

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerung

Die hier beobachteten Wirkungen der Gruppe I metabotropen Glutamaterezeptoren auf die GABAerge synaptische Transmission in den visuellen Schichten des *Colliculus superior* und die inhibitorische Synaptogenese können folgendermaßen zusammengefasst werden:

- Es gibt eine entwicklungsabhängige Verteilungsänderung der mGluR1/5-mRNA-Expression mit einer stetigen, annähernd linearen Zunahme der relativen Intensitäten zwischen dem 18. embryonalen und dem 10. postnatalen Tag.
- Die transiente Gruppe I mGluR-Aktivierung führt durch eine gesteigerte Transmitterfreisetzung zu einer signifikanten Erhöhung der Frequenz der spontanen inhibitorischen Ströme (sIPSCs) und Mini-IPSCs (mIPSCs).
- Die lokale GABA-Applikation unter Stimulation der Gruppe I mGlu-Rezeptoren durch Quisqualat, wie auch die mIPSC-Registrierung zeigen in *perforated-patch*-Ableitungen eine Amplitudenreduktion der inhibitorischen Cl<sup>-</sup>-Ströme, was im Sinne einer postsynaptischen Modulation des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors zu werten ist. Da dieser Effekt unter Blockade der Proteinkinase C vollständig reversibel ist, scheint eine mGluR-vermittelte GABA<sub>A</sub>R-Phosphorylierung wahrscheinlich.
- Eine 2,5-stündige Inkubation der Hirnschnitte in künstlicher Liquorflüssigkeit (ACSF) führt im Vergleich zu unmittelbar fixierten sCS-Proben zu einer signifikanten Zunahme der Zahl der inhibitorischen Terminalien.
- Die chronische Applikation von Gruppe I mGluR-Antagonisten für 2,5 Stunden nach dem Anfertigen der Hirnschnitte blockiert die Entstehung von intrazellulären [Ca<sup>2+</sup>]-Wellen, führt zu einer gesteigerten Aktivität der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen PKC-Isoformen und beschleunigt die inhibitorische Synaptogenese in den oberflächlichen Schichten des *Colliculus superior*. Die vermehrte Bildung inhibitorischer Terminalien unter mGluR1/5-Blockade ist durch zusätzliche Inhibierung der Proteinkinase C zu verhindern.

- Die unter Gruppe I mGluR-Blockade neu gebildeten inhibitorischen Terminalien sind Teil funktioneller Synapsen, da nach Inkubation eine verstärkte inhibitorische synaptische Aktivität in Form von mIPSCs nachgewiesen werden kann.

#### 4.2 Entwicklungsabhängige Verteilungsänderung der mGluR1/5-mRNA-Expression

Die verschiedenen Subtypen der metabotropen Glutamaterezeptoren können aufgrund ihrer unterschiedlichen Expression im zentralen Nervensystem mannigfaltige Effekte auf die Neurotransmission haben. Vorangegangene Arbeiten belegten eine regional sehr unterschiedliche mGluR-mRNA-Verteilung. Kerner et al. (1997) beschrieben beispielsweise eine mGluR1- und mGluR5-mRNA-Expression im Neostriatum, Neokortex und im Hippokampus. Trotz alledem spiegelt die mRNA-Verteilung nicht die exakte Lokalisation des Rezeptors selbst wider. Erst die Verfügbarkeit subtypenspezifischer Antikörper ermöglichte die exakte zelluläre und subzelluläre Lokalisation der Rezeptorproteine: mGluR1 und mGluR5 konnten u.a. im Hippokampus und Zerebellum (Shigemoto et al., 1997), in den Basalganglien (Tallaksen-Greene et al., 1998) und im Thalamus (Testa et al., 1998) nachgewiesen werden.

Die mGluR-mRNA-Analyse deckte des Weiteren charakteristische Unterschiede in der örtlichen und zeitlichen Expressionsverteilung auf. Während die mGluR1-mRNA-Expression der Ratte innerhalb der frühen Postnatalphase kontinuierlich zunimmt (Shigemoto et al., 1992), wurden für die mGluR5-mRNA hohe Expressionswerte zum Zeitpunkt der Geburt bestimmt, die bis zum adulten Alter stetig abfielen (Catania et al., 1994). In den oberflächlichen Schichten des *Colliculus superior* wurde sowohl eine mGluR1- als auch eine mGluR5-mRNA-Expression nachgewiesen (siehe Abschnitt 3.1.1, Abb. 5.A,B). Die mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelte altersabhängige mRNA-Verteilung ergab jedoch für die Alterstufen E18, P0, P7 und P10 eine stets stärkere mGluR5-mRNA-Expression im Vergleich zu mGluR1. Interessanterweise nahm die Expression für beide mGluR-Subtypen über den Zeitpunkt der Geburt hinaus zu. Eine gegenläufige Expressionsverteilung konnte im sCS spätembryonaler und frühpostnataler Mäuse bis P15 nicht beobachtet werden. Die Unterschiede in der entwicklungsabhängigen Verteilung der Gruppe I mGluR können jedoch eine entscheidende Rolle in der Ausbildung fein abgestimmter neuronaler Netzwerke spielen.

### 4.3 Präsynaptische Modulation der GABAergen Inhibition durch mGluR1/5

Elektrophysiologische Untersuchungen legen nahe, dass Gruppe I mGlu-Rezeptoren die GABA-Freisetzung u.a. von Interneuronen des Hippokampus oder des Thalamus regulieren (für ein Review siehe: J. Cartmell & Schoepp D.D., 2000). Hierbei wurde wiederholt eine Reduktion in der Amplitude von GABA-vermittelten inhibitorischen postsynaptischen Strömen in der CA1-Region des Hippokampus (Liu et al., 1993; Jouvenceau et al., 1995) und im Zerebellum (Llano & Marty, 1995) beobachtet. Auch Gereau und Conn (1995) zeigten, dass der selektive Gruppe I mGluR-Agonist DHPG die inhibitorische synaptische Transmission in der CA1-Region reduziert. Die Entwicklung von untergruppensensitiven mGluR-Agonisten bewies jedoch, dass es zwischen den einzelnen Subtypen eminente Funktionsunterschiede gibt. So konnte unter anderem die thalamische GABAerge Inhibition, hervorgerufen durch elektrische Stimulation des somatosensorischen Kortex, durch die mGluR-Agonisten 2R,4R-ACPD (Gruppe II) und L-AP4 (Gruppe III), nicht jedoch durch DHPG (Gruppe I), unterdrückt werden (Salt & Turner, 1998). Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Reduktion der GABA-Freisetzung gibt es jedoch auch faszilitierende Effekte der mGluR. Die Stimulation der Gruppe I mGluR kann die Phospholipase C aktivieren und über den IP<sub>3</sub>-Weg die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern bewirken (Abe et al. 1992; Aramori & Nakanishi 1992; Masu et al. 1991; Nakanishi 1992; Schoepp & Conn 1993). Die PKC-vermittelte Phosphorylierung der mGluR kann darüber hinaus intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen hervorrufen (Kawabata et al. 1996). Da angenommen wird, dass die Transmitterfreisetzung GABAerger Synapsen Ca<sup>2+</sup>-abhängig ist, könnte insbesondere eine Gruppe I mGluR-Modulation der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> die GABA-Freisetzung beeinflussen (Stefani et al. 1994). Über diesen Mechanismus führte die Applikation des Gruppe I mGluR selektiven Agonisten Quisqualat in striatalen Hirnschnitten zu einer Zunahme der GABA-Freisetzung (Wang et al., 1996).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass durch die selektive Aktivierung von mGluR1/5 mittels Quisqualat die Frequenz der spontanen IPSCs in Hirnschnitten des oberflächlichen *Colliculus superior* signifikant erhöht wird. Diese Zunahme in der sIPSC-Frequenz könnte auf eine direkte Depolarisation der GABAergen Neurone und eine Steigerung der aktionspotentialabhängigen Transmitterfreisetzung zurückgeführt werden (vgl.: Zhou &

