

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe I im *Colliculus superior* der Maus

Es gibt bereits neuroanatomische Evidenzen für die Existenz von metabotropen Glutamatrezeptoren, einschließlich der Gruppe I mGluR, in den oberflächlichen Schichten des CS (Martin et al. 1992; Shigemoto et al. 1992, Shigemoto et al. 1993; Shigemoto et al. 1997; Romano et al. 1995; Cirone et al. 2002b). Da die Proteinkinase C eines der wichtigsten intrazellulären Effektormoleküle der Gruppe I mGluR darstellt (Pin et Duvoisin, 1994; Huang et al., 1999; Poisik et al., 2003), war es wichtig auch die altersabhängige Verteilung der verschiedenen PKC-Isoformen im sCS zu untersuchen.

#### 3.1.1 Änderung der entwicklungsabhängigen Verteilung der mGluR1- und mGluR5-mRNA-Expression sowie der Expression der PKC-Isoformen im *Colliculus superior*

Durch semiquantitative reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) von sCS-Schnitten wurde die entwicklungsabhängige Verteilung der mGluR1- und mGluR5-mRNA-Expression untersucht. Wie in Abbildung 5.A,B dargestellt, kam es zwischen dem 18. Embryonaltag (E18) und dem 10. postnatalen Tag (P10) zu einer stetigen, annähernd linearen Zunahme der relativen Intensitäten sowohl der mGluR1-mRNA (E18:  $0,052 \pm 0,006$ ; P10:  $0,270 \pm 0,041$ ; [n=3]) als auch der mGluR5-mRNA (E18:  $0,164 \pm 0,007$ ; P10:  $0,478 \pm 0,021$ ; [n=3]). Das Verteilungsverhältnis der mRNA-Expression mGluR5 / mGluR1 fiel von 3,16 im Alter E18 auf 1,77 im Alter P10. Jedoch war die mGluR5-mRNA-Expression auch in den Alterstufen P0 und P5 um den Faktor 2,35 bzw. 2,55 größer als die mGluR1-mRNA-Expression.

Die altersabhängige PKC-mRNA-Expression in den visuellen Schichten des *Colliculus superior* ist in Abbildung 5.C,D zu sehen. Es lässt sich eine Dreiteilung im Zeitprofil der wichtigsten PKC-Isoformen erkennen. Die PKC  $\alpha$ -,  $\eta$ - und  $\theta$ -mRNA wird in den Alterstufen E18, P0, P5 und P10 konstant auf niedrigem Niveau exprimiert (E18: PKC  $\alpha$   $0,162 \pm 0,002$ , PKC  $\eta$   $0,103 \pm 0,051$ , PKC  $\theta$   $0,018 \pm 0,013$ ; P10: PKC  $\alpha$   $0,106 \pm 0,011$ , PKC  $\eta$   $0,153 \pm 0,008$ ,

PKC  $\theta$   $0,030 \pm 0,018$ ; [n=3]) und die PKC  $\beta$ - und  $\varepsilon$ -Isoformen weisen eine stabile, verhältnismäßig hohe mRNA-Expressionsrate auf (E18: PKC  $\beta$   $0,867 \pm 0,018$ , PKC  $\varepsilon$   $1,014 \pm 0,146$ ; P10: PKC  $\beta$   $1,123 \pm 0,006$ , PKC  $\varepsilon$   $1,040 \pm 0,005$ ; [n=3]). Von den untersuchten PKC-Isoformen konnte lediglich für die PKC  $\gamma$ -mRNA eine altersabhängige Zunahme der Expression zwischen E18 und P10 nachgewiesen werden (E18: PKC  $\gamma$   $0,096 \pm 0,016$ ; P10: PKC  $\gamma$   $0,827 \pm 0,036$ ; [n=3]).

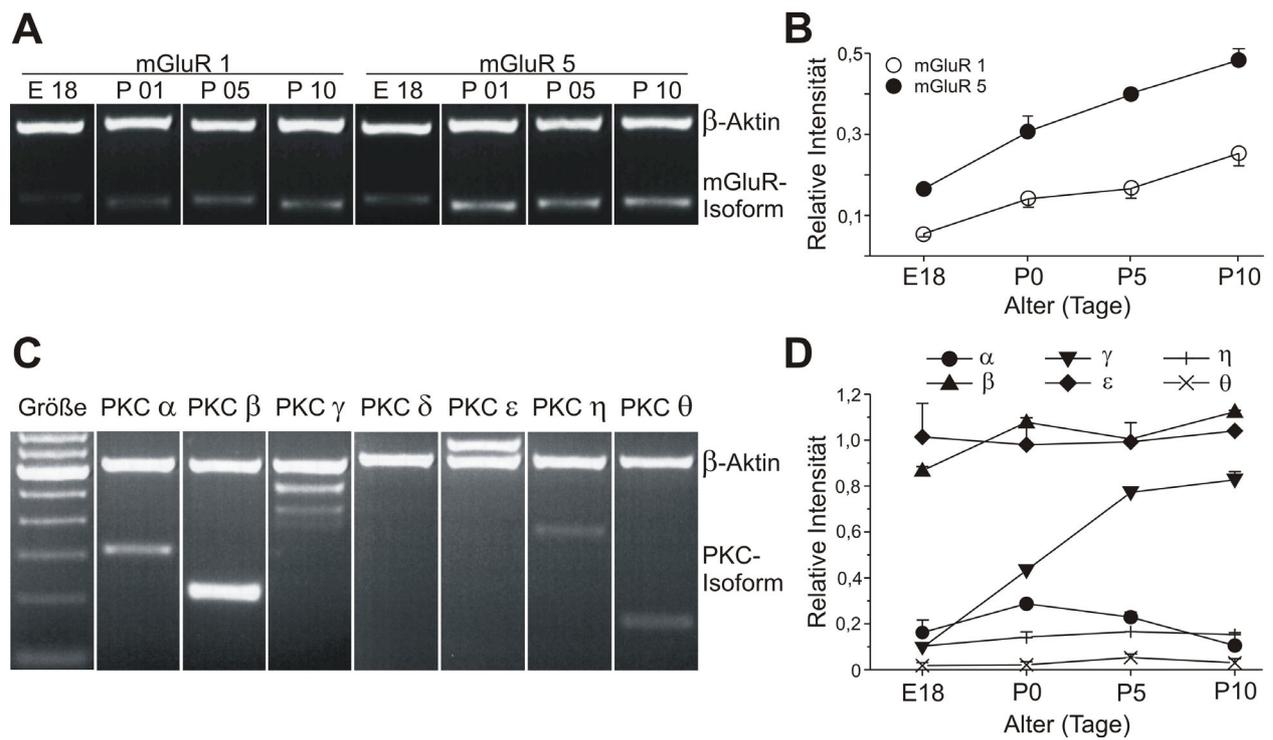


Abbildung 5: Durch semiquantitative RT-PCR bestimmte altersabhängige Expression von mGluR1-, mGluR5-, PKC  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\varepsilon$ -,  $\eta$ - und PKC  $\theta$ -mRNA in den oberflächlichen Schichten des *Colliculus superior* der Maus. Der interne RT-PCR Standard  $\beta$ -Aktin wurde mit den mGluR- bzw. PKC-Isoformen in demselben PCR-Reaktionsgefäß amplifiziert. (A) Beispiel einer semiquantitativen RT-PCR von mGluR1 und mGluR5 in den Alterstufen E18, P0, P5 und P10. (B) Altersabhängige Entwicklung der relativen Intensitäten der mGluR1- und mGluR5-Expression im sCS. (C) Beispiel einer semiquantitativen RT-PCR von PKC  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\varepsilon$ -,  $\eta$ - und PKC  $\theta$  in den Alterstufen E18, P0, P5 und P10. (D) Die relativen Intensitäten der PKC  $\alpha$ -,  $\eta$ - und  $\theta$ -mRNA-Expressionen zeigen in den Altersstufen E18 bis P10 konstante Expressionsmuster auf niedrigem Niveau, die der PKC  $\beta$ - und  $\varepsilon$ -Isoformen auf hohem Niveau und für die PKC  $\gamma$ -Isoform ergibt sich eine stetige Zunahme der mRNA-Expression im sCS von E18 bis P10.

### 3.2 Die Effekte einer akuten transienten Gruppe I mGluR-Aktivierung auf die GABAerge synaptische Transmission in Schnitten des *Colliculus superior*

Metabotrope Glutamaterezeptoren, unter ihnen die der Gruppe I (mGluR1/5), sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, deren Stimulation intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert und eine Vielzahl an Effektorantworten bewirkt. Die divergenten neurophysiologischen Effekte nach mGluR-Aktivierung zeigen sich u.a. in einer Potenzierung spannungsabhängiger L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (mGluR I: Rothe et al., 1994; Chavis et al., 1995) sowie in einer Suppression von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen des N-Typs (mGluR I, II, III: Rothe et al., 1994; Choi et al., 1996)). Ähnlich gegensätzliche Ergebnisse wurden für  $\text{K}^{+}$ -Kanal-vermittelte Ströme nach mGluR-Aktivierung beschrieben (Inhibition: Gereau & Conn, 1995; Potenzierung: Holmes et al., 1996).

