

# 1 Einleitung

## 1.1 Inhibitorische synaptische Transmission im *Colliculus superior*

Die paarig angelegten *Colliculi superiores* (CS) bilden als mesenzephalere Strukturen zusammen mit den *Colliculi inferiores* das *Tectum mesencephalicum*. Der laminare Aufbau des CS von Säugetieren gliedert sich in zwei Hauptgruppen. Die oberflächlichen Schichten, zu denen das *Stratum zonale* (SZ), das *Stratum griseum superficiale* (SGS) und das *Stratum opticum* (SOp) gezählt werden (superfizieller CS, sCS, siehe Abb. 1), erhalten visuelle Informationen direkt von der Retina und indirekt vom visuellen Kortex (Wallace & Stein, 1996). Im SOp verlaufen vorwiegend Axone, wohingegen die beiden oberflächlicheren Schichten vor allem aus dicht liegenden Neuronen bestehen. Diese können aufgrund ihrer Morphologie in sechs Klassen unterteilt werden: Vertikalzellen mit weitem und schmalen Dendritenfeld, Sternzellen, Horizontalzellen, Marginalzellen sowie multipolare Zellen (Grantyn et al., 1988; Isa & Saito, 2001; Edwards et al., 2002). Die Neurone des sCS reagieren auf visuelle Stimulation entsprechend ihrer rezeptiven Felder in Form retinotoper Karten des kontralateralen Gesichtsfeldes (Siminof & Schwassmann, 1966; Cynader & Berman, 1972; Binns et al., 1999) und des ipsilateralen visuellen Kortex (Lund et al., 1972). Damit erhalten die oberflächlichen Schichten des CS ausschließlich visuelle Informationen – im Gegensatz zu den tieferen Anteilen, wo die eigentliche Integration multimodaler Informationen und die Generierung von Sakkaden stattfindet.

Die tiefen Schichten des CS, bestehend aus *Stratum griseum intermedium*, *Stratum album intermedium*, *Stratum griseum profundum* und *Stratum album profundum*, erhalten sowohl visuelle als auch nonvisuelle sensorische Informationen (Meredith & Stein, 1996; Wallace et al., 1996). Die oberflächlichen und tiefen Schichten des CS sind durch ein weit verzweigtes neuronales Netzwerk miteinander verbunden (Lee et al., 1997; Isa et al., 1998). Insgesamt stellt der *Colliculus superior* eine subkortikale Struktur dar, die in die Integration visueller Informationen eingebunden ist und darüber hinaus angemessene Reaktionen (Zu- oder Abwendung) auf auditive, somatosensorische, nozizeptive und visuelle Reize über efferente Verbindungen zu motorischen Arealen generiert (Stein & Meredith, 1993). Die Aktivität im CS bestimmt sowohl die räumlichen als auch die zeitlichen Charakteristika von

Orientierungsbewegungen. So kann die elektrische Mikrostimulation im CS sakkadierende Bulbusbewegungen auslösen, die von natürlich auftretenden kaum mehr zu unterscheiden sind (Platt et al., 2004).

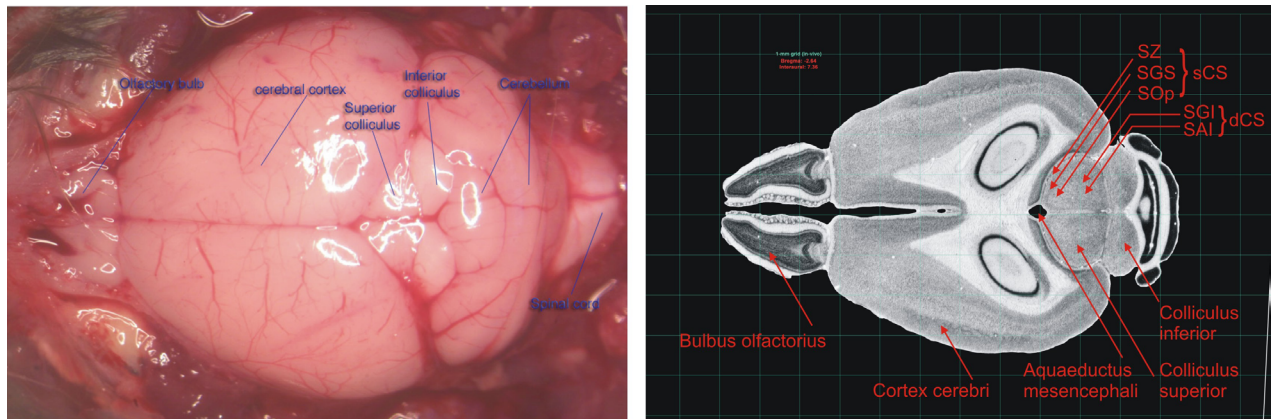


Abbildung 1: *Colliculus superior* (CS) der Maus. Links: Intraoperatives Bild mit Darstellung der Großhirnhemisphären, des zum *Mesencephalon* gehörenden CS, des Kleinhirns sowie des Rückenmarkes. Rechts: MRT-Darstellung mit zonaler Gliederung des CS. Der oberflächliche CS (sCS) gliedert sich in *Stratum zonale* (SZ), *Stratum griseum superficiale* (SGS) und *Stratum opticum* (SOp). Zu den tieferen Schichten (dCS) zählen u.a. das *Stratum griseum intermedium* (SGI) sowie das *Stratum album intermedium* (SAI). Abbildungen modifiziert nach: The Mouse Anatomy Atlas, [www.mbl.org](http://www.mbl.org).