Hablitz, 1997a). An neokortikalen Interneuronen wurde eine direkt depolarisierende Wirkung durch Quisqualat bereits nachgewiesen (Zhou & Hablitz, 1997b).

Wenn man allerdings diesen Mechanismus voraussetzen würde, dürfte es keinen Gruppe I mGluR-vermittelten Effekt auf die AP-unabhängigen mIPSCs geben. Da es jedoch, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, auch unter TTX-Blockade zu einer signifikanten Quisqualat-induzierten Frequenzerhöhung GABAerger mIPSCs kam, müssen zusätzliche Mechanismen in Betracht gezogen werden. Alternativ kann eine Erhöhung der IPSC-Frequenz auch aus direkten Effekten von mGluR1/5 an der präsynaptischen inhibitorischen Terminalie resultieren. So führt die durch *second-messenger*-Kaskaden der G-Protein-gekoppelten Gruppe I mGluR verursachte Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  zu einer vermehrten Freisetzung von GABA-haltigen Vesikeln (Stefani et al., 1994).

Es kommen jedoch noch weitere präsynaptische Mechanismen in Betracht: (i) Die präsynaptische Aktivierung von mGlu1/5-Rezeptoren könnte, vermutlich durch Aktivierung der PKC, zu einer Erhöhung der Fraktion bereits angedockter, präsynaptischer Vesikel führen. Ähnliche Beobachtungen wurden an exzitatorischen Synapsen in Schnittkulturen des Hippokampus nach chronischer BDNF-Gabe gemacht (Tartaglia et al., 2001).

(ii) Die präsynaptische Modulation der GABAergen Hemmung durch eine akute Aktivierung der Gruppe I mGluR könnte auch auf einer Veränderung der präsynaptischen  $Ca^{2+}$ -Kanäle und das nachfolgende Ansteigen der GABA-Freisetzungswahrscheinlichkeit beruhen (Baldelli et al., 2002).

(iii) Theoretisch muss darüber hinaus eine durch mGluR1/5-Aktivierung reduzierte Wiederaufnahme von GABA aus dem synaptischen Spalt als auch eine Verminderung der GABA-Menge pro Vesikel in Betracht gezogen werden. So kann die Aktivierung von Tyrosinkinasen zu einer PKC-unabhängig erhöhten Aktivität des GABA-Transporters GAT1 führen (Law et al., 2000; Quick et al., 2004).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass über die Aktivierung der PKA (Cai et al., 1999; Micheau und Riedel, 1999) und anschließende Inhibition der präsynaptischen Glutamatdecarboxylase (GAD) (Hsu et al., 1999) die GABA-Konzentration in der präsynaptischen Terminalie reduziert und somit die Vesikelfüllung beeinträchtigt wird.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die akute Aktivierung der Gruppe I metabotropen Glutamatrezeptoren in Hirnschnitten des visuellen *Colliculus superior* eine signifikante Zunahme der Frequenz sowohl der spontanen als auch der mIPSCs bewirkte. Nach Auswaschen des Rezeptoragonisten war dieser Effekt vollständig reversibel. Diese vermutlich präsynaptische Wirkung der mGluR kann jedoch nicht die alleinige sein, da sowohl immunhistochemische Färbungen (Hubert et al., 2001; Defagot et al., 2002) als auch eine deutliche Linksverschiebung in der Amplitudenverteilung der mIPSCs nach mGluR1/5-Aktivierung (siehe Abschnitt 3.2.2), eine postsynaptische Lokalisation und Wirkung dieser Rezeptoren wahrscheinlich machen.

#### 4.4 Postsynaptische Mechanismen der Gruppe I mGluR-Wirkung

Die Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren der Gruppe I führt zu einer Stimulation der PLC  $\beta$ , was konsekutiv einen Anstieg der intrazellulären Konzentrationen von DAG und  $Ca^{2+}$  zur Folge hat, was wiederum einen stimulierenden Einfluss auf die PKC-Aktivität ausübt (siehe Abschnitt 1.3). Eine Aktivierung der Proteinkinase C hat, wie in der vorliegenden Studie gezeigt wurde, einen inhibitorischen Effekt auf den Aktivitätsgrad der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (siehe Abschnitt 3.3.2; Henneberger et al. 2002). Die Applikation hoher extrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen oder des Phorbolesters PDBu (1  $\mu$ M) reduzierte signifikant die Amplitude der GABA-induzierten Ströme von *colliculären* Neuronen. Ähnliche Ergebnisse wurden in Arbeiten anderer Autoren beschrieben (Tapia et al., 1997; Gao & Greenfield, 2004; für eine Übersichtsarbeit: siehe Swope et al., 1999). Um die Einflussnahme von mGluR1/5 auf die inhibitorische synaptische Transmission im *Colliculus superior* zu untersuchen, wurde in einem ersten Schritt lokal GABA appliziert und die induzierten Cl<sup>-</sup>-Ströme aufgezeichnet. Bei zusätzlicher Aktivierung der Gruppe I mGluR wurde eine signifikante Reduktion der IPSCs beobachtet. Deshalb konnte erwartet werden, dass die akute Stimulation von Gruppe I mGluR auch die Amplitude GABAerger mIPSCs reduzieren würde.