Hier sollten die akuten Effekte nach Aktivierung von metabotropen Glutamaterezeptoren der Gruppe I in den oberflächlichen Schichten des *Colliculus superior* getestet werden. In einem ersten Schritt war zu untersuchen, inwieweit GABAerge inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSCs) durch die Aktivierung von mGluR1/5 beeinflusst werden. Die Blockade ionotroper glutamaterger NMDA-Rezeptoren durch DL-APV (50  $\mu\text{M}$ ), AMPA-Rezeptoren durch DNQX (50  $\mu\text{M}$ ), cholinerg Ströme durch d-Tubocurarin (5  $\mu\text{M}$ ) und glyzinerger Ströme durch Strychnin (0,5  $\mu\text{M}$ ) ermöglichte es, die durch GABA vermittelten postsynaptischen Ströme zu isolieren.

#### 3.2.1 Die Aktivierung von Gruppe I mGluR führt zu einer signifikanten Zunahme in der Ereignisfrequenz spontaner IPSCs

In Gegenwart von AMPA-Rezeptorblockern ist Quisqualat (QA) ein sehr potenter und spezifischer Gruppe I mGluR-Agonist (Mannaioni et al., 1996; Zhuo & Hablitz, 1997; Netzeband et al., 1997). Die Modulation der sIPSC-Frequenz durch QA wurde experimentell folgendermaßen demonstriert: Aufnahme der Kontrollwerte über 5 Minuten, Badapplikation von QA (5  $\mu\text{M}$ ) über 1 Minute und Registrierung der sIPSCs während der gesamten Zeit, Auswaschen von QA für weitere 7 Minuten und Aufnahme der weiteren Kontrollwerte in den letzten 5 Minuten. So konnte eine ausreichende Rezeptorerholung sichergestellt werden.

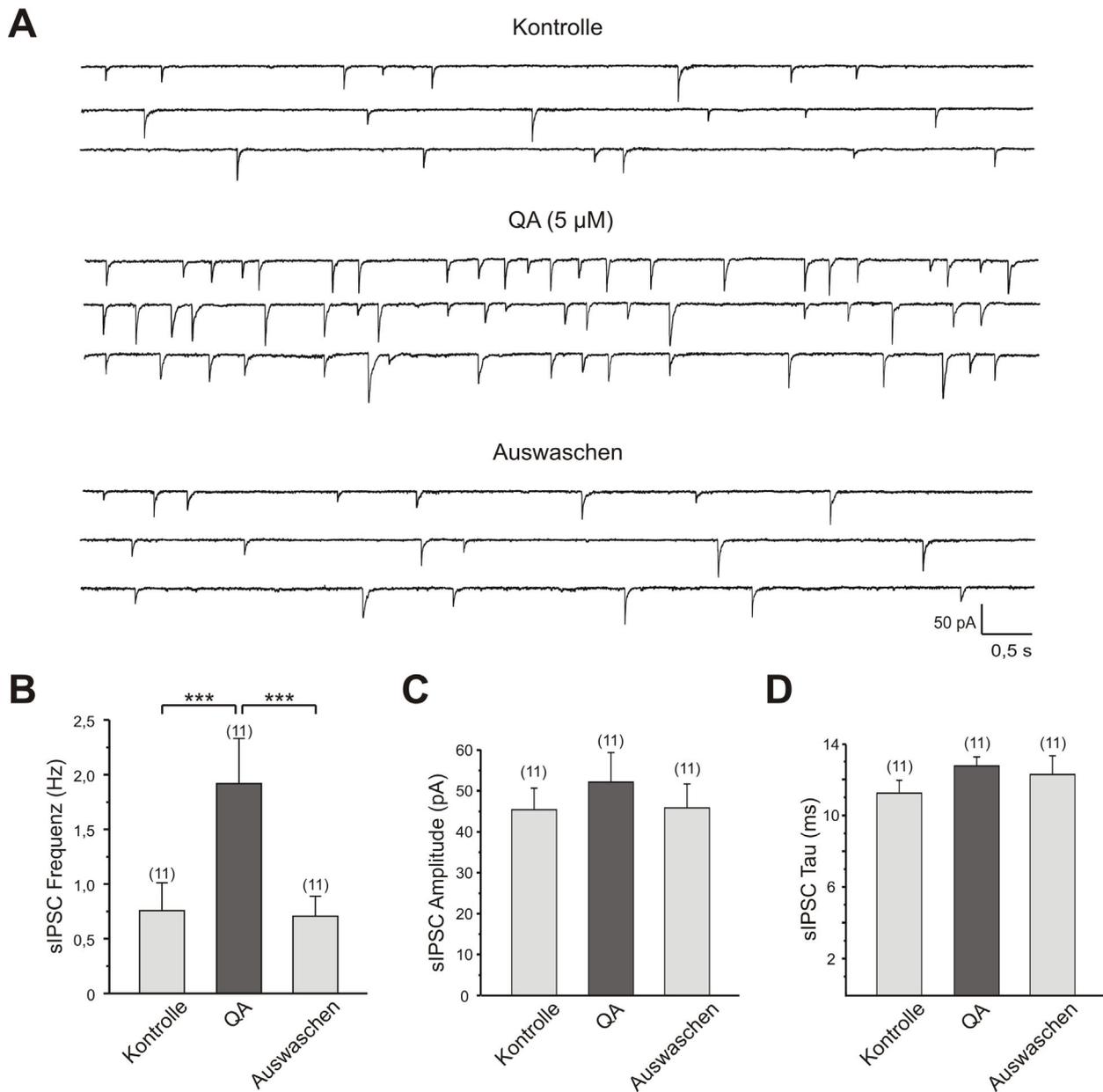


Abbildung 6: Akute Effekte der Gruppe I mGluR-Aktivierung auf spontane inhibitorische postsynaptische Ströme (sIPSCs) gemessen in der Ganzzellableitung. (A) Beispielaufzeichnungen abgeleiteter sIPSCs entsprechend des Applikationsprotokolls: Kontrolle 5 min, Quisqualat-Applikation (QA) 1 min, Auswaschen 7 min. Für die statistische Auswertung wurden alle sIPSCs während der gesamten Kontroll- und QA-Messung berücksichtigt, während der Auswaschperiode jedoch nur die letzten 5 min, um eine Erholungszeit von 2 min nach QA-Applikation sicherzustellen. (B) Signifikanter und reversibler Anstieg in der sIPSC-Frequenz während der QA-Applikation. (C, D) Keine signifikanten Unterschiede in der sIPSC-Amplitude und der Abfallskinetik während und nach Aktivierung von mGluR1/5.

Die Badapplikation von 5  $\mu\text{M}$  Quisqualat führte zu einem signifikanten Anstieg in der Frequenz der sIPSCs von  $0,76 \text{ s}^{-1} \pm 0,25 \text{ s}^{-1}$  [n=11] auf  $1,92 \text{ s}^{-1} \pm 0,41 \text{ s}^{-1}$  [n=11];  $p < 0,001$  (Abb. 6.A,B). Dieser Effekt war nach dem Auswaschen von QA vollständig reversibel ( $f = 0,71 \text{ s}^{-1} \pm 0,18 \text{ s}^{-1}$  [n=11]). QA führte weder zu einer signifikanten Änderung der durchschnittlichen sIPSC-Amplitude (Kontrolle:  $45,43 \pm 5,14 \text{ pA}$  [n=11]; QA:  $52,15 \pm 7,11 \text{ pA}$  [n=11]; Auswaschen:  $45,84 \pm 5,79 \text{ pA}$  [n=11]) noch der sIPSC-Abfallskinetiken (Kontrolle:  $11,31 \pm 2,12 \text{ ms}$  [n=11]; QA:  $12,84 \pm 1,46 \text{ ms}$  [n=11]; Auswaschen:  $12,36 \pm 1,03 \text{ ms}$  [n=11]) während der QA-Applikation (Abb. 6.A,C,D). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass mGluR1/5 die GABA-Freisetzung potenzieren.

### 3.2.2 Die Frequenz der GABAergen mIPSCs wird durch Quisqualat-induzierte mGluR1/5-Aktivierung signifikant erhöht

Eine Möglichkeit der Unterscheidung von prä- und postsynaptischen Effekten der Gruppe I mGluR auf die GABAerge Inhibition im oberflächlichen CS besteht darin, Miniatur-IPSCs (mIPSCs) zu analysieren. mIPSCs werden in der Gegenwart von TTX (1  $\mu\text{M}$ ) aufgezeichnet und sind somit unabhängig von der Generierung von Aktionspotentialen (AP). Die Amplitude der mIPSCs hängt ausschließlich von der Anzahl und Aktivität der postsynaptischen Rezeptoren ab. Im Gegensatz dazu spiegelt die mIPSC-Frequenz die Häufigkeit der präsynaptischen Vesikelfreisetzung wider.

Die Ergebnisse zeigen, dass während der Quisqualat-Applikation (5  $\mu\text{M}$ ), entsprechend des oben beschriebenen Schemas, die durchschnittliche mIPSC-Amplitude annähernd konstant blieb (Kontrolle:  $22,96 \pm 3,04 \text{ pA}$  [n=10]; QA:  $19,74 \pm 1,56 \text{ pA}$  [n=10]; Auswaschen:  $19,85 \pm 2,27 \text{ pA}$  [n=10]). Eine Aufteilung nach der Auftrittswahrscheinlichkeit einzelner *events* ergab jedoch, im Vergleich zur Kontrollmessung, eine Linksverschiebung der mIPSCs hin zu niedrigeren Amplituden während der QA-Applikation (Abb. 7.A,C). Im Gegensatz dazu kam es unter QA zu einem signifikanten Anstieg der mIPSC-Frequenz (Kontrolle:  $0,10 \text{ s}^{-1} \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$  [n=11]; QA:  $0,18 \text{ s}^{-1} \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$  [n=10]; Auswaschen:  $0,10 \text{ s}^{-1} \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$  [n=10]) (Abb. 7.A,B). Ähnlich den in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Effekten lässt die annähernde Verdopplung der mIPSC-Frequenz unter mGluR1/5-Stimulation auf eine präsynaptische Lokalisation der Gruppe I mGluR schließen. Demgegenüber legt die gestiegene Auftrittshäufigkeit niedrigerer mIPSC-Amplituden

unter QA-Applikation die Vermutung nahe, dass es darüber hinaus zu einer postsynaptischen Modulation der GABAergen Inhibition via Gruppe I mGluR gekommen ist.