In Nissl-Färbungen ist ein geschichteter Aufbau des sCS der Maus erstmalig am 15. Embryonaltag (E15) erkennbar (Wiener SI, 1986; Hilbig H, 1991), wobei die endgültige Differenzierung der oberflächlichen Schichten um den 17. Tag der Embryonalphase (E17) erfolgt. Zum Zeitpunkt der Geburt (P0) ist die Neurogenese und Neuronenmigration annähernd abgeschlossen, und am 4. postnatalen Tag (P4) können alle Schichten des CS ähnlich wie im adulten Gehirn unterschieden werden (Edwards et al., 1984, Sugiyama & Nakamura; Abb. 1).

Die Lokalisation der einzelnen sCS-Neurone ist von großer Bedeutung, da sie die Position des gesehenen Objektes in retinotopen Koordinaten kodiert. Eine Störung der neuronalen Topographie führte in Experimenten zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Präzision von Augen- und Kopfbewegungen (Schiller et al., 1987). Die Ausbildung dieser retinotektalen Karte ist ein sehr kritischer Prozess im Verlauf der Entwicklung. Während dieses Vorganges müssen die Afferenzen die korrekte Schicht und das richtige Zielneuron innerhalb des CS finden, um

anschließend mit einer exakten Position an der somato-dendritischen Oberfläche der Empfängerzelle zu terminieren (Grantyn et al., 2004). Die Ausbildung und ständige Optimierung dieser visuellen Karten setzt aktivitätsabhängige Mechanismen der Synapsenbildung und Reorganisation voraus. Somit ist der *Colliculus superior* eine exponierte neuronale Struktur für Studien über Synaptogenese und synaptische Plastizität.

Wie mit elektrophysiologischen Aufnahmen von horizontalen Hirnschnitten des sCS nachgewiesen werden konnte, beginnen *colliculäre* Neurone zwischen dem 17. und 18. Embryonaltag, somit zwei Tage vor der Geburt, synaptische Ströme zu generieren. Bereits unmittelbar nach der Geburt konnte diese Spontanaktivität in Schnittpräparaten des sCS sowohl durch Antagonisten der GABAergen Hemmung als auch der glutamatergen Exzitation beeinflusst werden (Jüttner et al., 2001a; Grantyn et al., 2004). Dies lässt vermuten, dass bereits zu diesem frühen Zeitpunkt funktionstüchtige synaptische Verbindungen vorliegen. In Hirnschnitten von drei bis vier Wochen alten Ratten waren in fast allen getesteten Neuronen – zumeist GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (GABA<sub>A</sub>R) vermittelte – inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSCs) festzustellen (Edwards et al., 2002). Dies erklärt sich aus der Zellverteilung im CS. Von den bereits angesprochenen Neuronklassen sind Sternzellen, Horizontalzellen und eine Subpopulation der Vertikalzellen – die sogenannten piriformen Zellen – GABAerge inhibitorische Interneurone, die GABAerge Synapsen in hoher Zahl bilden (Mize, 1992). Da der visuelle CS eine Hirnregion darstellt, die mit ca. 50% besonders reich an GABAergen Neuronen ist (Okada, 1992), eignet er sich hervorragend zum Studium der GABAergen Inhibition.

Die im sCS nachzuweisenden GABAergen Synapsen wurden bereits in einer Reihe von Untersuchungen unter verschiedensten experimentellen Bedingungen sowohl in Kultur (Warton et al., 1990; Kraszewski & Grantyn, 1992) als auch in Schnittpräparaten (Jüttner et al., 2001a,b; Clark et al., 2001; Edwards et al., 2002) untersucht. Im Labor von Prof. Grantyn konnte nachgewiesen werden, dass sich die durch GABA<sub>A</sub>R vermittelten Ströme kurz nach der Geburt durch eine lange, fluktuierende Halbwertszeit, bei jedoch stabiler Amplitude, auszeichnen. Auf der molekularen Ebene fand man niedrige  $\alpha_1$ - und hohe  $\alpha_3$ -Expressionen der GABA<sub>A</sub>R-Untereinheiten. Innerhalb der ersten drei postnatalen Wochen, in die auch die Augenöffnung um den Tag P14 fällt, wandelt sich das Bild: Die Halbwertszeit geht signifikant zurück und stabilisiert sich, die Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit steigt an, während die  $\alpha_3$ -Untereinheit an Bedeutung verliert (Jüttner et al., 2001b). Dabei könnte es sich um einen mit der Augenöffnung, also dem Beginn der visuellen Erfahrung, assoziierten Plastizitätseffekt handeln (Schmidt et al., 2002).

