAAT-IR positive <i>puncta</i> pro Gesichtsfeld.	48
3.7	Gegenüberstellung elektrophysiologischer Messdaten von sCS-Hirnschnitten der Alterstufen P0 und P7.....	50

E. Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ACSF	künstliche Liquorflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid)
ACPD	1-Aminocyclopentan-trans-1,3-Dikarboxyl Säure
AIDA	1-Aminoindan-1,5-Dikarboxyl Säure
AP	Aktionspotential
APV	DL-2-Amino-5-Phosphovalerinsäure
AMPA	(S)- α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CS	<i>Colliculus superior</i>
CC	Chelerythrin Chlorid
CHPG	(RS)-2-Chloro-5-Hydroxyphenylglyzin
Cy3	Carboxymethyl-Indocyanine-3
DHPG	3,5-Dihydroxyphenylglyzin
DNQX	6,7-Dinitroquinoxalin-2,3(1H,4H)-Dion
DAG	Diazylglyzerol
EGFP	<i>enhanced green fluorescend protein</i>
eIPSC	evozierter inhibitorischer postsynaptischer Strom
EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA _A R	GABA _A -Rezeptor
GAD	Glutamatdecarboxylase
GAT	GABA-Transporter
GluR	Glutamatrezeptor
G-Protein	Guanylnukleotid-regulatorisches Protein
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat

IPSC, -s	inhibitorischer postsynaptischer Strom, <i>Pl.</i>
mIPSC	Miniatur-IPSC
MPEP	6-Methyl-1-(Phenylethynyl) Pyridin
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor, <i>Pl.</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDBu	Phorbol-12,13-Dibutytrat
PKA, PKC	Proteinkinase A, C
PLC	Phospholipase C
QA	Quisqualat
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SAI	<i>Stratum album intermedium</i>
sCS	superfizieller CS
SGI	<i>Stratum griseum intermedium</i>
SGS	<i>Stratum griseum superficiale</i>
sIPSC	spontaner inhibitorischer postsynaptischer Strom
SOp	<i>Stratum opticum</i>
Syn	Synapsin
SZ	<i>Stratum zonale</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TrkA, TrkB, TrkC	Tyrosinkinase-A, -B und -C
TTX	Tetrodotoxin
VGAT	vesikulärer GABA-Transporter
VIAAT	vesikulärer inhibitorischer Aminosäuretransporter
ZNS	zentrales Nervensystem

F. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Rosemarie Grantyn für die freundliche Überlassung des Themas. Erst ihre kontinuierliche Betreuung, die vielen hilfreichen Hinweise und fruchtbaren Diskussionen haben die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht. Dr. René Jüttner möchte ich für seine stete Unterstützung beim Erlernen der Präparation und der *patch-clamp*-Technik danken. Von ihm sowie von Dr. Sergej Kirischuk und Dr. Christian Henneberger bekam ich viele hilfreiche Impulse in Hinblick auf die Möglichkeiten bzw. Grenzen im praktischen Einsatz der elektrophysiologischen Techniken. Unter Beachtung der möglichen Aussagen lehrten sie mich die korrekte Auswertung der Messdaten und deren Interpretation. Dr. Christian Henneberger gilt besonderer Dank für die Durchführung der Experimente zum Ca^{2+} -Imaging. Für die Einarbeitung in molekularbiologische Methoden und insbesondere für die Hilfe beim Erlernen immunhistochemischer Techniken bin ich Dr. Jochen Meier sehr dankbar. Herrn David Betances gilt mein Dank für die exzellente grafische Aufarbeitung der Ergebnisse und für zahlreiche inspirierende außerfachliche Diskussionen.

Zu großem Dank bin ich außerdem Prof. Dr. Rathjen verpflichtet, der mir das konfokale Mikroskop seiner Arbeitsgruppe am MDC-Berlin für viele Stunden zu Verfügung stellte. Ohne die intensive Hilfe von Frau M. Henning und Frau B. Erdmann wäre das Anfertigen der elektronenmikroskopischen Bilder nicht möglich gewesen. Ganz besonderer Dank gebührt darüber hinaus Prof. Dr. Ulrich Müller für die gemeinsamen Experimente zur PKC-Aktivitätsbestimmung.

Für ihre Hilfsbereitschaft, die vielen praktischen Hinweise und vor allem für die große Hilfe bei den molekularbiologischen Verfahren möchte ich mich bei Frau Karin Przewdziecki, Frau Ivonne Strömel, und Frau Kerstin Rückwart bedanken.

Meiner Lebensgefährtin Eva Leuschner und meiner gesamten Familie danke ich für die große Unterstützung und schier endlose Geduld, die sie mir über die gesamte Dauer meiner Promotion erwiesen haben.

G. Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsarbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter unter ausschließlicher Nutzung der aufgeführten Materialien, Methoden und Literaturquellen angefertigt zu haben. Ich versichere eidesstattlich, dass die vorgelegte Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Die Experimente zur $[Ca^{2+}]_i$ -Bestimmung (Abschnitt 3.5.1) wurden in Zusammenarbeit mit Dr. med. Ch. Henneberger durchgeführt. Die EM-Aufnahmen im Rahmen der Experimente zur inhibitorischen Synaptogenese (Abb. 10) wurden von Frau M. Henning und Frau B. Erdmann am MDC (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rathjen angefertigt. Die PKC-Aktivitätsbestimmung (Abschnitt 3.5.2) erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. U. Müller am Institut für Neurobiologie der Freien Universität Berlin.

Jan Walter

Berlin, 8. November 2006

H. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