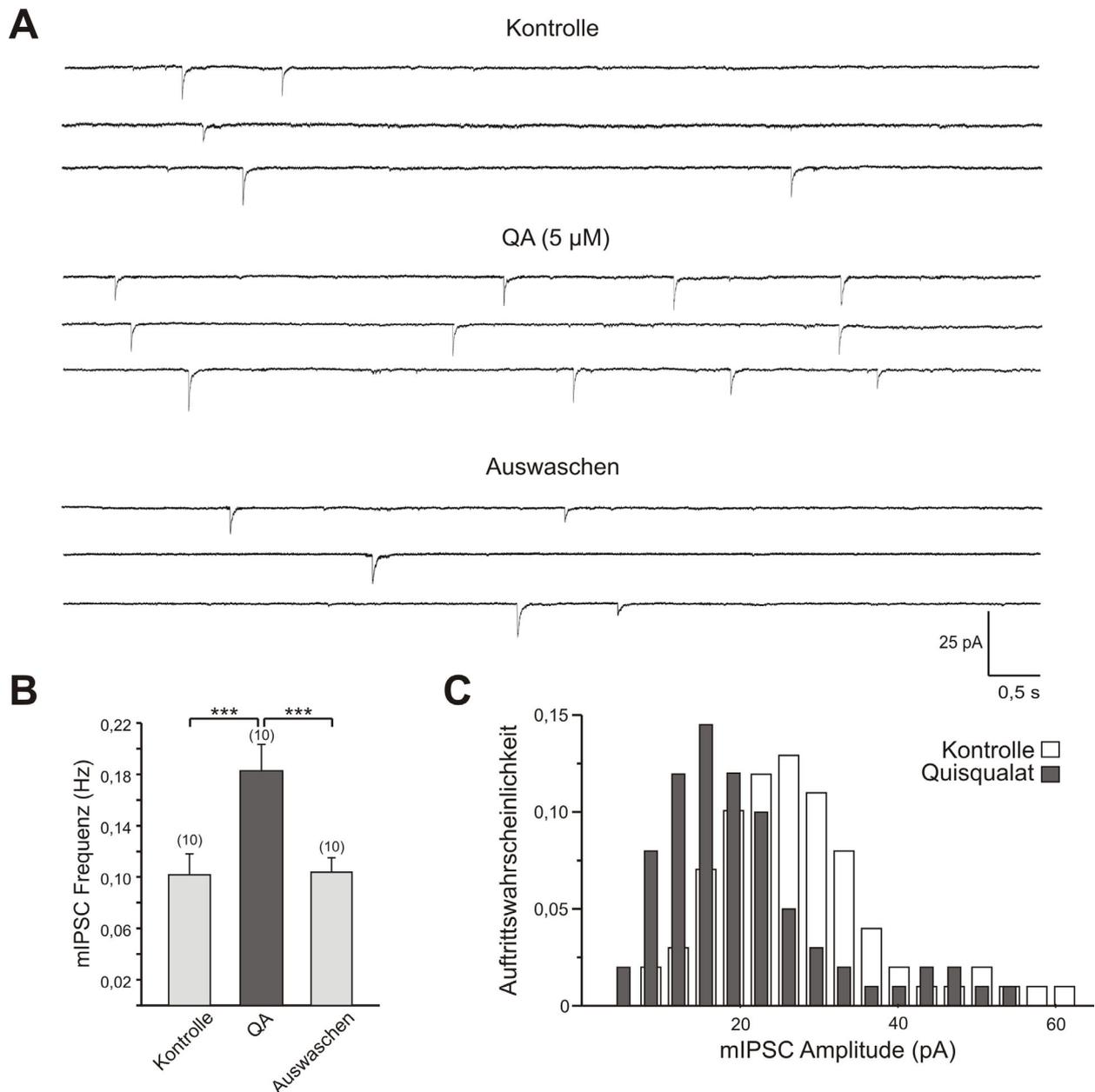


Abbildung 7: Akute Effekte der mGluR1/5-Aktivierung auf mIPSCs von P15 sCS-Neuronen gemessen in der Ganzzelleableitung. (A) mIPSC-Beispielaufzeichnungen entsprechend des Applikationsprotokolls (vgl. Abschnitt 3.2.1). (B) Signifikanter und vollständig reversibler Anstieg in der mIPSC-Frequenz um ca. 80% während der QA-Applikation. (C) Dieselbe Zelle wie in A. Trotz annähernd konstanter durchschnittlicher mIPSC-Amplitude, zeigt die Aufteilung nach der Auftretswahrscheinlichkeit eine Linksverschiebung hin zu niedrigeren Amplituden während der QA-Applikation.

Ähnliche Ergebnisse wurden schon vormals von Zheng und Johnson (2003) in ihren Experimenten an dopaminergen Neuronen des ventralen *Tegmentums* beschrieben. Die Applikation des Gruppe I und II mGluR-Agonisten ACPD führte zu einer Frequenzerhöhung der GABAergen sIPSCs, wohingegen die Amplitude der evozierten IPSCs reduziert wurde.

### **3.3 Die Modulation der postsynaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren durch Gruppe I mGluR ist PKC-abhängig**

#### **3.3.1 Quisqualat senkt die Amplitude von GABA-induzierten inhibitorischen Strömen**

Um die möglichen akuten postsynaptischen Effekte einer Gruppe I mGluR-Aktivierung in Hirnschnitten des oberflächlichen *Colliculus superior* zu präzisieren, waren weitere Untersuchungen nötig. Hierzu wurden in einem ersten Schritt unter kurzer lokaler GABA-Applikation (100  $\mu\text{M}$ ) inhibitorische Ströme ( $I_{\text{Cl(GABA)}}$ ) in der Ganzzelleableitung getestet. Es zeigte sich, dass während einer mGluR1/5-Aktivierung mittels Quisqualat (5  $\mu\text{M}$ ) die Antworten auf exogene GABA abnahmen (Walter J.). Es ist bekannt, dass eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einer Reduktion der durch GABA vermittelten inhibitorischen Ströme führen kann (Kirischuk et al., 2002). Wie im Abschnitt 1.3 bereits dargelegt, führt auch die Aktivierung von Gruppe I mGluR, bedingt durch die Stimulation der Phospholipase C  $\beta$ , unter anderem zu einer Zunahme der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - und Proteinkinase C-Konzentrationen (Nakanishi et al., 1994; Pin et Duvoisin, 1994; Spooren et al., 2003). So war der hier beschriebene Effekt auch durch PKC-Blockade mittels Badapplikation von Chelerythrin Chlorid (CC, 2  $\mu\text{M}$ ) vollständig zu verhindern.

Ein in diesem Zusammenhang relevanter Nachteil der Ganzzelleableitung ist, dass die intrazellulären Transduktionsmechanismen durch Auswaschphänomene während der Ableitung stark beeinflusst oder gar gestört werden können (Numberger et Draguhn, 1996). Um das intrazelluläre Milieu der *colliculären* Neurone so wenig wie möglich zu beeinflussen, wurden die folgenden Experimente mit Hilfe der Technik des perforierten Patches (*perforated-patch (pp)*) durchgeführt. Durch die bei dieser Ableitungskonfiguration hergestellten niederohmigen Verbindungen zum Zytoplasma können keine größeren Moleküle diffundieren (Kyrozis &

Reichling, 1995; Owens et al., 1996). Hierdurch wurde sichergestellt, dass insbesondere die *second-messenger*-Systeme der intrazellulären Signalkaskaden funktionstüchtig blieben. Da die fokale Applikation von exogener GABA eine recht künstliche Einflussnahme auf die Zelle darstellt, waren wir an den Mechanismen interessiert, welche während der synaptischen GABA-Freisetzung stattfinden und untersuchten daher mIPSCs in akuten Hirnschnitten des CS.

### 3.3.2 *Perforated-patch-clamp*-Aufzeichnungen *colliculärer* mIPSCs zeigen einen PKC-vermittelten suppressiven Effekt von Gruppe I mGluR auf synaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren

Wie bislang gezeigt, kann die pharmakologische Stimulation von Gruppe I metabotropen Glutamaterezeptoren neuronale und intradendritische Ca<sup>2+</sup>-Wellen induzieren (Kawabata et al., 1996; Flint et al., 1999). Dies führt unter anderem zu einer vermehrten GABA-Freisetzung aus präsynaptischen Vesikeln (siehe Abschnitt 3.2.1-2: Steigerung der sIPSC- und mIPSC-Frequenz, sowie Chu & Hablitz, 1998). Jedoch schlägt sich eine postsynaptische Stimulation von Gruppe I mGluR auch in einer Suppression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoraktivität nieder (siehe Abschnitt 3.3.1). Dieser Effekt kann jedoch durch EGTA in der Pipettenlösung bzw. durch Auswaschphänomene intrazellulärer Signalkaskaden ausgelöscht werden. Um diese Möglichkeit zu vermeiden, wurde für die folgenden Experimente die Methode des Gramicidin-perforierten Patches (Gramicidin 2-3 µg/ml) angewandt. Somit konnten die direkten Auswirkungen einer transienten mGluR1/5-Aktivierung auf *colliculäre* mIPSCs eingehend untersucht werden.