Mit Hilfe von *perforated-patch*-Ableitungen, die ein Auswaschen der intrazellulären *second-messenger*-Systeme verhindern, gelang es, diesen Effekt direkt nachzuweisen. Zusätzlich wurde jedoch auch hier ein deutlicher Anstieg in der mIPSC-Frequenz gesehen. Da der PKC-Antagonist Chelerythrin Chlorid (CC, 2  $\mu$ M) die mGluR1/5-vermittelte postsynaptische

Depression verhinderte, ergibt sich die Hypothese, dass die reduzierte GABA<sub>A</sub>R-Aktivität auf einer mGluR1/5-induzierten Aktivierung der Proteinkinase C beruht.

Die akuten Effekte von Gruppe I mGluR-Liganden auf die GABAerge synaptische Transmission wurden bereits in vorangegangenen Studien durch die Aufzeichnung evozierter inhibitorischer postsynaptischer Ströme (eIPSCs) analysiert (Gereau & Conn, 1995; Morishita et al., 1998; Bushell et al., 1999; Battaglia et al., 2001; Marino et al., 2001; Galante & Diana, 2004; Drew & Vaughan, 2004). All diese Ergebnisse beschreiben eine mGluR-induzierte Depression der evozierten GABA-Freisetzung (Yoshida et al., 2002; Galante & Diana, 2004). Die hier beschriebenen Ergebnisse decken sich mit dieser Schlussfolgerung. Die beobachtete Reduktion der postsynaptischen GABA<sub>A</sub>R-Aktivität stellt somit eine zusätzliche Facette dieser Depression dar.

Die Zunahme in der mIPSC-Frequenz während der mGluR1/5-Aktivierung war in diesem Zusammenhang ein etwas unerwartetes Ergebnis (siehe jedoch: Zheng & Johnson, 2003; Drew & Vaughan, 2004) und steht scheinbar im Widerspruch zur Suppression der eIPSCs. Folgende Erklärungsansätze sind denkbar:

i) Die spontane GABA-Freisetzung stammt von präsynaptischen Dendriten (Houser et al., 1983; Kraszewski & Grantyn, 1992). Wenn man jedoch die in EM-Aufnahmen nachgewiesenen axodendritischen Terminalien sowie eine ähnlich starke Aufregulation der mIPSC-Frequenz als auch der Terminalienzahl unter chronischer AIDA/MPEP-Applikation berücksichtigt, so scheint eine ausschließlich dendritische und nicht axonale Freisetzung unwahrscheinlich.

ii) Die spontane und evozierte GABA-Freisetzung geschieht an axonalen Terminalien, was bedeuten würde, dass die eIPSC- und mIPSC-Generierung unter unterschiedlicher Kontrolle steht. Diese Frage bedarf sicherlich noch der weiteren Untersuchung.

Die Gruppe I mGluR-induzierte Reduktion postsynaptischer GABA<sub>A</sub>R-Aktivität kann durch mehrere Mechanismen erklärt werden. Hierzu zählen Änderungen in der Zusammensetzung der GABA<sub>A</sub>R-Untergruppen, eine Reduktion der Öffnungswahrscheinlichkeit des einzelnen Rezeptors oder auch eine gesteigerte Rezeptorphosphorylierung, die zu einer Abnahme der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit des Kanals führt. Auch Veränderungen in der postsynaptischen Rezeptormobilität können zu Rezeptorinternalisationen oder zu extrasynaptischen Lokalisationen

führen. Eine Änderung der GABA<sub>A</sub>R-Zusammensetzung wurde für die Untergruppen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_6$  und  $\gamma_2$  in zerebellären Körnerzellen nach 1-2 Tagen in einer BDNF-Kultur beschrieben (Bulleit & Hsieh, 2000). Für die beobachteten akuten Effekte der mGluR1/5-Aktivierung auf die inhibitorische Transmission scheint es allerdings unwahrscheinlich, dass sich das GABA<sub>A</sub>R-Profil innerhalb von 10-90 Minuten vollständig ändert.

Eine sehr wahrscheinliche Erklärung für die beschriebene mIPSC-Reduktion stellt die PKC-vermittelte GABA<sub>A</sub>R-Phosphorylierung dar. Sie kann zu Änderungen der Öffnungswahrscheinlichkeit des Cl<sup>-</sup>-Kanals aber auch zu einer Desensibilisierung des Rezeptors führen. An den beschriebenen Mechanismen sind jedoch oft verschiedene Kinasen beteiligt. Beispielsweise führte in Ganglienzellen des Sympathikus eine PKC-vermittelte Phosphorylierung zur Reduktion GABA-aktivierter Ströme (Krishek et al., 1994). In den Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippokampus wurden hingegen die mIPSC-Amplituden durch eine Zunahme der PKA-Aktivität reduziert und eine PKC-Aktivierung führte sogar zu einer Zunahme der durchschnittlichen mIPSC-Amplitude (Poisbeau et al., 1999). Neben dem untersuchten System scheint auch der Zeitverlauf der möglichen GABA<sub>A</sub>R-Modulation eine entscheidende Rolle zu spielen. In hippokampalen Zellkulturen wurde mit der Methode der Ganzzelleableitung eine kurzfristige Erhöhung der mIPSC-Amplitude unter BDNF-Zugabe beobachtet. Dem folgte jedoch eine prolongierte Depression der inhibitorischen Ströme (Jovanovic et al., 2004). Als möglicher Mechanismus wurde auch hier eine PKC-abhängige Phosphorylierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors diskutiert. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Studien an Neuronen des präfrontalen Kortex. Hier bewirkte Serotonin eine Inhibition GABA<sub>A</sub>R-vermittelter Ströme durch eine Phosphorylierung des Rezeptors durch membrangebundene Proteinkinase C (Feng et al., 2001).

Die gegenwärtige Datenlage bezüglich des *Colliculus superior* der Maus stützt die Annahme, dass die mGluR1/5-Aktivierung eine Reduktion der GABAergen IPSCs via PKC-Stimulation und konsekutive GABA<sub>A</sub>R-Phosphorylierung bewirkt, da die mIPSC-Reduktion durch den spezifischen PKC-Inhibitor Chelerythrin Chlorid vollständig zu verhindern war (siehe Abschnitt 3.3.2). Sowohl die Proteinkinase A als auch C können den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor phosphorylieren (Krishek et al., 1994; McDonald & Moss, 1997; Poisbeau et al., 1999). Phosphoryliert werden unter anderem die  $\beta_{2,3}$ -Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors, von denen die  $\beta_3$ -Untereinheit in besonderem Maße im visuellen CS exprimiert wird (Wisden et al., 1992).

Diese Annahme muss trotz alledem als spekulativ angesehen werden, da die Gruppe I mGluR-vermittelte Reduktion der Einzelkanalöffnungswahrscheinlichkeit für Cl<sup>-</sup>-Kanäle bislang nicht direkt nachgewiesen wurde.