## 1.2 Synaptische Inhibition via $\gamma$ -Aminobuttersäure

Im zentralen Nervensystem (ZNS) ist  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) der am weitesten verbreitete inhibitorische Neurotransmitter (Cherubini & Conti, 2001). Im Gehirn wird GABA von verschiedenen inhibitorischen Interneuronen verwendet, wie z.B. den Korbzellen des Kleinhirns und Hippokampus, den Körnerzellen des *Bulbus olfactorius*, den Amakrinzellen der Retina sowie den Horizontalzellen des *Colliculus superior*. GABA wird in präsynaptischen Terminalien in einer katalytischen Reaktion durch die Glutamatdecarboxylase (GAD) aus Glutamat synthetisiert und über den inhibitorischen Aminosäuretransporter (VIAAT) in die synaptischen Vesikel aufgenommen. Nach der Freisetzung von GABA in den synaptischen Spalt, kann dieser Transmitter zwei Arten von inhibitorischen Rezeptoren aktivieren: ionotrope GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-, sowie metabotrope GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren. Die Eliminierung aus dem synaptischen Spalt erfolgt *per diffusionem* bzw. durch den GABA-Transporter (GAT). Im Gegensatz zu den metabotropen GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren, die über G-Proteine u.a. an Ca<sup>2+</sup>- und K<sup>+</sup>-Kanäle gekoppelt sind, handelt es sich bei den ionotropen GABA-Rezeptoren um Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Kanäle (Chebib & Johnston, 1999; Bormann, 2000).

GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren besitzen eine pentamere Struktur, die aus einer Vielzahl möglicher Untereinheiten zusammengesetzt ist. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden die Untereinheiten  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-4}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  sowie  $\pi$  und  $\rho_{1-3}$  identifiziert (Cherubini & Conti, 2001). Die für die Zusammensetzung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors jeweils verwendeten Untereinheiten bestimmen dessen Eigenschaften. Auch GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren unterscheiden sich von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in ihren pharmakologischen Eigenschaften – insbesondere werden sie nicht durch Bicucullin blockiert oder Benzodiazepine moduliert (Mehta & Ticku, 1999).

Nach Aktivierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors durch GABA kommt es zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit für Chloridionen (Cl<sup>-</sup>). In Abhängigkeit von der intrazellulären und extrazellulären Cl<sup>-</sup>-Konzentration kommt es entweder zum zellulären Ein- oder Ausstrom von Cl<sup>-</sup>. Die damit verbundene Veränderung des Membranpotentials bedeutet eine Hyper- oder Depolarisation des Neurons. Die Wirkung inhibitorischer Neurotransmitter im adulten ZNS ist neben der neuronalen Hyperpolarisation auch durch sogenannte *Shunt*-Mechanismen geprägt. Hierbei werden durch die Verringerung des Membranwiderstandes distale, exzitatorische Eingänge unterdrückt. Die GABAerge synaptische Inhibition spielt eine wesentliche Rolle in physiologischen

Prozessen, wie der Generierung von zentralnervösen Theta- oder Gamma- Rhythmen, aber auch in pathophysiologischen Abläufen, wie beispielsweise bei der Epilepsie (Olsen et al., 1999).

Aufgrund der Komplexität der GABAergen Inhibition ergeben sich vielfältige Modulationsmöglichkeiten. Dabei ist eine Einflussnahme auf die Präsynapse, den synaptischen Spalt und die Postsynapse möglich. Präsynaptisch können die Anzahl der GABAergen Kontakte, die Synthese von GABA, das Beladen der präsynaptischen Vesikel, das Freisetzungsverhalten oder die Wiederaufnahme von GABA aus dem synaptischen Spalt verändert werden. Postsynaptisch bietet die Anzahl an GABA-Rezeptoren, die Rezeptorzusammensetzung, die Leitfähigkeit und der Phosphorylierungszustand der verschiedenen Rezeptoruntereinheiten vielfältige Regulationsmöglichkeiten. Auch die GABA-Wiederaufnahme via GAT, die Diffusion aus dem synaptischen Spalt und *spill-over*-Vorgänge zu benachbarten Synapsen nehmen Einfluss auf die Eigenschaften der inhibitorischen Transmission. Im Folgenden soll die Modulation der GABAergen Inhibition durch metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe I näher beleuchtet werden.

### 1.3 Eigenschaften und Funktionen metabotroper Glutamatrezeptoren

Durch Glutamat aktivierte Rezeptoren werden entsprechend ihrer Funktionsweise in ionotrope und metabotrope Rezeptoren unterteilt. Mehrere Arbeiten haben gezeigt, dass Glutamat als Neurotransmitter in den oberflächlichen Schichten des *Colliculus superior* (sCS) sowohl ionotrope (Bins & Salt, 1994) als auch metabotrope Glutamatrezeptoren aktiviert (Cirone et al., 2002). Ionotrope Glutamatrezeptoren sind kationenspezifische Ionenkanäle, die die Grundlage der schnellen exzitatorischen Transmission bilden. Sie werden in (S)- $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazolpropionsäure (AMPA)/Kainat und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren unterteilt (Nakanishi et al., 1998). Demgegenüber gehören die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren an und vermitteln langsamere Antworten. Dies geschieht durch Aktivierung verschiedener *second-messenger* Kaskaden (Pin & Duvoisin, 1994). Nach kurzer neuronaler Aktivierung können somit oft langanhaltende Änderungen in der synaptischen Aktivität erreicht werden. Metabotrope Glutamatrezeptoren spielen somit unter anderem eine wichtige Rolle in den Mechanismen von Gedächtnisbildung und Lernen (Bordi & Ugolini, 1999).