Unter diesen Bedingungen wurde während der QA-Applikation sowohl eine Veränderung der mIPSC-Amplitudenverteilung eines einzelnen Neurons hin zu kleineren *events* (Abb. 8.A) als auch eine signifikante Abnahme der mittleren Amplitude der mIPSCs insgesamt ermittelt (Abb. 8.C). Die Abnahme der durchschnittlichen mIPSC-Amplitude unter QA betrug ca. 30% (Kontrolle: 22,41 ± 1,91 pA [n=11]; QA: 15,82 ± 1,38 pA [n=11]). Dieser Effekt war nach dem Auswaschen des mGluR-Agonisten vollständig reversibel (Auswaschen: 21,62 ± 1,35 pA [n=11]). Da gezeigt werden konnte, dass eine Blockade der Proteinkinase C den suppressiven Effekt der Gruppe I mGluR-Aktivierung auf GABA-induzierte Ströme (I<sub>Cl(GABA)</sub>) unterbinden kann (siehe Abschnitt 3.3.1), wurde während der *perforated-patch*-Aufzeichnung von mIPSCs der membrangängige PKC-Inhibitor Chelerythrin Chlorid (CC; 2 µM) der Badlösung zugesetzt. Die pharmakologische Blockade der PKC konnte den suppressiven Effekt der Gruppe I mGluR

auf die mittlere mIPSC-Amplitude verhindern (Abb. 8.B,C; Kontrolle:  $25,38 \pm 1,09$  pA [n=5]; QA:  $24,90 \pm 1,43$  pA [n=5]; Kontrolle:  $25,14 \pm 1,18$  pA [n=5]). Ferner war zu erkennen, dass die mittleren mIPSC-Amplituden in Gegenwart von CC, im Vergleich zu Messungen ohne PKC-Blockade, insgesamt signifikant größer waren. Dies legt die Vermutung nahe, dass selbst in maximal erhaltenen CS-Schnitten (2,5-3,5 h nach Gewebeisolation) die GABA<sub>A</sub>R-Aktivität durch eine ständige Hintergrundaktivität der PKC vermindert ist.

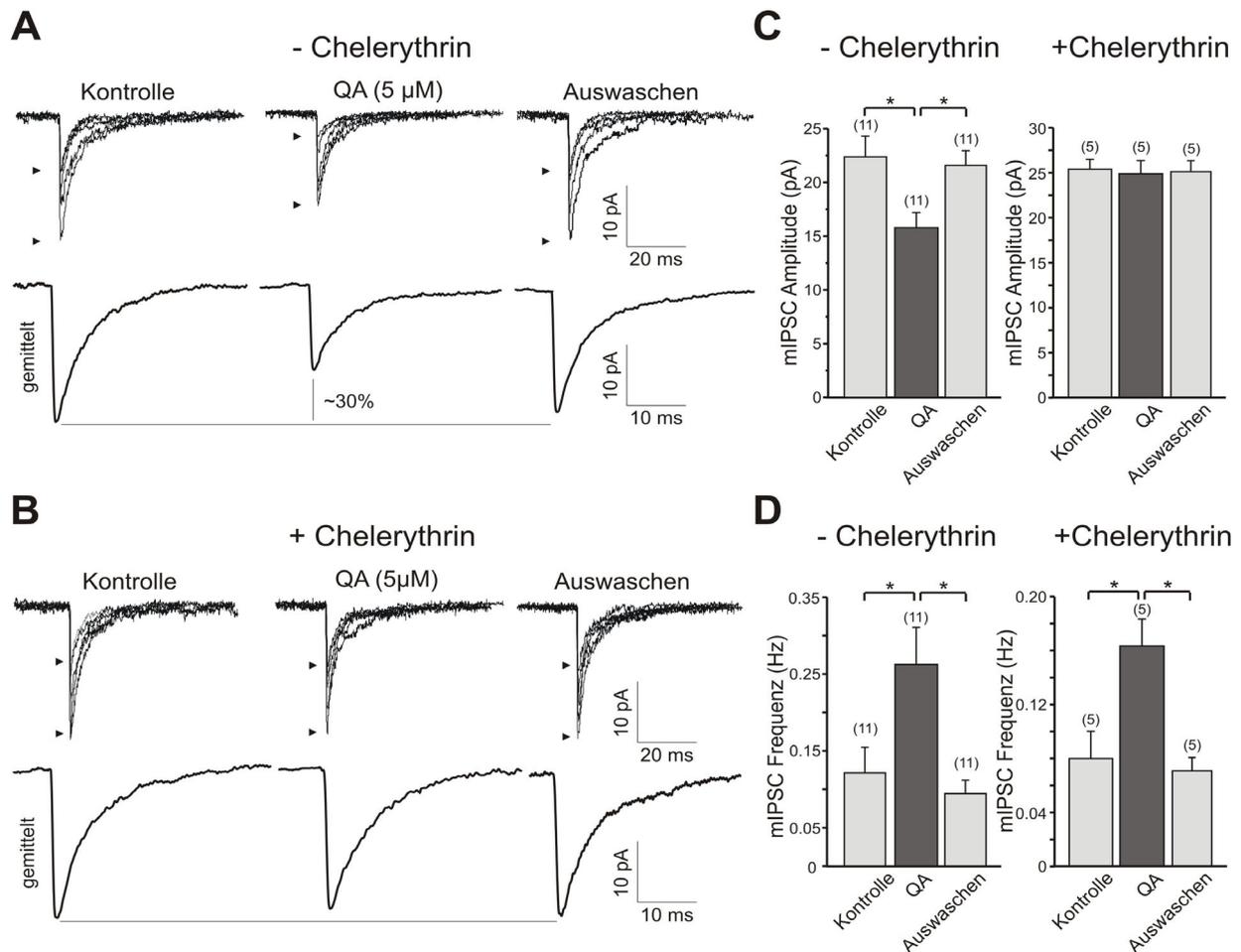


Abbildung 8: Akute postsynaptische Suppression der mIPSC-Aktivität nach mGluR1/5-Aktivierung. (A, B) Gramicidin-*perforated-patch*-Aufzeichnung von mIPSCs vor, während und nach Quisqualat (QA, 5  $\mu$ M)-Applikation. Das Applikationsprotokoll war wie folgend: Kontrollmessung 5 min., QA 1 min., Auswaschen 7 min mit Aufzeichnung in den letzten 5 min. Dargestellt sind übereinandergelegte und gemittelte Beispiel-mIPSCs derselben Zelle während der Kontrollmessung, QA-Applikation und des Auswaschens ohne (A) bzw. in Gegenwart (B) des membrangängigen PKC-Inhibitors Chelerythrin Chlorid (2  $\mu$ M). (C, D) Die statistische Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass CC den QA-induzierten Abfall der mIPSC-Amplitude verhindert (C), jedoch nicht den Anstieg in der mIPSC-Frequenz (D).

Wie erwartet, konnte darüber hinaus ein signifikanter Anstieg der mIPSC-Frequenz unter mGluR-Stimulation (QA, 5  $\mu\text{M}$ ) beobachtet werden (Kontrolle:  $0,12 \text{ s}^{-1} \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$  [n=11]; QA:  $0,26 \text{ s}^{-1} \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$  [n=10]; Auswaschen:  $0,10 \text{ s}^{-1} \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$  [n=10]) (Abb. 8.D). Interessanterweise konnte diese Zunahme der mIPSC-Auftrittshäufigkeit nicht durch eine PKC-Blockade mit CC (2  $\mu\text{M}$ ) unterbunden werden (Kontrolle:  $0,08 \text{ s}^{-1} \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$  [n=5]; QA:  $0,16 \text{ s}^{-1} \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$  [n=5]; Auswaschen:  $0,06 \text{ s}^{-1} \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$  [n=5]) (Abb. 8.D). Es bleibt zu beachten, dass die mittlere mIPSC-Frequenz während der CC-Applikation bei allen Bedingungen insgesamt niedriger war.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die funktionelle Modulation der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoraktivität mit der PKC-Aktivierung via Gruppe I mGluR-Stimulation korreliert.

### **3.4 Zunahme der Anzahl inhibitorischer synaptischer Terminalien in akuten Hirnschnitten des *Colliculus superior* postnataler Mäuse**

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass das Schneiden des embryonalen Hirngewebes und die anschließende Erholungsphase *in vitro* die Neubildung inhibitorischer und exzitatorischer Synapsen befördert (Meier et al. 2003; Kirov et al. 1999). In den oberflächlichen Schichten des embryonalen *Colliculus superior* sind in unmittelbar fixierten Hirnschnitten hauptsächlich GABAerge Synapsen nachweisbar (Okada, 1992; Meier et al. 2003; Grantyn et al., 2004). Dementsprechend war die Mehrzahl der im Rahmen der *in situ* Synaptogenese neu gebildeten synaptischen Terminalien ebenfalls inhibitorisch. Das Standardprotokoll zum Schneiden und *in vitro* Aufbewahren des Hirngewebes für 2,5 Stunden in oxygenierter ACSF wurde nun auch für postnatale Mäuse angewandt.