Ein sehr interessanter weiterer Erklärungsansatz für die akut reduzierten mIPSC-Amplituden nach mGluR1/5-Aktivierung ergibt sich aus der Annahme einer GABA<sub>A</sub>R-Diffusion hin zu extrasynaptischen Lokalisationen oder gar einer Rezeptorinternalisierung. Diese Möglichkeiten wurden bereits intensiv für vergleichbare PKC-abhängige BDNF-vermittelte Wirkungen auf GABAerge IPSCs diskutiert (Henneberger et al., 2002). Hierbei wird eine verminderte GABA<sub>A</sub>R-vermittelte Antwort im Hirnschnitt durch Veränderungen in der Postsynapse oder Abweichungen von zellulären Rezeptorverteilungen angenommen. In hippokampalen Zellkulturen, denen BDNF zugesetzt wurde, kam es beispielsweise sowohl zu einer Abnahme der GABA<sub>A</sub>R-IR für einzelne Rezeptoruntereinheiten als auch zu einer Verminderung der mIPSC-Amplitude (Brüning et al., 2001). Aber auch in anderen Expressionssystemen konnte nachgewiesen werden, dass die Anzahl und die Oberflächenstabilität von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in der Zellmembran vom Grad der PKC-Aktivität abhängen (Conolly et al., 1999; Filippova et al., 2000).

In der Literatur finden sich jedoch auch widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Gruppe I mGluR-vermittelten Reduktion GABAerger inhibitorischer synaptischer Ströme. So beschrieben beispielsweise Hoffpauir und Gleason (2002) eine mGluR5-abhängige Modulation der GABA<sub>A</sub>R-Funktion in amakrinen Zellen der Retina. In Ganzzelleableitungen führte die selektive mGluR5-Aktivierung mittels CHPG zu einer ca. 10-prozentigen Verstärkung der GABA-Ströme. Diese Ströme wurden durch eine zusätzliche PKC-Aktivierung sogar noch weiter verstärkt und die Abnahme der freien [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Werte bzw. die Blockade der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen PKC-Isoformen resultierte in einer Abschwächung der mGluR5-abhängigen Effekte.

Insgesamt bieten unsere Daten, wie auch die Literatur, klare Evidenzen für eine postsynaptische Modulation der GABAergen inhibitorischen Transmission durch Gruppe I metabotrope Glutamatrezeptoren.

#### 4.5 Strukturelle Veränderungen in Hirnschnitten *in vitro*

Aktuelle Arbeiten legen die Möglichkeit nahe, dass zumindest in Präparaten aus dem noch nicht vollständig ausgereiften Gehirn neue synaptische Kontakte innerhalb weniger Minuten gebildet werden (Konur & Yuste, 2004; Niell et al., 2004). Harris und ihre Mitarbeiter waren unter den Ersten, die strukturelle Veränderungen in Hirnschnitten nach der *in vitro* Inkubation beschrieben (Kirov et al., 1999; Fiala et al. 2003). Sie beobachteten eine rapide Zunahme in der Anzahl dendritischer Ausstülpungen in der Hippokampusformation, sog. *spines*, nach dem Anfertigen von Hirnschnitten. Auch Arbeiten mit Echtzeitdarstellungen fluoreszierender Dendritenfortsätze unterstützen die Annahme, dass exzitatorische Synapsen innerhalb weniger Stunden neu gebildet aber auch eliminiert werden können (Segal, 2001; McNally & Borgens, 2004). Bereits die früheren Arbeiten der AG Grantyn lieferten erste Erkenntnisse über die Entwicklung inhibitorischer synaptischer Kontakte in akuten Hirnschnitten des embryonalen *Colliculus superior* (Meier et al., 2003). Immunhistochemische Färbungen postsynaptischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und elektrophysiologische Ableitungen zeigten, dass ein signifikanter Teil der neu geformten synaptischen Terminalien postsynaptische Spezialisierungen induzieren kann, die es den Neuronen ermöglichen, auch postsynaptische Ströme zu generieren. Unterstützt wird die Hypothese der akuten reaktiven Synaptogenese durch Studien, die eine Umgestaltung der synaptischen Netzwerke nach kurzen hypoxischen und hypoglykämischen Episoden beschreiben (Jourdain et al., 2002).

Weiterhin nicht abschließend geklärt ist jedoch die Frage nach dem Zeitverlauf der strukturellen und synaptischen Veränderung in den untersuchten Hirngeweben. Die meisten vorangegangenen Arbeiten belegten, dass die synaptische Reorganisation in einem Zeitraum von Tagen bis Wochen nach der Läsion vonstatten geht (Schauwecker & McNeill, 1996; van den Pol et al., 1998). Es folgten anatomische Studien am Hippokampus adulter Ratten, die eine Spanne von ca. 24-48 Stunden für die synaptische Reorganisation beschrieben (Covolan et al., 2000). Aktuelle Untersuchungen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (EM) legen jedoch nahe, dass neue Synapsen eher innerhalb von weniger als drei Stunden gebildet werden (Kirov et al., 1999, 2004). Mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wurde nachgewiesen, dass das Ausbilden GABAerger Terminalien einen deutlich schnelleren Prozess darstellt, als bislang

angenommen (Meier et al., 2003, siehe Abschnitt 3.4.2). Nicht nur die Bildung, sondern auch die Eliminierung synaptischer Strukturen muss als eine lebenslange Fähigkeit aktiver Neurone angesehen werden (für eine Übersichtsarbeit siehe: Waites et al., 2005).

Doch auch Studien über die Langzeitfolgen von Hirnläsionen auf die GABAergen synaptischen Verbindungen sind bislang widersprüchlich. Experimente mit fokalen Läsionen im visuellen Kortex belegen eine Reduktion der GABAergen synaptischen Marker, wie z.B. GAD65, GABA<sub>A</sub>R  $\alpha_1$  und GAT. In Verbindung mit diesen Beobachtungen stand eine Abnahme von synaptischen Strömen sowie eine Zunahme der Exzitabilität der die Läsion umgebenden Neurone (Eysel et al., 1999). Die transiente Reduktion der GABAergen synaptischen Inhibition wurde als eine Voraussetzung für das kollaterale *sprouting* subkortikaler visueller Afferenzen gewertet. Auf der anderen Seite führten Läsionen im enthorhinalen Kortex zu einem Auswachsen GABAerger synaptischer Terminalien (Deller et al., 1995). Ebenso kam es zu einer Zunahme von Gephyrin-*Clustern* an den Endstellen der präläsionalen enthorhinalen Afferenzen an den Körnerzellen des *Gyrus dentatus* (Simburger et al., 2000), sowie zu einer Vermehrung der GABA<sub>A</sub>R  $\alpha_2$ -IR-positiven *puncta* (Simburger et al., 2001). Auch im *Nucleus vestibularis* erhöhte eine Deafferenzierung die Zahl der GABA-positiven Varikositäten (Tighilet & Lancour, 2002).