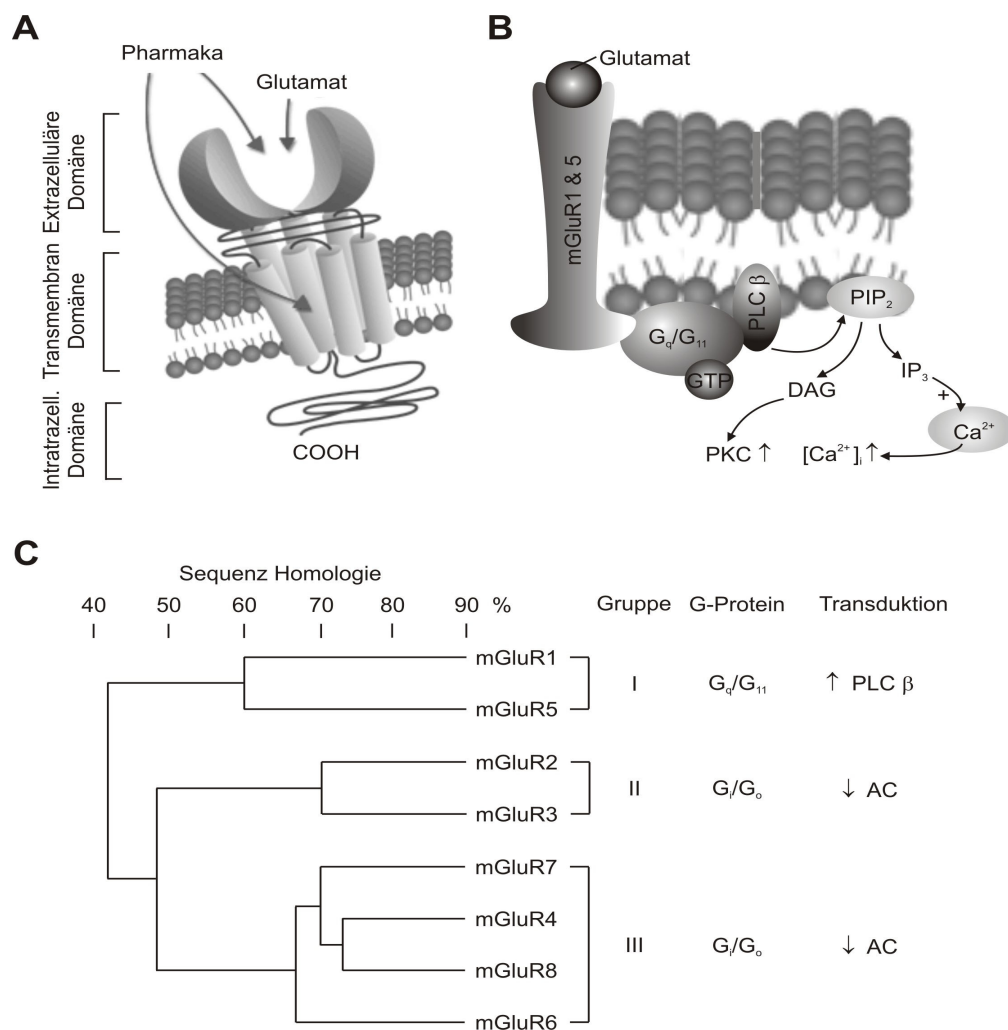


Abbildung 2: Die mGluR-Proteinstruktur, Funktionsweise und Sequenzhomologie der Gruppen. (A) Die N-terminale Fraktion der mGluR-Proteinstruktur liegt außerhalb der Nervenzelle und beinhaltet die Bindungsstelle für Glutamat. Es schließt sich, eingebettet in die Zellmembran, ein Bereich mit sieben transmembranären Domänen an. Sowohl die extrazelluläre als auch die transmembranäre Rezeptordomäne sind potentielle Zielstrukturen für Pharmaka. Der intrazellulär liegende Rezeptoranteil spielt eine entscheidende Rolle für die Aktivierung assoziierter G-Proteine. (vereinfacht nach NPS Pharmaceuticals, USA, [www.npsp.com/drug\\_development/dr\\_mGluRs.php](http://www.npsp.com/drug_development/dr_mGluRs.php)) (B) Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Gruppe I mGluR. An die extrazelluläre Rezeptorbindung schließt sich unter Mitwirkung von G-Proteinen die Aktivierung der PLC β an. Diese spaltet PIP<sub>2</sub> in die *second messenger* IP<sub>3</sub> und DAG. Das lipophile DAG aktiviert die PKC. IP<sub>3</sub> setzt aus den intrazellulären Speichern (bes. endoplasmatisches Retikulum, ER) Ca<sup>2+</sup> frei. (C) Dendrogramm und pharmakologische Klassifikation der mGluR-Subtypen (modifiziert nach Pin & Duvoisin, 1994). Auf der Grundlage ihrer Aminosäuresequenz können die mGluR1-8 in drei Gruppen unterteilt werden. mGluR derselben Gruppe weisen eine Sequenzidentität der Aminosäurefolge von ca. 70 % auf. Diese fällt auf ca. 45 % zwischen den verschiedenen Gruppen.