Vom *Colliculus superior* neugeborener Mäuse der Altersstufen P0/P1 sowie P7 wurden Hirnschnitte der ventralen Hälfte des *Stratum griseum superficiale* (SGS) angefertigt. Im embryonalen Alter, wie auch in den frühen postnatalen Tagen, vollzieht sich die Synaptogenese im sCS entsprechend eines rostro-kaudalen und eines latero-medialen Gradienten (McGraw et al., 1980). Dies in Betracht ziehend, beschränkten sich alle hier dargestellten Experimente auf das rostro-mediale Viertel des CS und die ventrale Hälfte des SGS.

### 3.4.1 Die VIAAT/Synapsin-Co-Lokalisation als Marker inhibitorischer Synapsen im *Colliculus superior*

Auf lichtmikroskopischer Ebene konnten mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie inhibitorische synaptische Terminalien durch eine Co-Lokalisation der Immunreaktivitäten (IR) für Synapsin (Syn) und den vesikulären inhibitorischen Aminosäuretransporter (VIAAT) identifiziert werden. Synapsin, ein neuronenspezifisches Phosphoprotein, das u.a. eine Rolle bei der Formierung und Stabilisierung synaptischer Kontakte spielt, wird häufig als Marker synaptischer Strukturen verwendet (Stone et al., 1994; Jovanovic et al., 1996; Lauri et al., 2003). VIAAT (Dumoulin et al., 2000) ist ein zuverlässiger Marker inhibitorischer Kontakte und eignet sich daher in Abwesenheit glyzinerger synaptischer Terminalien zur Bestimmung der Dichte GABAerger Synapsen (Meier et al., 2003).

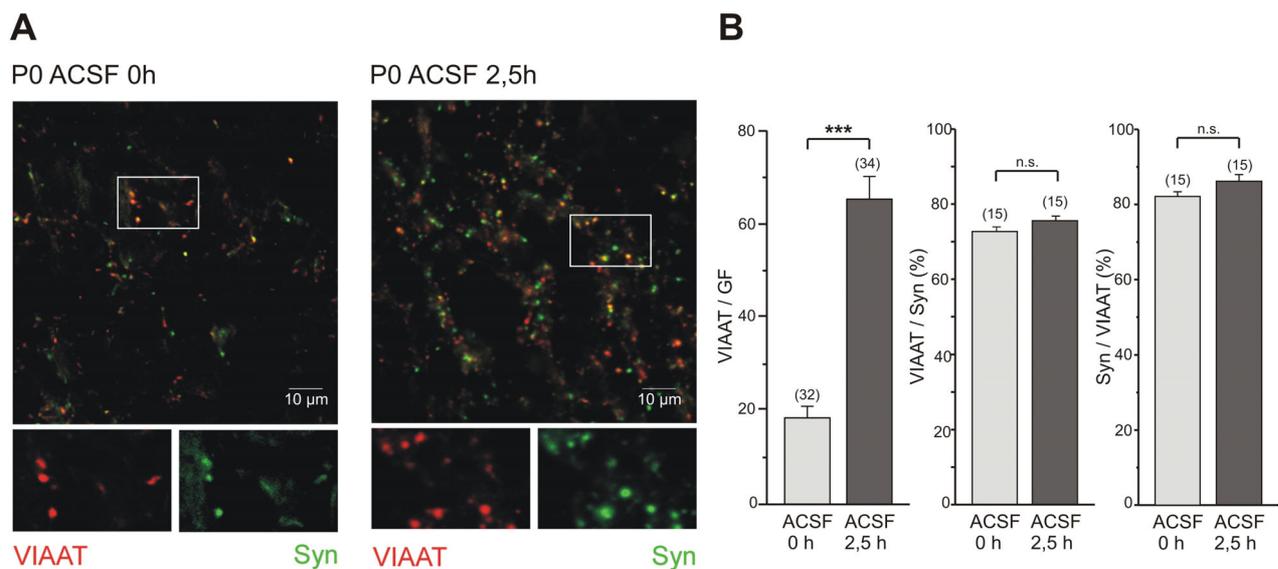


Abbildung 9: *In situ* Synaptogenese im *Colliculus superior* postnataler Mäuse. (A) Aufnahmen konfokaler Mikroskopie nach immunzytochemischer Anfärbung von Synapsin (Syn, grün) und des vesikulären inhibitorischen Aminosäuretransporters (VIAAT, rot). Die kleineren Bildausschnitte unterhalb der Abbildungen zeigen vergrößerte Darstellungen der markierten Regionen mit den korrespondierenden 1-Kanal-Immunreaktivitäten (IR). Beispielhaft dargestellt sind Gesichtsfelder (GF) von P1 sCS-Gehirnschnitten, die entweder unmittelbar nach dem Schneiden fixiert wurden (0 h) oder für 2,5 h in oxygenierter ACSF aufbewahrt wurden (2,5 h).

(B) Zusammengefasste Daten von P0 und P1 Gehirnschnitten. Zu beachten ist, dass sowohl in unmittelbar fixierten, als auch in den für 2,5 h in ACSF aufbewahrten Schnitten, mehr als 80 % aller VIAAT-IR positiven *puncta* auch Syn enthielten (Syn / VIAAT (%)) und die Mehrzahl der Syn-IR positiven *puncta* eine Co-Lokalisation mit VIAAT zeigten (VIAAT / Syn (%)). Die 2,5-stündige Inkubation in ACSF führte zu einer hoch signifikanten Zunahme der VIAAT-IR positiven *puncta* (VIAAT / GF,  $p < 0,001$ ).

Sowohl unmittelbar nach dem Schneiden des Hirngewebes (0 h), als auch nach 2,5 h Inkubation in oxygenierter künstlicher Liquorflüssigkeit, zeigten mehr als 80% der Syn-IR positiven Terminalien auch eine VIAAT-IR (Abb. 9.B). Gleichzeitig war in beiden Ansätzen bei mehr als 70 % der VIAAT-IR positiven *puncta* eine Co-Lokalisation mit Synapsin festzustellen (Abb. 9.B).

### 3.4.2 Eine 2,5-stündige Inkubation in ACSF führt zu einer Zunahme der VIAAT/Syn-positiven synaptischen Terminalien

In der Altersstufe P0/P1 lag die Anzahl der inhibitorischen synaptischen Terminalien zum Zeitpunkt 0 h nach Anfertigen der Hirnschnitte bei  $18,5 \pm 2,4$  pro Gesichtsfeld (GF,  $100 \times 100 \mu\text{m}$ ) [n=32]. Die alleinige *in vitro* Inkubation der *Colliculus*-Schnitte in oxygenierter ACSF für 2,5 h führte zu einer Zunahme der detektierten inhibitorischen Terminalien um 254 % auf  $65,4 \pm 4,8$  pro GF ( $p < 0,001$ ) [n=32] (Abb. 9.A,B). Die zur lichtmikroskopischen Darstellung des nuklearen Zellchromatins verwendete DAPI-Färbung (Hoechst©-Färbung) (Hobi et al., 1984) zeigte in Kontrolluntersuchungen, dass die absolute Anzahl an Zellen pro Gesichtsfeld während der 2,5-stündigen ACSF-Inkubation annähernd konstant blieb (nicht abgebildet). Sie betrug  $30,8 \pm 0,77$  [n=32] zum Zeitpunkt 0 h und  $29,2 \pm 0,82$  [n=34] nach 2,5 h Inkubation in ACSF. Darüber hinaus blieb der Anteil der pyknotischen Zellkerne mit ca. 6 % unverändert.

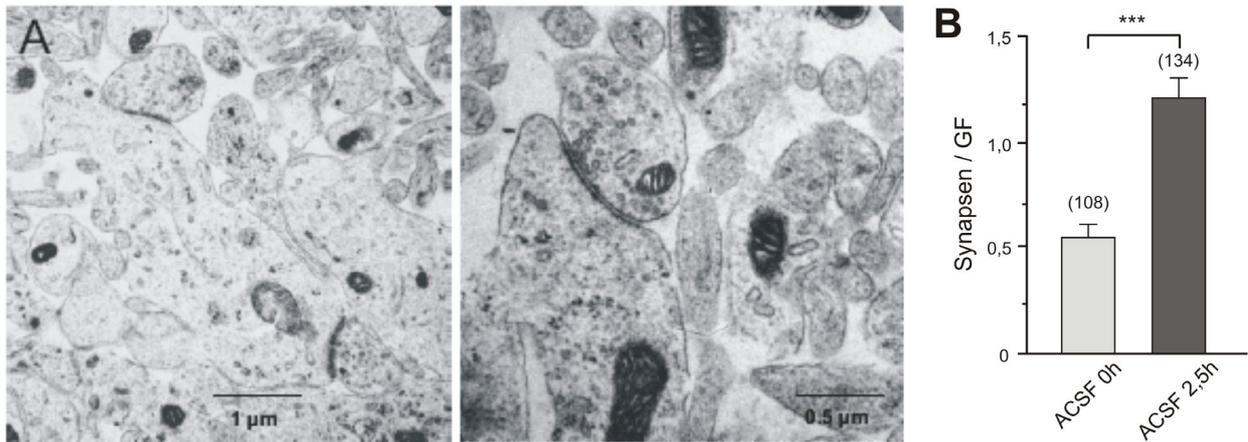


Abbildung 10: *In situ* Synaptogenese in Hirnschnitten des oberflächlichen *Colliculus superior*. (A) Beispiele von elektronenmikroskopischen Aufnahmen angefertigt von sCS-Hirnschnitten der Altersstufe P1 nach 2,5 h Inkubation in oxygenierter ACSF. Zu beachten ist der Nachweis symmetrischer Synapsenprofile. (B) Die statistische Auswertung der Anzahl der Synapsen pro Gesichtsfeld (GF, 5x5 µm), vgl. Bildausschnitt (A), zeigt eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Zunahme der Synapsen nach 2,5 h Inkubation der Hirnschnitte in ACSF im Vergleich zu unmittelbar fixierten Schnitten.