Die Aktivitätszunahme inhibitorischer Netzwerke wurde bislang als Teil eines Schutzmechanismus angesehen, der dem Gewebe in der Umgebung einer fokalen Läsion hilft, den initialen Stress zu überleben und eine funktionale Reorganisation des neuronalen Netzwerkes zu initiieren (Zepeda et al., 2004; Vajda F.J., 2002). Daher ist es notwendig, die Mechanismen, die der reaktiven synaptischen Plastizität zugrunde liegen, genauer zu untersuchen.

Ein möglicher Zugang hierzu sind Experimente zur reaktiven Synaptogenese in akuten Hirnschnitten (Meier et al., 2003). Die Präparation von Hirnschnitten ist unvermeidbar mit Deafferenzierungen und Axotomien verbunden. Für die späteren funktionellen Tests sollten sich die Hirnschnitte allerdings so gut wie möglich von dem initialen Trauma der Gewebeiisolation erholt haben. Um eine optimale Rückgewinnung neuronaler Leistungsfähigkeit zu ermöglichen, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Hierzu gehören die Minimierung des mechanischen Traumas selbst, die Aufbewahrung der Hirnschnitte in oxygenierter künstlicher Liquorflüssigkeit (ACSF) mit einem niedrigen  $[Ca^{2+}/Mg^{2+}]$ -Verhältnis (Richerson & Messer; 1995) und die zusätzliche Applikation von Glutamatrezeptorblockern (Lehmann & Jacobson, 1990). Dies ist notwendig, da durch Hirnschnittläsionen neuronale Depolarisationen (Calabresi et al., 1999b),

die Zunahme der intrazellulären Ruhe-Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen (Pisani et al., 1998; siehe auch Abschnitt 3.5.1) und eine Steigerungen der Glutamatkonzentrationen im Gewebe (Schurr et al., 1995) induziert werden können. Als Konsequenz ergeben sich hieraus pH-Wertveränderungen sowie Störungen des Cl<sup>-</sup>-Gleichgewichts, die zu Zellschwellungen und letztendlich zum Zelltod führen können. In jedem Fall bedeuten diese Störfaktoren eine Beeinträchtigung der neuronalen und synaptischen Transmission.

Der schädliche Einfluss stark erhöhter zellulärer Glutamatfreisetzung, wie sie besonders nach traumatischen Hirnläsionen oder ischämischen Schäden auftritt, ist ausreichend bekannt (Benveniste et al., 1984; Nishizawa Y. 2001). Das noch nicht vollständig ausgereifte Gehirn ist hierfür besonders anfällig, da sich die anfangs noch depolarisierende GABA<sub>A</sub>R-Aktivität additiv zur neuronalen Ca<sup>2+</sup>-Überladung verhält und somit die glutamatinduzierte Exzitotoxizität drastisch verstärkt (Schwartz-Bloom & Sah, 2001; Morimoto et al., 2004). Trotz des Traumas der Hirschnittpräparation zeigt das embryonale Hirngewebe eine erstaunlich große Kapazität, die Zahl der GABAergen Synapsen zu erhöhen (Meier et al., 2003).

#### **4.6 Die akute inhibitorische Synaptogenese in Hirschnitten des oberflächlichen *Colliculus superior* der postnatalen Maus**

Die vorliegenden Experimente liefern schlüssige Hinweise für eine schnelle inhibitorische Synaptogenese in akuten Hirschnitten des oberflächlichen *Colliculus superior* postnataler Mäuse (P0 und P7) und identifizieren darüber hinaus einige der zugrunde liegenden Mechanismen. Insbesondere konnte hierbei ein bislang unbekannter suppressiver Effekt der Gruppe I mGluR auf die Bildung und Aktivität der GABAergen Synapsen im neonatalen Gehirn nachgewiesen werden. Die Ergebnisse können helfen, einige Aspekte der Gewebereorganisation nach massiven Insulten, wie dem Schneiden des Hirngewebes, besser zu verstehen.

Der interessante Umstand, dass das Anfertigen von Hirschnitten oder das Zufügen anderer Hirnläsionen eine Zunahme der Zahl GABAerger synaptischer Terminalien bewirkt, wurde schon vorher beschrieben und diskutiert (Kirov et al., 1999, 2004; Meier et al., 2003). Die

hier gewonnenen neuen Erkenntnisse von embryonalen (Meier et al., 2003) und neonatalen Präparaten des *Colliculus superior* der Maus zeigen, dass der Mechanismus der inhibitorischen Synaptogenese deutlich potenter und schneller ist, als vorher angenommen. Trotzdem harmonisieren die Beobachtungen gut mit Untersuchungen der Beweglichkeit dendritischer Ausläufer (*spines*) oder sogar Echtzeitaufnahmen von Synapsenbildungen (Alsina et al, 2001). Zusammenfassend beschreiben all diese Studien ein Zeitfenster der reaktiven Synapsenneubildung nach Läsion von ungefähr ein bis zwei Stunden.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des *Colliculus superior* von unmittelbar fixierten Präparaten zeigten zum Zeitpunkt der Geburt, wenn überhaupt, nur sehr wenige inhibitorische Synapsen (Abschnitt 3.4.2) (Warton, Perouansky & Grantyn, 1990). Das mit der Herstellung von akuten Hirnschnitten verbundene Trauma könnte im Prinzip auch lediglich zu einer Veränderung der vesikulären Marker Syn, Syp, VGlut und VIAAT führen, ohne dass es zu einer wirklichen Neubildung von inhibitorischen Synapsen kommt. Eine Zunahme der Syn- bzw. VIAAT-Immunreaktivität ohne die gleichzeitige Erhöhung der Zahl der synaptischen Formationen wurde jedoch bislang nicht beschrieben.

Allerdings könnten sich, insbesondere im jungen Hirngewebe, Vesikel an nicht synaptischen Stellen, wie z.B. Axonbifurkationen, zusammenlagern. In Hirnpräparaten junger Mäuse (< P10) wurde der vesikuläre GABA-Transporter (VIAAT) immunhistochemisch beispielsweise an Axonvarikositäten und *growth cones* nachgewiesen, was für eine frühe extrasynaptische GABA-Freisetzung sprechen würde (Takayama & Inoue, 2004). Die Zunahme der doppeltgefärbten VIAAT- und Syn-positiven *puncta* kann ebenfalls nicht als ausreichender Beweis für die wirkliche Synapsenneubildung in neonatalen Hirnschnitten angesehen werden. Die vorliegenden EM-Bilder liefern aber eine sicherere Grundlage für die Hypothese, dass innerhalb von 2,5 Stunden nach dem Anfertigen der Hirnschnitte tatsächlich neue Synapsen im sCS gebildet werden können. Obwohl es nicht möglich war, die Vesikelform als ein Kriterium zur Unterscheidung zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen heranzuziehen, gab es doch markante Unterschiede in der postsynaptischen Verdickung (*postsynaptic density*). Weniger als 20 % aller synaptischen Strukturen waren als asymmetrisch klassifiziert worden. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die Mehrzahl der postsynaptischen Ströme, welche zum Zeitpunkt P0/P1 und jünger registriert wurden, vom inhibitorischen Typ waren (Jüttner et al., 2001).