Die Familie der mGluR stellt eine eigene Subpopulation innerhalb der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren dar, die wiederum aus acht Rezeptorsubtypen besteht (Abb. 2). Ihre Unterteilung in drei Hauptgruppen geschieht auf der Grundlage von Aminosäuresequenz-homologien, Ähnlichkeiten ihrer pharmakologischen Eigenschaften und Spezifitäten im G-Protein-Bindungsverhalten (Pin & Duvoisin, 1994). Die Aktivierung von mGluR der Gruppe I (mGluR1, mGluR5, und deren *Splice*-Varianten) bedingt durch die Stimulation der Phospholipase C  $\beta$  (PLC  $\beta$ ) eine Hydrolyse des zellmembrangebundenen Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphates (PIP<sub>2</sub>) (Dale et al., 2000). PIP<sub>2</sub> wird somit in Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und 1,2-Diazylglyzerol (DAG) gespalten, was zu einer Zunahme der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>- und Proteinkinase C- (PKC) Konzentrationen führt (Nakanishi et al., 1994; Pin & Duvoisin, 1994; Spooren et al., 2003).

Gruppe II (mGluR2 und mGluR3) und Gruppe III mGluR (mGluR4, mGluR6, mGluR7 und mGluR8) sind über inhibitorische G<sub>i</sub>-Proteine negativ an die intrazelluläre Adenylatzyklase (AC) gebunden (Pin & Duvoisin, 1994), was bei Aktivierung der Rezeptoren zu einer Abnahme der Konzentrationen von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) führt.

Im Gegensatz zu anderen Vertretern der mGluR-Subklassen, werden insbesondere die Gruppe I mGluR im Zusammenhang mit glutamatvermittelter Exzitotoxizität zitiert (Calabresi et al., 1999a; Bruno et al., 2000). Spezifische Gruppe I mGluR-Antagonisten sind in der Lage, die verheerenden Folgen exzitotoxischer Insulte, in Form akuter Hirnischämie oder Neurotraumata, zu minimieren und somit einen effektiven Schutz vor neuronalem Zelltod zu bieten (Bordi & Ugolini, 1999; Bruno et al., 2001a; Bruno et al., 2001b; Pellegrini-Giampietro, 2003). Darüber hinaus spielen Gruppe I mGluR eine wesentliche Rolle in der Hirnentwicklung (Hannan et al., 2001; Jokel et al., 2001; Meier et al., 2002), in der synaptischen Plastizität (Anwyl R., 1999) und bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. M. Huntington, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), M. Alzheimer (Nicoletti et al., 1996; Bordi & Ugolini, 1999) und M. Parkinson (Aguirre et al., 2001; Breyse et al., 2002).

## 1.4 Modulation der GABAergen Transmission durch metabotrope Glutamat-rezeptoren der Gruppe I

Eine wiederholt diskutierte Idee ist, dass der antiexzitotoxische Effekt der Gruppe I mGluR-Antagonisten teilweise mit der Eigenschaft assoziiert ist, die GABAerge Inhibition zu modulieren (Battaglia et al., 2001; Cozzi et al., 2002). Neue elektronenmikroskopische Untersuchungen haben zeigen können, dass Gruppe I mGluR tatsächlich an symmetrischen, also GABAergen, Terminalien nachweisbar sind (Marino et al., 2001). Die vorherrschende Lokalisation der mGluR1/5-Immunreaktivität (IR) zeigt sich jedoch an der somato-dendritischen Plasmamembran (Defagot et al., 2002). Sobald die Neurone ausgereift sind, wird eine perisynaptische Verteilung der Gruppe I mGluR in Form von *clustern* in der Nähe von asymmetrischen, vermutlich glutamatergen, Synapsen erkennbar (Baude et al., 1993, Ottersen & Landsend, 1997; Shigemoto et al., 1997). Darüber hinaus sind Gruppe I mGluR in der Lage, in den Hauptbereich symmetrischer GABAerger Synapsen einzudringen (Hanson & Smith, 1999; Hubert et al., 2001). Diese Erkenntnisse legen die Annahme nahe, dass Gruppe I mGluR einen ausgeprägten Effekt auf die Aktivität postsynaptischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (GABA<sub>A</sub>R) haben können.

Elektrophysiologische Studien haben gezeigt, dass mGluR die GABA-Freisetzung durch Interneurone beispielsweise im Hippokampus oder Thalamus regulieren. Der nichtselektive mGluR-Agonist 1S,3R-ACPD führte zu einer Reduktion der Amplitude GABA-vermittelter inhibitorischer postsynaptischer Ströme in der CA1-Region des Hippokampus (Jouveneau et al., 1995). Diese Erkenntnis konnte durch den selektiveren Gruppe I mGluR-Agonisten DHPG spezifiziert werden. Auch hier wurde eine Reduktion der inhibitorischen synaptischen Transmission in der CA1-Region beobachtet (Gereau & Conn, 1995). Es bleibt die Frage nach den Mechanismen, die die Anzahl und die Aktivität postsynaptischer GABA<sub>A</sub>R an inhibitorischen Synapsen regulieren.