Es wurde jedoch weiterhin die Möglichkeit erwogen, dass es sich bei den VIAAT/Syn-positiven *puncta* um nicht synaptische Elemente handeln könnte. Um diesem Ansatz nachzugehen, wurden ultradünne Gehirnschnitte von unmittelbar fixierten sCS-Schnitten und von Hirnschnitten, die für 2,5 h in ACSF inkubiert wurden, für die elektronenmikroskopische Untersuchung (EM) angefertigt (Abb. 10.A). Die mit dieser Methode detektierten Synapsen gehörten in der Mehrzahl zum symmetrischen Typ und besaßen 1 bis 5 angelagerte Vesikel (*docked vesicles*). Hinzu kam eine unterschiedliche Anzahl pleomorpher Vesikel, die sich in variabler Entfernung zur aktiven Zone befanden. Die Anzahl an Synapsen war nach der 2,5-stündigen Inkubation in ACSF signifikant erhöht (Abb. 10.A,B). Daraus kann geschlossen werden, dass das Schneiden und Aufbewahren des CS-Gewebes einen Stimulus für die inhibitorische Synaptogenese darstellt.

### 3.5 Die chronische Blockade der mGluR1/5 beschleunigt die Wiederherstellung der basalen intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und beeinflusst den Aktivitätsgrad $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger PKC-Isoformen

Auch sehr vorsichtige und zurückhaltende Methoden der Gewebeisolierung können nicht davor schützen, dass die Zellhomöostase der einzelnen Neuronen gestört wird. Dies geschieht in erster Linie durch die Durchtrennung afferenter und efferenter Verbindungen (Li et al., 1994), wie auch durch die Aufbewahrung des Gewebes unter künstlichen Bedingungen. Daher setzt die Mehrzahl der elektrophysiologischen Studien eine 2- bis 3-stündige Regenerationsperiode an, bevor begonnen werden kann, neuronale Aktivitäten zu testen (Edwards et al., 1989). Es wird angenommen, dass sich während dieser Zeitspanne u.a. das Membranpotential und die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf physiologische Werte zurückbilden. Für den oberflächlichen *Colliculus superior* der Maus existieren diesbezüglich jedoch keine Studien.

#### 3.5.1 Eine chronische mGluR1/5-Blockade fördert die Normalisierung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach dem Schneiden von Hirngewebe

Um nähere Informationen über die Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im lädierten Hirngewebe zu erlangen, wurden horizontale sCS-Vibratomschnitte von P1-Mäusen in ACSF aufbewahrt, mit Fura 2-AM geladen und die intrazelluläre Ruhe- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bestimmt. Dies geschah durch die ratiometrische Messung neuronaler Fluoreszenz als Reaktion auf die Applikation von 25 mM KCl. Um eine ausreichende Deesterifikation sicherzustellen, wurden die ersten Messungen zwischen 60 und 90 Minuten nach dem Anfertigen der Schnitte durchgeführt. Verglichen mit dem Referenzwert nach 2,5 h Inkubation in ACSF ( $[\text{Ca}^{2+}]_i \approx 150 \text{ nM}$ ) ergaben sich signifikant erhöhte Werte der durchschnittlichen intraneuronalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Gewebeproben der Messbereiche 60 - 90 min und 90 - 120 min in ACSF (Abb. 11.A,B). Die Aufbewahrung der Hirnschnitte in ACSF mit erniedrigter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration oder der Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblockern reduzierte erwartungsgemäß die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  während der Regenerationsphase von 2,5 h. Interessanterweise wurde eine schnellere Normalisierung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auch in Gegenwart der spezifischen Gruppe I

mGluR-Antagonisten AIDA (300  $\mu\text{M}$ ) (Moroni et al., 1997) und MPEP (1  $\mu\text{M}$ ) (Gasparini et al., 1999; Pagano et al., 2000) beobachtet (Abb. 11.B). Dieser Befund deckt sich mit der wiederholt gezeigten Erhöhung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nach der Aktivierung von mGluR1/5 (Fagni et al., 2000; Kapur et al., 2001).

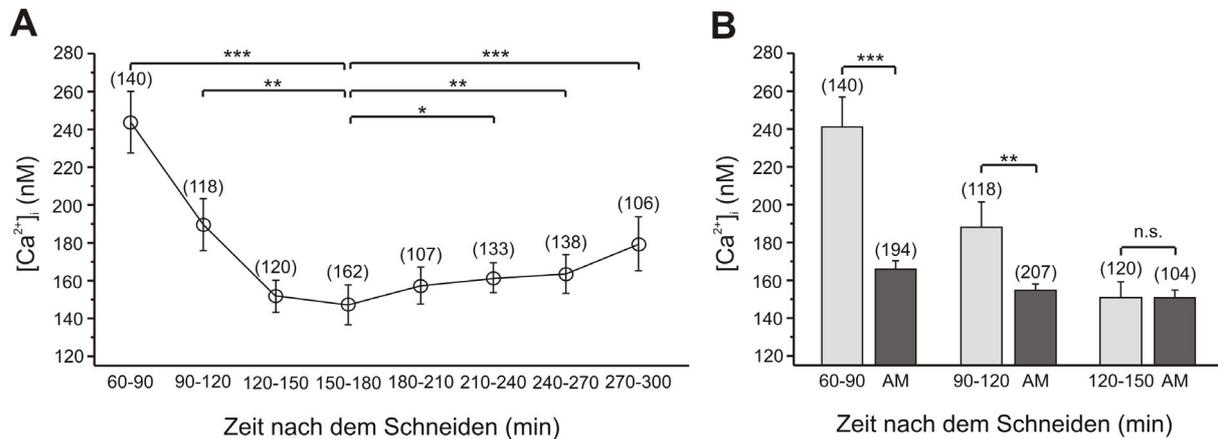


Abbildung 11: Wiederherstellung der Ruhekonzentration des intrazellulären Kalziums ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in akuten Hirnschnitten. (A) Zeitverlauf der Regeneration der Ruhe- $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach dem Anfertigen der Schnitte. Die Zahl in Klammern stellt die Anzahl der untersuchten Neurone dar. (B) Vergleich der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in ACSF und in der zusätzlichen Gegenwart der spezifischen Gruppe I mGluR-Antagonisten AIDA (300  $\mu\text{M}$ ) und MPEP (1  $\mu\text{M}$ ) (abgekürzt: AM). Zu beachten ist die signifikant beschleunigte Rückkehr von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf Ruhewerte während der chronischen Blockade von mGluR1/5 (AM).

### 3.5.2 Zunahme der Aktivität $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger PKC-Isoformen nach chronischer Applikation von Gruppe I mGluR-Antagonisten

Ein weiterer Wirkmechanismus der Gruppe I mGluR führt über die Stimulation von PLC  $\beta$  und die Konzentrationssteigerung von DAG sowie  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu einer exzessiven Aktivierung und eventuell sogar zu einer Depletion der PKC (Kapur et al., 2001; Tremblay et al., 1999; für Übersichtsarbeit siehe auch: Chakravarthy et al., 1999). Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurde unter Zuhilfenahme eines standardisierten Phosphorylierungsassays (MARCKS) der Aktivitätsgrad der PKC in sCS-Hirnschnitten unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

bestimmt. Im Vergleich zu einer alleinigen Inkubation in ACSF zeigte sich interessanterweise in Gewebeschnitten, die für 2,5 h in Gegenwart der Gruppe I mGluR-Antagonisten AIDA (300  $\mu$ M) und MPEP (1  $\mu$ M) inkubiert wurden, eine erhöhte Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen PKC-Isoformen (Zunahme um ca. 12,3 %) (Abb. 12). Im Gegensatz dazu blieb die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen PKC-Isoformen nach 2,5 h Inkubation in ACSF, AIDA und MPEP annähernd unverändert (Abb. 12).