Eine weitere wichtige Frage ist, ob das Phänomen der *in situ* Synaptogenese auf eine bestimmte Entwicklungsstufe begrenzt ist, in der i) ohnehin nur wenige Synapsen existieren und ii) GABA noch als depolarisierender Neurotransmitter wirkt. Im Falle des sCS des Maus erfolgt der Wechsel von der depolarisierenden zur hyperpolarisierenden GABA-Funktion am Tag P2 (Akyeli, J., 2006). Demgegenüber zeigen die Ergebnisse von *Colliculi superiores* der Altersstufe P7, dass die Bildung neuer Synapsen innerhalb eines viel weiteren Zeitrahmens möglich ist. Der Anteil der neu gebildeten inhibitorischen Terminalien ist allerdings weniger prominent, wenn in den unmittelbar fixierten Kontrollschnitten zuvor schon eine größere Zahl an Synapsen nachweisbar war (siehe Abschnitt 3.6).

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass GABA lokal oder auch zeitlich begrenzt weiterhin als depolarisierender Neurotransmitter wirken kann, da der Aktivitätszustand und die Membrantranslokation des für diesen Mechanismus kritischen Cl<sup>-</sup>-Transporters KCC2 großen Schwankungen unterliegt (Rivera et al., 2004, 2005). Interessanterweise haben bislang nicht veröffentlichte Ergebnisse des Labors gezeigt, dass in P7-Hirnschnitten nach 2,5-stündiger Inkubation in ACSF mehr Nervenzellen eine diffuse zytoplasmatische Verteilung der KCC2-IR aufweisen, als dies bei unmittelbar fixierten Hirnschnitten derselben Alterstufe der Fall ist. Diese Ergebnisse unterstreichen das Problem, dass die wiederholt diskutierte Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der inhibitorischen Synaptogenese nicht ausreichend durch die Möglichkeit, mit exogenem GABA ein großes Ganzzell-Ca<sup>2+</sup>-Signal zu induzieren, erklärt wäre.

Die hier beschriebenen Ergebnisse decken sich mit der Annahme, dass die inhibitorische Synaptogenese tatsächlich Ca<sup>2+</sup>-abhängig ist. Die Akkumulation von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren gegenüber GABA-freisetzenden Terminalien geschieht allerdings nur, wenn die einzelnen Terminalien in der Lage sind, lokale postsynaptische Ca<sup>2+</sup>-Transienten zu erzeugen. Wenn man darüber hinaus annimmt, dass eine allgemeine und andauernde [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Erhöhung zu einer Internalisierung des KCC2-Rezeptors führt, womit E<sub>Cl</sub> zu positiveren Werten verschoben würde, so wäre die Bildung von GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten eine der Erklärungen dafür, warum die akute Isolierung von Hirngewebe die Bildung neuer GABAerger Synapsen stimulieren könnte. Trotz alledem bleibt zu beachten, dass die inhibitorische Synaptogenese nur möglich ist, wenn die Neurone in der Lage sind, schnell und ausreichend zu hohe intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen auszugleichen (siehe Abschnitt 3.5.1).

Die Mechanismen der *in situ* Neubildung GABAerger Synapsen sind bislang noch nicht vollständig geklärt. Wie bereits erwähnt, wurde diskutiert, ob GABA-induzierte Depolarisationen oder lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten notwendig sind, um Gephyrin- und  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren am Ort der GABA-Freisetzung zu akkumulieren (Moss & Smart, 2001; Meier & Granytn, 2004). Unter diesen Umständen dürften kontinuierlich depolarisierte Neurone mit ständig erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nicht in der Lage sein, auf GABA-Signale von auswachsenden Axonfortsätzen (*growth cones*) zu reagieren. Eine postsynaptische Differenzierung würde in diesen Fällen fehlschlagen. Tatsächlich konnten in dem beschriebenen Hirnschnittmodell der GABAergen Synaptogenese mehr neugebildete synaptische Terminalien nachgewiesen werden, wenn der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Nervenzellen blockiert war (Meier et al., 2003).

Eine wesentliche Quelle für  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhungen im Gewebe, das hohen Glutamatkonzentrationen ausgesetzt ist, ist die Freisetzung von intrazellulär gespeichertem  $\text{Ca}^{2+}$ . Im hier untersuchten Fall könnten G-Protein-gekoppelte metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe I DAG produzieren, welches  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum freisetzt. Sowohl DAG als auch  $\text{Ca}^{2+}$  sind *second-messenger*-Effektoren, die zu einer Aktivitätszunahme der PKC führen (Schoepp et al., 1999). Diese spielt wiederum eine eminente Rolle in den Vorgängen der inhibitorischen *in situ* Synaptogenese. Die Stimulation der Gruppe I mGluR induziert darüber hinaus neuronale  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen (Flint et al., 1999; Bizon et al., 1999), verstärkt die Neurotransmitterfreisetzung (Schwartz & Alford, 2000) und scheint in einigen Zellpräparaten den neuronalen Zelltod zu verstärken (Strasser et al., 1998; Allen et al., 2001).

#### **4.7 Die chronische Applikation von Gruppe I mGluR-Antagonisten und PDBu beschleunigt die inhibitorische Synaptogenese**

Während die Rolle des KCC2-Rezeptors in der inhibitorischen Synaptogenese noch nicht abschließend geklärt ist (siehe Meier et al., 2002 zur Diskussion), gibt es doch zahlreiche Hinweise dafür, dass anhaltend erhöhte Ruhe- $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nicht zu einer Neubildung von Synapsen beitragen können (Veng et al., 2003). Sowohl die Applikation von L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanallockern

(Meier et al., 2003) als auch, wie hier nachgewiesen, die Blockade der Gruppe I mGluR beschleunigen die Synaptogenese in einem Maß, das über die Zunahme bei alleiniger ACSF-Inkubation hinausgeht. Im Gegensatz dazu hatte die Unterdrückung der AP-Generierung durch TTX keinen signifikanten Effekt auf die Änderung der Synapsenanzahl. In der vorliegenden Studie wurde jedoch gezeigt, dass die Hirnschnittinkubation in ACSF und den hinzugefügten mGluR1/5-Antagonisten AIDA und MPEP die Erholung der intrazellulären Ruhe- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und somit die Neubildung inhibitorischer Synapsen nach dem Schneiden begünstigt. So wie die Generierung von Aktionspotentialen und synaptischen Potentialen ausreichend negative Werte des Ruhemembranpotentials voraussetzt, erfordert die angemessene  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalübertragung ebenfalls niedrige Werte des Ruhe- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Es scheint, dass die Bildung neuer inhibitorischer Synapsen ein Prozess ist, der sich auf die Unversehrtheit dieser beiden Möglichkeiten der interzellulären Kommunikation stützt.