Eine entscheidende Rolle bei der Inkorporation und Stabilisierung der GABA<sub>A</sub>R in die Zellmembran kommt hierbei den rezeptorassoziierten Proteinen zu. Es besteht Konsens darüber, dass der synaptische Einbau von GABA<sub>A</sub>R abhängig ist von der GABA<sub>A</sub>R  $\gamma_2$ -Untereinheit und dem multifunktionalen Protein Gephyrin. Eine genetische Deletion dieser Untereinheit führt zu einer 70 %igen Abnahme in der Anzahl von GABA<sub>A</sub>R an inhibitorischen Synapsen (Essrich et



al., 1998, Kittler & Moss, 2003). Die chronische Blockade von mGluR der Gruppe I bewirkte in diesem Zusammenhang in Zellkulturen eine veränderte Akkumulation von ebenfalls Gephyrin-stabilisierten Glyzinrezeptoren an inhibitorischen Synapsen (Meier et al., 2002).

Neben der Anzahl der GABA<sub>A</sub>R unterliegt jedoch auch deren Aktivierungsgrad einer ständigen Modulation. Dies geschieht vornehmlich durch direkte Phosphorylierung, sowohl durch Proteinkinase A (PKA) (McDonald et al., 1998) als auch PKC. Insbesondere die  $\beta$ -Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>R sind Ziel der PKC-vermittelten Phosphorylierung an gemeinsamen Aminosäuren (Ser409 in  $\beta$ 1 und  $\beta$ 3 bzw. Ser410 in  $\beta$ 2) (Brandon et al., 2002). Unlängst konnte gezeigt werden, dass die GABA<sub>A</sub>R-Funktion direkt durch eine BDNF (*brain derived neurotrophic factor*)-vermittelte TrkB-Rezeptoraktivierung moduliert wird (Henneberger et al., 2002). Die in hippokampalen Zellkulturen unter dem Einfluss von BDNF beobachtete Reduktion in der Amplitude der GABAergen Mini-IPSCs wurde auf eine PKC-induzierte GABA<sub>A</sub>R-Phosphorylierung zurückgeführt (Jovanovic et al., 2004). Da die intrazellulären Signalkaskaden nach Aktivierung postsynaptischer mGluR der Gruppe I ebenfalls eine Zunahme der PKC-Aktivität bedingen, bleibt es eine spannende Frage, inwieweit eine glutamaterge Beeinflussung der GABAergen synaptischen Transmission zu beobachten ist.

Neben den vielfältigen postsynaptischen Modulationsmechanismen durch Gruppe I mGluR müssen aber auch präsynaptische Effekte in Betracht gezogen werden. So konnte eine Zunahme der GABA-Freisetzung nach Aktivierung von mGluR der Gruppe I durch 1S,3R-ACPD gezeigt werden (Wang & Johnson, 1995). Die Zunahme der depolarisationsinduzierten GABA-Freisetzung wurde mit einer durch mGluR1/5 vermittelten Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration erklärt. Dieselben Autoren konnten nachweisen, dass der selektive Gruppe I mGluR-Agonist Quisqualat eine Zunahme der präsynaptischen GABA-Freisetzung bedingt (Wang et al., 1996). Vergleichbare Ergebnisse wurden bei Experimenten an Hirnschnitten des Frontalkortex der Ratte erzielt. Hier führte die selektive Aktivierung der Gruppe I mGluR zu einer signifikanten Zunahme der Frequenz spontaner IPSCs (sIPSCs), vornehmlich über präsynaptische Regulationsmechanismen (Chu & Hablitz, 1998). Elektronenmikroskopische Untersuchungen der *Substantia nigra pars reticulata* lieferten einen weiteren Beweis für eine, wenn auch quantitativ geringere, präsynaptische Lokalisation metabotroper GluR1/5 (Marino et al., 2001). Dieselbe Studie kam zu dem interessanten Ergebnis, dass die Aktivierung der präsynaptischen mGluR1/5 eine Verringerung der inhibitorischen Transmission in der SNr zur

Folge hatte. Die Abnahme der evozierten IPSCs (eIPSCs) wurde durch die selektiven Antagonisten CPCCOEt (mGluR1) und MPEP (mGluR5) aufgehoben (Marino et al., 2001).

Der Einflussnahme metabotroper Glutamatrezeptoren auf die GABAerge synaptische Transmission werden zunehmend auch neuroprotektive Effekte zugeschrieben. Die selektive Applikation der mGluR1-Antagonisten LY367385 und CPCCOEt verstärkte die GABA-Freisetzung im *Corpus striatum* sich frei bewegender *Sprague-Dawley* Ratten (Battaglia et al., 2001). Wurde der mGluR5-Antagonist MPEP in den *Nucleus caudatus* infundiert, so ergab sich zwar keine Veränderung der GABA-Freisetzung, jedoch konnte auch hier die NMDA-induzierte Exzitotoxizität verringert werden. Untermuert wurden diese Ergebnisse durch elektrophysiologische Studien an *cortico-striatalen* Hirnschnitten. DHPG, ein Gruppe I mGluR-Agonist, führte zu einer reversiblen Inhibition der GABA-vermittelten IPSCs (Battaglia et al., 2001). Ein postischämischer Zellschaden bzw. Zelltod konnte auch in organotypischen hippocampalen Hirnschnitten der Ratte durch die Applikation des mGluR1-Antagonisten AIDA und die durch ihn bewirkte Verstärkung der GABAergen Inhibition verringert werden (Cozzi et al., 2002). Zusammenfassend zeigt die chronisch selektive Gruppe I mGluR-Blockade durch eine Verstärkung der GABAergen Transmission in verschiedenen Hirnregionen einen neuroprotektiven Effekt.