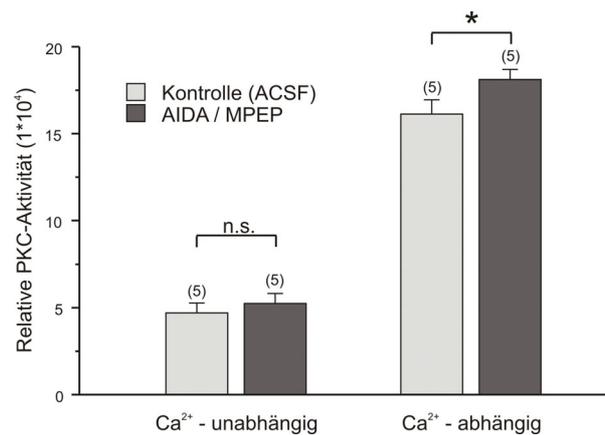


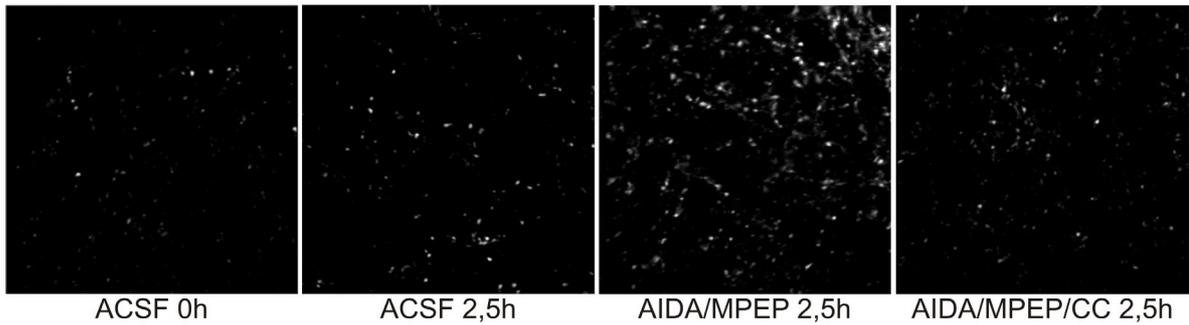
Abbildung 12: Die chronische Blockade der Gruppe I mGluR durch AIDA und MPEP in der Inkubationslösung steigert die PKC-Aktivität in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ . Die PKC-Aktivität wurde *in vitro* durch eine [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP-vermittelte Phosphorylierung des Peptidsubstrats myristoylierte argininreiche C-Kinase (MARCKS) bestimmt.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen, dass Hirnläsionen und die daraus resultierend anhaltenden [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub>-Erhöhungen, zu einer proteolytischen Degradation der PKC durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteasen führen können (Yavin et al., 1995; Kishimoto et al., 1989; Ziemka-Nałęcz et al., 2003). Es wird beschrieben, dass dieser Vorgang sein Maximum ca. drei Stunden nach dem Insult erreicht. Es ist somit möglich, dass die protektive Wirkung der mGluR1/5-Antagonisten auf der Tatsache beruht, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen PKC-Isoformen, u.a. PKC  $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  (Wetsel et al., 1992), besser erhalten bleiben.

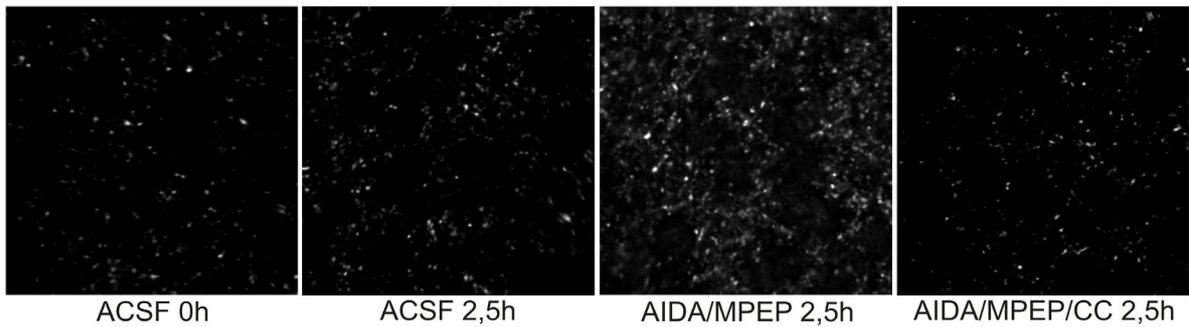
### 3.6 Eine chronische Gruppe I mGluR-Blockade beschleunigt die inhibitorische Synaptogenese in akuten Hirnschnitten

Da bereits gezeigt wurde, dass andauernde  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen und eine gesteigerte PKC-Aktivität gegensinnige Auswirkungen auf die inhibitorische Synaptogenese haben (Meier et al., 2003), war es zunächst unsicher vorherzusagen, welchen Effekt eine chronische Gruppe I mGluR-Blockade auf die inhibitorische Synaptogenese in sCS-Hirnschnitten hat. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Anzahl der VIAAT-IR-positiven Terminalien nach einer 2,5-stündigen Inkubation in ACSF mit einer 2,5-stündigen Inkubation in ACSF sowie den mGluR1/5-Antagonisten AIDA (300  $\mu$ M) und MPEP (1  $\mu$ M) verglichen. Interessanterweise zeigte sich, dass in beiden untersuchten Altersstufen P0 und P7 die Anzahl der inhibitorischen Terminalien (VIAAT-positiv) in Gegenwart der Gruppe I mGluR-Antagonisten signifikant höher war (P0:  $107,46 \pm 5,87$  / GF, [n=31]; P7:  $146,08 \pm 5,27$  / GF, n=[32]), als nach 2,5-stündiger Inkubation in ACSF allein (P0:  $65,36 \pm 4,81$  / GF, [n=34]; P7:  $87,93 \pm 2,18$  / GF, [n=30]). Dieser Befund wurde schon bei der Betrachtung der konfokalen Gesichtsfelder deutlich (**Abb. 13.A**) und bestätigte sich in der statistischen Analyse der immunzytochemisch angefärbten *puncta* (Abb. 13.B; Tab. 2). Der stimulierende Effekt der Gruppe I mGluR-Blockade auf die inhibitorische Synaptogenese konnte fast vollständig durch die Anwesenheit des PKC-Inhibitors Chelerythrin Chlorid (CC, 2  $\mu$ M) unterdrückt werden (P0:  $30,15 \pm 2,98$  / GF, [n=32]; P7:  $65,92 \pm 3,65$  / GF, [n=32]), (Abb. 13.B; Tab. 2). Die in früheren Arbeiten an pränatalen Hirnschnitten beschriebene positive Auswirkung einer PKC-Aktivierung durch PDBu (1  $\mu$ M) auf die Neubildung inhibitorischer Terminalien (Meier et al., 2003) wurde an den postnatalen Präparaten ebenfalls reproduziert (P0:  $129,83 \pm 5,51$  / GF; [n=33]; P7:  $149,17 \pm 4,24$  / GF, [n=31]). Die Ergebnisse zeigen, dass eine PDBu-vermittelte PKC-Aktivierung ein ähnlicher Stimulus für die inhibitorische Synaptogenese ist, wie die chronische Blockade der Gruppe I mGluR (Tab. 2). Hieraus kann geschlossen werden, dass die Aktivierung der Proteinkinase C eine wichtige Voraussetzung für die inhibitorische Synaptogenese in Hirnschnitten des sCS darstellt. Offensichtlich scheint die Aktivität der PKC, insbesondere unter Bedingungen, welche zu exzessiver Depolarisation und  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg führen, eher durch eine Blockade der Gruppe I mGluR als durch deren Aktivierung begünstigt zu werden. Diese Schlussfolgerung wird durch die Ergebnisse der PKC-Aktivitätsbestimmung bei chronischer mGluR1/5-Blockade untermauert (siehe Abschnitt 3.5.2).

**A**  
**P0**



**P7**



**B**

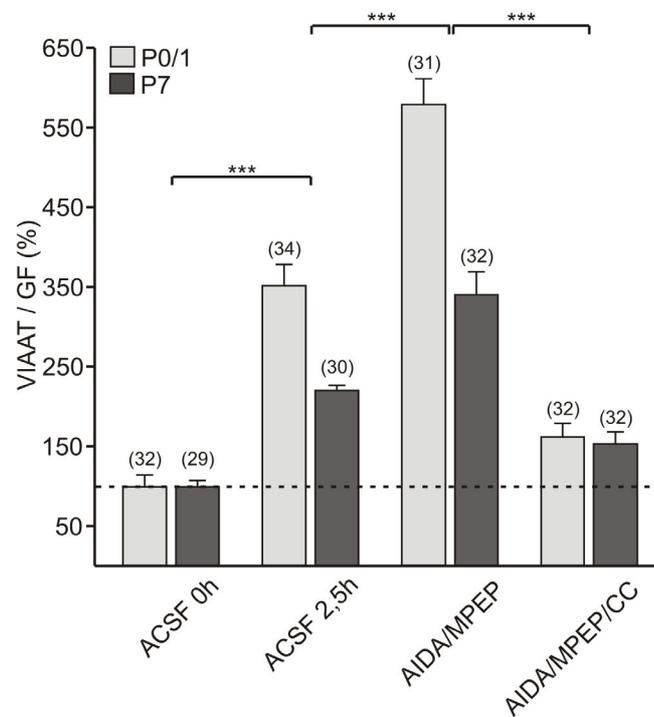


Abbildung 13: Beschleunigung der inhibitorischen Synaptogenese in akuten Hirnschnitten durch Blockade der Gruppe I mGluR. (A) Konfokale Gesichtsfeldausschnitte, die die Zunahme der VIAAT-IR-

positiven Terminalien unter verschiedenen Inkubationsbedingungen in den Alterstufen P0 und P7 zeigen. Im Vergleich zu einer alleinigen Inkubation in ACSF für 2,5 h führt die Inkubation in AIDA (300  $\mu$ M) und MPEP (1  $\mu$ M) zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl inhibitorischer Terminalien. Dieser Effekt ist fast vollständig durch PKC-Blockade mittels CC (2  $\mu$ M) zu verhindern. (B) Statistische Auswertung der Ergebnisse als Anstieg in % bezogen auf die Anzahl VIAAT-positiver Terminalien in unmittelbar fixierten Hirnschnitten des sCS (ACSF 0 h).