Grundsätzlich wird die Diskrepanz zwischen einer starken präsynaptischen Transmitterfreisetzung und einer postsynaptischen Rezeptorinaktivität, wie sie bezüglich der GABAergen Transmission auch unter mGluR1/5-Aktivierung gesehen wurde, als eine klassische Kondition für ein kompensatorisches Axonwachstum (*sprouting*) angesehen (für eine Übersichtsarbeit siehe van Pelt et al., 1996). Um so widersprüchlicher scheinen dann die aktuellen Ergebnisse, die zeigen, dass nicht die Gruppe I mGluR-Aktivierung sondern deren chronische Blockade zu einer Induktion GABAerger Synapsen geführt hat. Des Weiteren war die inhibitorische Synaptogenese besonders stark ausgeprägt, wenn die Hirnschnitte im PKC-Agonisten PDBu inkubiert wurden und konnte fast vollständig durch Chelerythrin Chlorid, einem PKC-Blocker, verhindert werden. Wenn man nun in Betracht zieht, dass die Hirnschnittinkubation in Gruppe I mGluR-Antagonisten die inhibitorische Synaptogenese in einer Chelerythrin-Chlorid-sensitiven Weise stimuliert, kommt man zu der Schlussfolgerung, dass die Applikation von AIDA und MPEP nicht ausschließlich die Erholung von exzessiv erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ermöglicht, sondern auch eine ausreichende PKC-Aktivität sicherstellt. Die durchgeführten Bestimmungen der PKC-Aktivität unterstützen diese Annahme, da sie eine erhöhte Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen PKC-Isoformen in jenen Hirnschnitten nachwiesen, die in Gruppe I mGluR-Blockern inkubiert wurden. Somit wird die Hypothese gestärkt, dass exzessiv hohe  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Spiegel über einen längeren Zeitraum zu einer intrazellulären PKC-Depletion führen (Durkin et al., 1996, 1997; Tremblay et al., 1999, 2000).

#### 4.7.1 Die Aktivität der für die Synaptogenese essentiellen PKC-Isoformen unterliegt einer $[Ca^{2+}]_i$ -Abhängigkeit und wird durch Gruppe I mGluR-Antagonisten moduliert

Der Proteinkinase C kommt eine Schlüsselrolle bei Vorgängen der Synaptogenese zu (Meier et al., 2003). Sie bestimmt den Phosphorylierungsgrad auswachsender neuronaler Strukturen und reguliert somit nachhaltig die Form der axonalen Wachstumskegel (*growth cones*). In Nervenzellkulturen führte die generelle Blockade von Kinasen und die spezielle Inhibition der PKC zu einer dramatisch verringerten Ausbildung der *growth cones* (Geddis et al., 2003). Für hypothalamische GT1 Neurone wurde nachgewiesen, dass die spezifische Aktivierung der PKC- $\alpha$ -Isoform essentiell für das Auswachsen von Neuriten ist. Das mit EGFP fusionierte PKC- $\alpha$ -Protein konnte mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden hierbei sogar direkt an *growth cones* bzw. Zell-zu-Zell Adhäsionsstellen nachgewiesen werden (Choe et al., 2002). Das Anfertigen der Hirnschnitte geht, trotz ausgewiesener schonender Präparation, zwangsläufig mit regionalen Gewebeischämien einher und ist mit einer glutamatvermittelten Exzitotoxizität verbunden. Beide Umstände wurden mehrfach als Gründe für Aktivitätsänderungen und Translokationen der einzelnen PKC-Isoformen beschrieben. Im Hippokampus führte die Applikation des Phorbolesters PMA beispielsweise zu einer Verschiebung der konventionellen Isoformen PKC- $\alpha$ , - $\gamma$  und - $\varepsilon$  hin zur Zellmembran, wohingegen die Gabe von Glutamat die PKC- $\alpha$  und - $\gamma$  hauptsächlich auf die Zytoskelettfraction verteilte (Buchner et al., 1999). Ähnliche Umverteilungsphänomene und Aktivitätsänderungen in Abhängigkeit von der Ischämiezeit wurden auch in embryonalen Hirnpräparationen der Ratte (E20) nachgewiesen. So bewirkte eine 30-minütige Ischämiezeit eine signifikant reduzierte PKC-Aktivität, die durch folgende Mechanismen erklärt wurde: i) endogene Inhibition, ii) posttranslationale Modifikationen und iii) proteolytische Degradation (Yavin et al., 1995).

Obwohl einer der wichtigsten Aktivierungsfaktoren für die Proteinkinase C und somit auch für die Synaptogenese freies intrazelluläres  $Ca^{2+}$  ist (Kishimoto et al., 1983; Faux, M.C. & J.D. Scott., 1997; Meier et al., 2003; Koponen et al., 2003), können exzessiv erhöhte  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen wiederum zu einer PKC-Inaktivierung führen (Tremblay et al., 2000; Ziemka-Nalecz et al., 2003). Hierbei spielen insbesondere Mechanismen der proteolytischen PKC-Degradation durch  $Ca^{2+}$ -abhängige Calpaine eine wichtige Rolle (Kishimoto et al., 1989; Chakravarthy et al., 1999; Ziemka-Nalecz et al., 2003).

Die Ergebnisse fügen sich gut in die sogenannte „Kalzium-Fixpunkt-Hypothese“ ein, welche ein generelles Prinzip der zellulären Homöostase beschreibt, das um den Gesichtspunkt der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Wachstumsmechanismen erweitert wurde (Tong et al., 1997). Die hier beschriebene chronische Applikation von mGluR1/5-Antagonisten verhinderte somit dramatische postschämische  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Elevationen sowie die konsekutive PKC-Degradation. Statt dessen konnte trotz zerebraler Hypoxie und stark erhöhten Glutamatkonzentrationen eine ausgeglichene intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sichergestellt werden. Diese ermöglichte durch Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen PKC-Isoformen die Ausbildung neuer inhibitorischer Terminalien.