## 1.5 Perakute Synaptogenese in Hirnschnittpräparaten

Die Bildung und Reorganisation synaptischer Verbindungen im unreifen Gehirn wird aktivitätsabhängig reguliert. Dies bedingt in den meisten Fällen die Freisetzung eines depolarisierenden Neurotransmitters. Für den Hippokampus konnte gezeigt werden, dass depolarisierende GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren an der Generierung spontaner intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen beteiligt sind, die ihrerseits die Bildung glutamaterger Synapsen fördern (Übersichtsarbeiten, siehe Davies et al., 1998; Ben-Ari et al., 1997). Zu einem frühen Zeitpunkt in der Entwicklung, zu dem auch exzitatorische Synapsen noch nicht ihre volle Funktionalität erlangt haben, kann GABA nicht nur von den axonalen Wachstumskegeln (*growth cones*) (Gao & van den Pol, 2000), sondern auch von synaptischen Strukturen freigesetzt werden (Durand et al., 1996). Trotz alledem ist bislang nicht geklärt, welche Signale besonders in frühen

Entwicklungsstufen die Bildung GABAerger Synapsen induzieren. Für die Glutamatdecarboxylase ergab sich, dass ihr zytochemischer Nachweis in Synaptophysin-positiven Terminalien in enger Korrelation mit dem erstmaligen Auftreten GABAerger synaptischer Ströme steht (Meier et al., 2002). Des weiteren wird die GABA-Freisetzung aus axonalen Wachstumskegeln durch die Aktivierung der Proteinkinase C verstärkt (Gao & van den Pol, 2000). Doch auch schon unreife synaptische Terminalien weisen Phosphoproteine auf, die in der Lage sind, die Vesikelfreisetzung zu beeinflussen (Jovanovic et al., 2001; Pieribone et al., 2002; Feng et al., 2002; Mozhayeva et al., 2002).

Zum heutigen Zeitpunkt geht man davon aus, dass ein Neuron durch die Transmitterfreisetzung auf eine potentielle Kontaktstelle einwirkt, was zur Akkumulation der korrespondierenden Rezeptoren an der postsynaptischen Membran führt (Craig & Boudin, 2001; Sanes & Lichtman, 2001). Für diesen Vorgang sind sog. Ankerproteine von entscheidender Bedeutung. So bewirkt an inhibitorischen Synapsen das Ankerprotein Gephyrin die postsynaptische Akkumulation (*clustering*) von Glyzin- und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Brunig et al., 2002; Kneussel et al., 1999; Essrich et al., 1998, Übersichtsarbeit siehe: Meier J., 2003). Es bleibt die Frage bestehen, ob die Akkumulation der postsynaptischen Rezeptoren nicht auch ihre direkte Aktivierung bedingt. Um dem nachzugehen, wurden Glyzin- und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren aber auch spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (VAAC) pharmakologisch chronisch geblockt. Diese Experimente ergaben, dass ein Anstieg des [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, bedingt durch die Aktivierung depolarisierender Rezeptoren, für die korrekte postsynaptische Rezeptorakkumulation (Kirsch & Betz, 1998) und Stabilisierung (Levi et al., 1998) notwendig ist. Neben Glyzin- und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, kann jedoch auch die Aktivierung von NMDA- und metabotropen Glutamatrezeptoren zu einer Erhöhung des [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> führen. Diese Ergebnisse rechtfertigen die Hypothese, dass die inhibitorische Synaptogenese ein aktivitätsregulierter Prozess ist.

Der Nachweis der inhibitorischen synaptischen Aktivität in Hirnschnittpräparaten embryonaler oder neonataler Mäuse darf jedoch nicht zwangsläufig als ein Beweis für die Existenz klassischer inhibitorischer Synapsen gewertet werden. Mindestens zwei alternative Erklärungsansätze sind denkbar: (i) Die Freisetzung inhibitorischer synaptischer Transmitter erfolgt von nicht synaptischen Strukturen; (ii) neue inhibitorische synaptische Kontakte werden im Hirnschnitt als Ergebnis einer pathophysiologischen Reaktion auf die Isolierung des Gewebes gebildet.