	P0		P7	
	<i>puncta</i> / GF	[n]	<i>puncta</i> / GF	[n]
ACSF 0h	18,55 $\pm$ 2,43	32	39,79 $\pm$ 3,52	29
ACSF 2,5h	65,36 $\pm$ 4,81	34	87,93 $\pm$ 2,18	30
ACSF + PDBu 2,5h	129,83 $\pm$ 5,51	33	149,17 $\pm$ 4,24	31
ACSF + AIDA + MPEP 2,5h	107,46 $\pm$ 5,87	31	146,08 $\pm$ 5,27	32
ACSF + AIDA + MPEP + CC	30,15 $\pm$ 2,98	32	65,92 $\pm$ 3,65	32

Tabelle 2: VIAAT-positive *puncta* pro Gesichtsfeld (GF, 100 x 100  $\mu$ m) unmittelbar nach Fixierung des Gewebes (ACSF 0 h) und unter verschiedenen Inkubationsbedingungen (2,5 h) in den Alterstufen P0, P7.

### 3.7 Die Zunahme der Zahl inhibitorischer synaptischer Terminalien ist mit einer verstärkten inhibitorischen synaptischen Aktivität assoziiert

Neu geformte Synapsen können für eine gewisse Zeit inaktiv bleiben, solange die Akkumulation der postsynaptischen Rezeptoren noch unzureichend ist (Rumpel et al., 1998, 2004; Hennou et al., 2002). Jedoch wurde an Schnitten von E18 Mäusen gezeigt, dass die Co-Lokalisation von GAD65 and GABA<sub>A</sub>R-IR an VIAAT-positiven Terminalien bereits nach einer 2,5-stündigen Inkubation in PDBu erfolgt (Meier et al., 2003). Da in der Gegenwart von AIDA/MPEP in P0-Hirnschnitten 5 von 6 Terminalien innerhalb der letzten 2,5 h geformt wurden und mind. 80 % von ihnen eine *postsynaptic density* aufwiesen (siehe Abb. 10.A), kann erwartet werden, dass diese auch ein erkennbar höheres Maß an synaptischer Aktivität aufweisen.

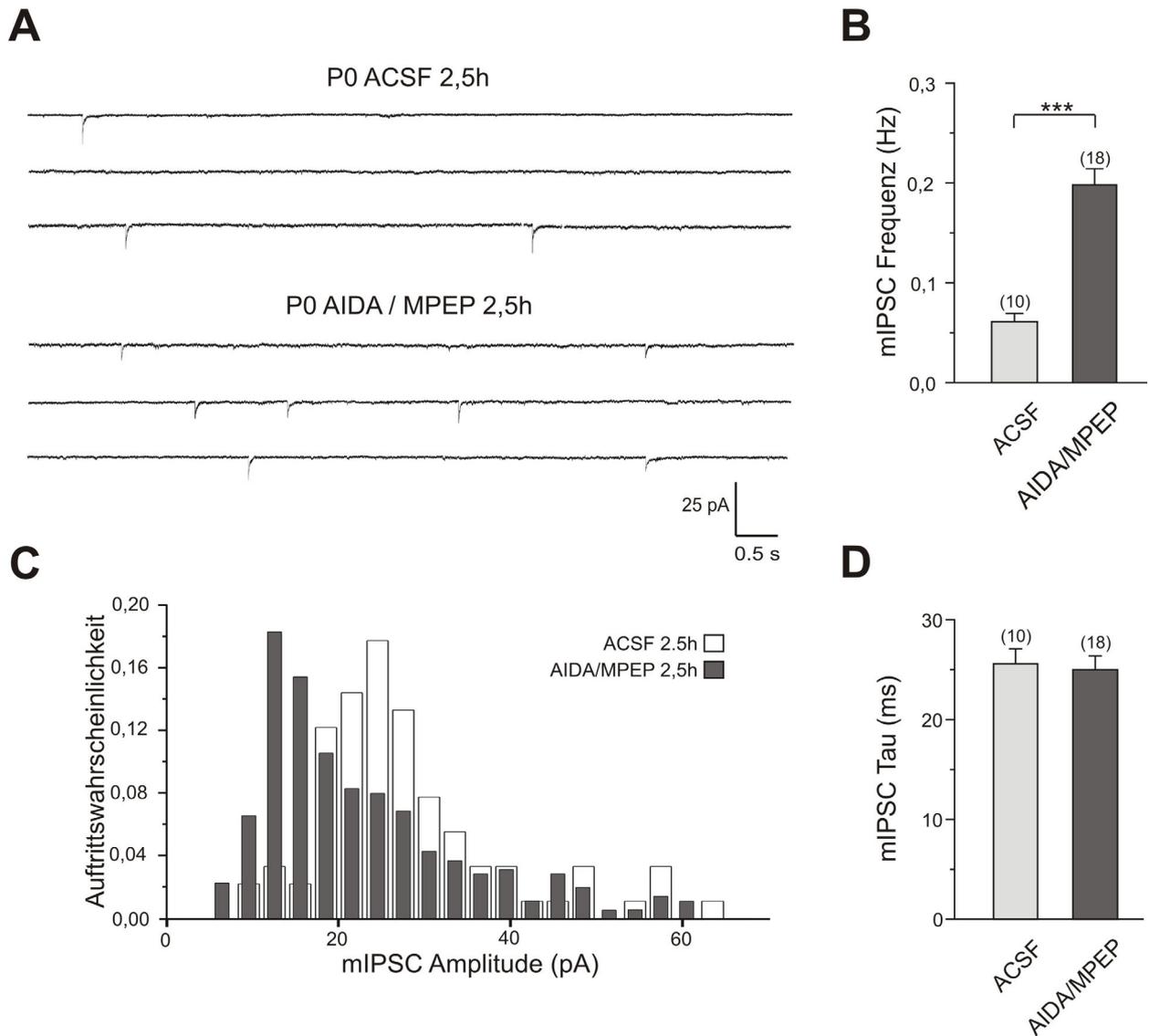


Abbildung 14: Gesteigerte synaptische Aktivität in P0 sCS-Schnitten der Maus, die für 2,5 h mit Gruppe I mGluR-Antagonisten behandelt wurden. (A) Aufzeichnung der mIPSCs zweier Nervenzellen die für 2,5 h in ACSF allein, bzw. für 2,5 h in ACSF/AIDA/MPEP inkubiert wurden. (B) Signifikante Zunahme der mIPSC-Frequenz in ACSF/AIDA/MPEP inkubierten Hirnschnitten. (C) Amplitudenverteilung der mIPSCs in Kontrollschnitten und in mit AIDA/MPEP behandelten Schnitten. Zu beachten ist die Linksverschiebung hin zu niedrigeren Amplituden bei chronischer mGluR1/5-Blockade. (D) Unveränderte mIPSC-Kinetik von mit AIDA/MPEP behandelten Neuronen im Vergleich zu den Kontrollmessungen.

Um mögliche akute Effekte der Gruppe I mGluR-Blockade auf die GABA-Freisetzung zu verhindern, begannen die elektrophysiologischen Ganzzellaufzeichnungen nach einer 10-minütigen

Auswaschperiode. Die Abbildung 14.A zeigt die mIPSC-Aktivität zweier repräsentativer P0 Nervenzellen in Kontrollschnitten (2,5 h Inkubation in ACSF) und in chronisch ACSF/AIDA/MPEP-behandelten sCS-Schnitten. In Übereinstimmung mit der schon vorher beschriebenen Abnahme der GABA<sub>A</sub>R-Clustergröße, zeigte sich eine leichte Linksverschiebung in der Amplitudenverteilung der mIPSCs nach ACSF/AIDA/MPEP-Inkubation (Abb. 14.C). Eine Veränderung in der Kinetik der aufgezeichneten Ströme wurde nicht beobachtet (Abb. 14.D). Der entscheidende Befund war jedoch, dass in Gegenwart der Gruppe I mGluR-Antagonisten die mIPSC-Frequenz im Vergleich zu den Kontrollmessung um den Faktor 3,2 zunahm (ACSF 2,5h:  $0,062 \pm 0,008$  Hz [n=10], ACSF/AIDA/MPEP 2,5h:  $0,199 \pm 0,016$  Hz [n=18]) (Abb. 14.A,B).

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von P7 Hirnschnitten erhalten (Tab. 3). Diese Beobachtungen führen zu der Schlussfolgerung, dass die Zunahme der Zahl der inhibitorischen Terminalien in sCS-Schnitten, die für 2,5 h mit mGluR1/5-Blockern behandelt wurden, tatsächlich mit einer Steigerung der GABA-Freisetzung verbunden ist. Somit muss ein großer Teil der neu gebildeten synaptischen Terminalien den vollen Grad an Funktionalität innerhalb von weniger als drei Stunden erreicht haben.

	P0			
	ACSF 2,5h	[n]	ACSF / AIDA / MPEP 2,5h	[n]
mIPSC Frequenz (Hz)	$0,062 \pm 0,008$	10	$0,199 \pm 0,016$	18
mIPSC Amplitude	$26,55 \pm 1,06$	10	$25,92 \pm 1,17$	18
mIPSC Tau (ms)	$25,70 \pm 1,51$	10	$25,09 \pm 1,37$	18
	P7			
	ACSF 2,5h	[n]	ACSF / AIDA / MPEP 2,5h	[n]
mIPSC Frequenz (Hz)	$0,234 \pm 0,019$	10	$0,374 \pm 0,023$	11
mIPSC Amplitude	$25,85 \pm 1,57$	10	$22,67 \pm 1,60$	11
mIPSC Tau (ms)	$22,89 \pm 1,37$	10	$23,28 \pm 1,34$	11

Tabelle 3: Gegenüberstellung elektrophysiologischer Messdaten von sCS-Hirnschnitten der Alterstufen P0 und P7.