Es ist unbestritten, dass sich die akute Zunahme der Anzahl inhibitorischer Terminalien nicht zwangsläufig in einer ähnlich starken Steigerung der synaptischen Aktivität widerspiegeln muss. Bislang ist es nicht abschließend geklärt, wie viel Zeit es in Anspruch nimmt, eine voll funktionale GABAerge Synapse zu erstellen (für Übersichtsarbeiten siehe Moss & Smart, 2001; Fritschy & Bruning, 2003). Wenn man jedoch die in unmittelbar fixierten sowie die in AIDA/MPEP inkubierten Hirnschnitten nachgewiesene Anzahl an VIAAT-IR-positiven Terminalien in Betracht zieht, so muss geschlussfolgert werden, dass vier von fünf Terminalien innerhalb der 2,5-stündigen Inkubationszeit neu gebildet wurden (siehe Abschnitt 3.4.1). Da die akute Applikation von Gruppe I mGluR-Agonisten zu einer Steigerung der mIPSC-Frequenz führte (siehe Abb. 7.A,B), und im Umkehrschluss mGluR1/5-Antagonisten die Freisetzungswahrscheinlichkeit von GABA reduzierten, so kann folglich eine Zunahme der mIPSC-Aktivität als ein Beweis dafür gewertet werden, dass mit AIDA/MPEP behandelte Hirnschnitte eine größere Anzahl tatsächlich aktiver Terminalien beinhalten. Die gemessene Erhöhung der mIPSC-Frequenz in AIDA/MPEP inkubierten Schnitten war ca. dreimal höher als in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 14.A,B). Somit bildeten einige aber nicht alle der neu dazu gewonnenen Terminalien funktionale Synapsen.

Die Tendenz zu einer niedrigeren durchschnittlichen mIPSC-Amplitude mag einerseits wiederum mit einer höheren PKC-Aktivität in chronisch AIDA/MPEP behandelten Schnitten erklärt werden, kann andererseits aber auch als Hinweis für die Notwendigkeit eines längeren Bildungszeitraums bis zur Erlangung voller synaptischer Reife gewertet werden.

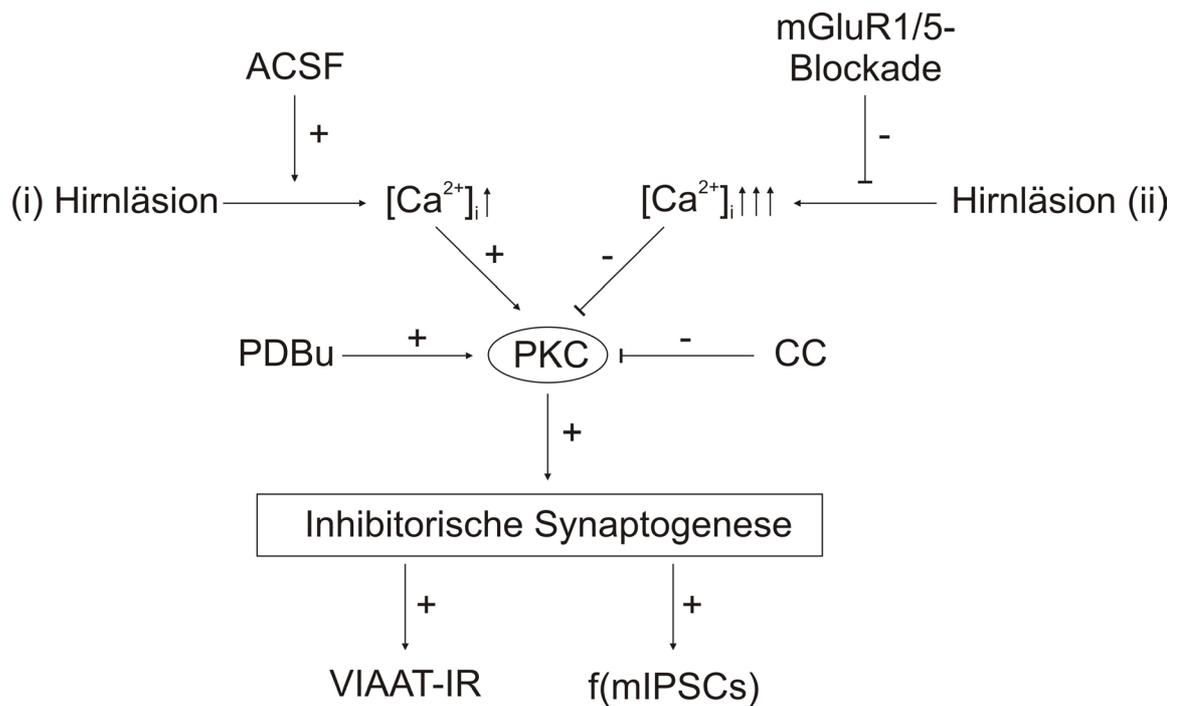


Abbildung 15: Vereinfachte schematische Darstellung der Wirkung verschiedener Effektoren auf die reaktive *in situ* Synaptogenese im sCS. Die Inkubationsbedingung (i) illustriert die partielle Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger PKC-Isoformen während einer 2,5-stündigen Inkubation in ACSF nach dem Schneiden des Hirngewebes. In (ii) kommt es durch chronische Blockade der Gruppe I mGluR zu einer PKC-Disinhibition durch Verhinderung hoher  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Somit können Hirnschnitte des oberflächlichen *Colliculus superior* von P0/P1-Mäusen als ein sehr nützliches Präparat angesehen werden, welches es ermöglicht, die funktionelle Leistungsfähigkeit neu gebildeter unreifer Synapsen zu charakterisieren. Dies gilt insbesondere im Vergleich mit Präparaten von älteren Tieren, wo die Synapsenneubildung vermutlich schwächer ausgeprägt ist. Die beschriebenen Experimente führen zu der Schlussfolgerung, dass der Verlust von Neuronen, die Zerstörung von neuronalen Afferenzen und / oder eine Axotomie die sich erholenden GABAergen Nervenzellen dahingehend stimuliert, neue zusätzliche inhibitorische Terminalien auszubilden. Innerhalb von zwei bis drei Stunden erreichen diese Terminalien ein gewisses Maß an Funktionalität, darunter die Fähigkeit GABA freizusetzen und postsynaptische Ströme zu induzieren. Es ist zu klären, ob dieser Prozess der synaptischen Aufregulation im unreifen Gehirn als ein protektiver oder möglicherweise gefährlicher Mechanismus anzusehen ist. Trotzdem bleibt es unbestritten, dass die 2,5-stündige Applikation von Antagonisten der Gruppe I mGluR, unter anderem durch die beschleunigte Normalisierung

der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ruhekonzentrationen, diese Form der inhibitorischen Synaptogenese verstärkt. Auch durch die chronische Zufuhr von mGluR1/5-Blockern zu neuronalen Kulturen wird das GABA/Glutamat-Verhältnis zugunsten inhibitorischer Terminalien verschoben (Schmidt S., bislang unveröffentlichte Daten). Zusammengefasst unterstreichen diese Ergebnisse die lange unterschätzte Rolle der mGluR1/5 in der Ausbildung des inhibitorischen Netzwerkes im unreifen Gehirn.