In vorangegangenen Experimenten wurde die generelle Hypothese verfolgt, dass ein Ungleichgewicht zwischen der Menge an freigesetztem Neurotransmitter und dem Grad der postsynaptischen Aktivität Signale generiert, die Auswirkungen auf die Zahl der synaptischen Kontakte und die Rezeptorverteilung in der postsynaptischen Zelle haben. Die oberflächlichen visuellen Schichten des spätembryonalen (E19) *Colliculus superior* weisen nur wenige inhibitorische Terminalien auf, von denen die meisten kaum GABA<sub>A</sub>R-Akkumulationen zeigen. Trotzdem führte die alleinige Inkubation von Hirnschnitten des sCS in künstlicher Liquorflüssigkeit (ACSF) für 2,5 h zu einer signifikanten Zunahme der Zahl der präsynaptischen Terminalien, von denen die Mehrzahl vom GABAergen Phänotyp war. Die zusätzliche Blockade von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, VACCs oder die Aktivierung der PKC unterstützte diesen Vorgang noch weiter (Meier et al., 2003).

Erstmalig wurde die reaktive Synaptogenese auch in postnatalen Hirnschnittpräparaten für die hippocampale *Spine*-Bildung nachgewiesen. Hier konnten in ACSF-inkubierten akuten Hirnschnitten junger Ratten innerhalb weniger Stunden mehr Synapsen nachgewiesen werden, als in perfusionsfixierten Hippokampuspräparaten (Kirov et al., 1999). Es wurde diskutiert, dass sich die vermehrte *Spine*-Bildung innerhalb einer einstündigen Erholungsphase als Reaktion auf den Verlust der synaptischen Aktivität vollzieht, nachdem die Hirnschnitte von restlichen Hirn abgetrennt wurden.

Da die Präparation und das Anfertigen von Hirnschnitten immer auch mit einem Zelltrauma einhergehen, das über die Freisetzung von Glutamat zur neuronalen Exzitotoxizität führen kann (Katchman & Hershkowitz, 1997; N.Schurr et al., 1995; Popoli et al., 2003, 2004), muss die Glutamatfreisetzung als wichtiges Regulativ der inhibitorischen Synaptogenese angesehen werden. Es kann angenommen werden, dass die pharmakologische Einflussnahme auf die GABAerge wie auch glutamaterge synaptische Transmission zu einer signifikanten Reorganisation des noch unreifen synaptischen Netzwerkes führen wird.

Im neonatalen Gewebe des sCS soll diesbezüglich untersucht werden, inwiefern der Exzitationsschutz via Gruppe I mGluR-Blockade sowie die PKC-vermittelten intrazellulären Signalkaskaden auf die posttraumatische Bildung GABAerger Synapsen in akuten Hirnschnittpräparationen Einfluss nehmen.

In Weiterführung der hieraus gewonnenen Erkenntnisse, könnten somit auch Ansätze für weitere Untersuchungen bzgl. humaner peri-/postnataler Hirnschädigungen abgeleitet werden.

## 1.6 Aufgabenstellung

Es sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Die visuellen Schichten des *Colliculus superior* (CS) der Maus bilden eine Hirnregion, die besonders reich an GABAergen Interneuronen ist. Schnittpräparate des CS sind deswegen besonders geeignet, die Ausbildung und Regulation von inhibitorischen synaptischen Verbindungen im Verlauf der Postnatalentwicklung zu analysieren. Zunächst musste jedoch geklärt werden, welche mGluR und welche PKC-Isoformen in Abhängigkeit vom Lebensalter der Mäuse zur Verfügung stehen. Die Frage sollte mit Hilfe von RT-PCR-Messungen beantwortet werden.
- Im weiteren sollten die akuten Effekte der Gruppe I mGluR-Aktivierung auf die GABA<sub>A</sub>R und die GABAergen synaptischen Ströme untersucht werden. Um die Angriffspunkte der glutamatergen Regulation über Gruppe I mGluR genauer zu identifizieren, sollten *patch-clamp*-Ableitungen von GABA-induzierten Strömen ( $I_{Cl(GABA)}$ ), spontanen GABAergen IPSCs (sIPSC) und Miniatur-IPSCs (mIPSCs) in Anwesenheit von Tetrodotoxin abgeleitet werden.
- Da die postsynaptischen Wirkungen der Gruppe I mGluR über G-Proteine und intrazelluläre Signalwege realisiert werden und in den Ganzzelleitungen dabei unter Umständen wichtige Signalmoleküle ausgewaschen werden, sollten die Messungen auch in der *perforated-patch*-Konfiguration durchgeführt werden.
- Frühere Arbeiten aus dem Labor hatten gezeigt, dass sich im akuten embryonalen Hirnschnitt nach kurzer Inkubation in ACSF neue inhibitorische Synapsen bilden. Nun sollte die Altersabhängigkeit dieses Phänomens in postnatalen Präparaten des sCS untersucht werden.

- Unter der Annahme, dass die *in situ* Synaptogenese im sCS auch postnatal möglich ist, sollte im weiteren die Rolle der Gruppe I mGluR und der PKC-Aktivität geklärt werden. Da eine erhöhte PKC-Aktivität die Synaptogenese stimuliert, wäre es interessant zu wissen, ob die chronische Aktivierung bzw. Blockade von mGluR1/5 die Synapsenbildung verändert. Welche Mechanismen sind daran beteiligt? Ist auch im postnatalen Gewebe die Zunahme der Zahl der inhibitorischen synaptischen Terminalien mit einer verstärkten inhibitorischen synaptischen Aktivität assoziiert?