

# 1. Einleitung

## 1.1 Das GABAerge Neurotransmittersystem

Neben anderen Transmittern kontrolliert  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) die neuronale Aktivität im zentralen Nervensystem (ZNS). GABA gilt als der wichtigste inhibitorische Transmitter im adulten ZNS (Cherubini und Conti, 2001).

GABA wird in der präsynaptischen Zelle unter Katalyse der Glutamat-Decarboxylase (GAD) aus Glutamat synthetisiert, was insofern bemerkenswert ist, als aus dem wichtigsten erregenden Neurotransmitter der wichtigste hemmende Transmitter gebildet wird. GAD existiert in zwei Isoformen, GAD67 und GAD65. Beide Isoformen unterscheiden sich in ihrer intraneuralen Verteilung: GAD67 ist ubiquitär verteilt, wogegen GAD65 primär in den präsynaptischen Terminalien vorkommt. Zudem wurde gezeigt, dass GAD67 in größerer Menge als aktive holoenzymatische Form vorliegt, als GAD65 (Kaufman et al., 1991; Soghomonian et al., 1998). GABA wird in synaptischen Vesikeln gespeichert und über einen Aktionspotential-getriggerten Kalziumeinstrom, durch präsynaptische spannungsaktivierte Kalziumkanäle (VACC), in den synaptischen Spalt freigesetzt. Dort bindet es an GABA-Rezeptoren (GABAR) und wird durch Diffusion und enzymatischen Abbau, oder durch Reabsorption mittels membranständiger GABA-Transporter aus dem synaptischen Spalt entfernt. Präsynaptisch freigesetztes GABA kann sowohl an prä-, als auch an postsynaptisch lokalisierte GABAR binden.

Die zur Zeit allgemein anerkannte Klassifizierung der GABAR unterscheidet GABA<sub>A</sub>-, GABA<sub>B</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren, wobei die Zusammensetzung der Untereinheiten die Eigenschaften der Rezeptorkomplexe bestimmt.

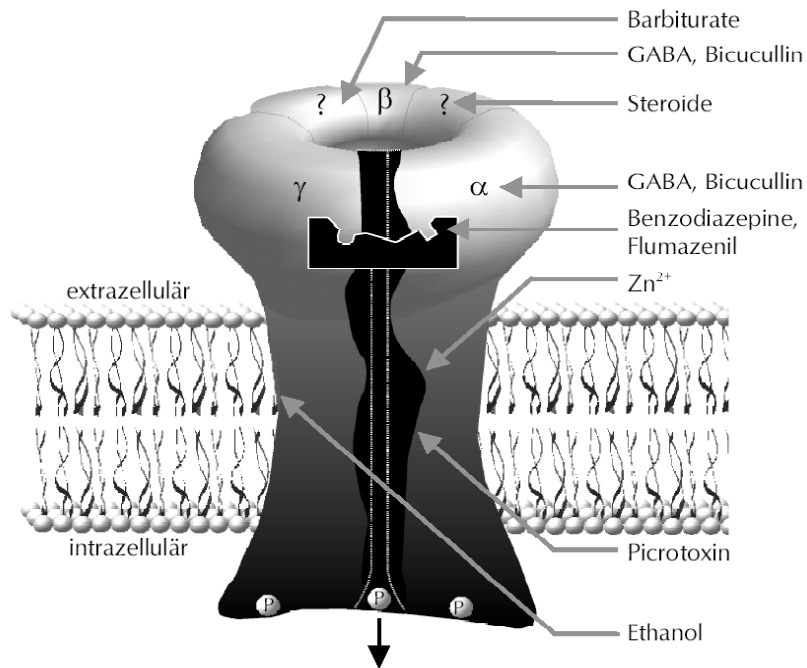
GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle und werden als ionotrop bezeichnet. GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und werden als metabotrop bezeichnet.

GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren liegen in Neuronen als zwei Rezeptorisoforme vor, GABA-B R1 und GABA-B R2, die als Heterodimere miteinander assoziiert sind (Marshall et al., 1999) und über die Stimulation von GTP-bindenden Proteinen Kalium- und

Kalziumkanäle regulieren, indem sie die Kaliumleitfähigkeit erhöhen, die Kalziumleitfähigkeit verringern und so ihre inhibitorische Wirkung vermitteln (Kuriyama et al., 2000). Sie können pharmakologisch von den ionotropen GABAR unterschieden werden. Baclofen ist, als zentral wirkendes Muskelrelaxans, ein klassischer Agonist am GABA<sub>B</sub>-Rezeptor.

GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle. Wird GABA gebunden, öffnet sich der aus fünf Proteinuntereinheiten aufgebaute Ionenkanal und die Leitfähigkeit für Chloridionen (Cl<sup>-</sup>) und Bicarbonationen (HCO<sup>3-</sup>) steigt. Das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Chloridkonzentration bestimmt, ob es zu einem Chlorideinstrom und damit zur Hyperpolarisation, oder zum Chloridausstrom und damit zur Depolarisation kommt. Liegt ein im Vergleich zum Ruhemembranpotential negatives Gleichgewichtspotential für Chlorid vor, strömt Chlorid ein, und die Zelle wird hyperpolarisiert. Davon unabhängig können durch die Verringerung des Membranwiderstands distale, exzitatorische Synapsen „kurzgeschlossen“ und damit unterdrückt werden (*Shunt*-Inhibition). Im adulten ZNS tragen sowohl die Hyperpolarisation als auch die Shunt – Inhibition zur schnellen inhibitorischen synaptischen Transmission bei.

GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind pentamere Komplexe, wobei eine grosse Zahl von Untereinheitskombination möglich ist ( $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-4,  $\gamma$ 1-4,  $\delta$ ,  $\rho$ 1-3,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ). Meistens bestehen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren entweder aus zwei  $\alpha$ , zwei  $\beta$  und einer  $\gamma$ , oder aus zwei  $\alpha$ , einer  $\beta$  und zwei  $\gamma$  Untereinheiten (Metha und Ticku, 1999). Die  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2 Kombination repräsentiert die größte GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren Population, gefolgt von  $\alpha$ 2 $\beta$ 3 $\gamma$ 2 und  $\alpha$ 3 $\beta$ 3 $\gamma$ 2. Bestimmte Neuronenklassen weisen eine phänotypspezifische Zusammensetzung der GABA<sub>A</sub>R auf. Die  $\alpha$ 6-Untereinheit, zum Beispiel, kommt nur in Körnerzellen des Kleinhirns vor. Die meisten Neuronentypen jedoch enthalten, GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit unterschiedlichen Untereinheitskombinationen (Fritschy et al., 2003). GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind Zielort der Wirkung häufig verwendeter Medikamente, wie z.B. Benzodiazepine, Propofol, Etomidat und volatile Anästhetika. Sie wirken agonistisch am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor. Ein spezifischer Antagonist an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren ist Bicucullin.



**Abb. 1:** Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor besteht aus fünf Glykoprotein-Untereinheiten. Zusammengelagert bilden sie eine zentrale Pore, die sich bei Aktivierung des Kanals für Cl<sup>-</sup>-Ionen öffnet. Für GABA und andere Rezeptormodulatoren wurde, sofern bekannt, die jeweilige Bindungsstelle zugeordnet. (P: Phosphorylierungsstelle; Abb. modifiziert nach Upton, 1994.)

GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren zeichnen sich durch den Einbau von ρ1 und ρ2 Untereinheiten aus. GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren wurden zuerst in der Retina entdeckt und an isolierten Netzhautpräparaten ausführlich charakterisiert (Matthews et al., 1994; Enz et al., 1995; Matsui et al., 2001; (Übersicht: Lukasiewicz et al., 2004)). Ihre pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden sich von denen der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren sind Bicucullin- und Baclofen-insensitiv. Ein spezifischer Agonist an GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren ist cis-4-aminocrotonsäure (CACA), ein spezifischer Antagonist ist (1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl) methylphosphinsäure (TPMPA).

Etwa ein Drittel aller Synapsen im Säugetiergehirn ist GABAerg (Bloom und Iversen., 1971). Die meisten GABAergen Neurone sind inhibitorische Interneurone, d.h. Neurone mit kurzem Axon und lokaler Verschaltung. In der CA-1 Region des Hippocampus haben diese Interneurone zwar nur einen Anteil von <10% an der Gesamtzahl der Neurone, besitzen wegen ihrer divergenten Verschaltung jedoch einen großen inhibitorischen Einfluss auf die Aktivität dieser Region (Freund et al., 1996).

Das GABAerge Neurotransmittersystem spielt eine Rolle bei der Netzwerksynchronisierung, der Regulation des Schlafs (Turek et al., 1986), bei der

medikamentös induzierten Hypnose (Rudolph und Antkowiak, 2004), sowie allgemein bei der Limitierung der neuronalen Exzitation. Bei bestimmten Epilepsieformen (Ben-Ari und Holmes, 2005), bei Angststörungen (Crestani et al., 1999), sowie Lern- und Gedächtnisstörungen (Mody, 2005) können Abnormalitäten des GABA-Systems die Ursache sein. Auch im nozizeptiven System scheint GABA eine Rolle als modulierender Transmitter zu spielen (Jasmin et al. 2003).

## 1.2 GABAerge synaptische Transmission im *Colliculus superior*

Der *Colliculus superior* im *Tectum opticum* (TO) der Säugetiere stellt die zentrale Einheit eines Systems dar, dessen Hauptaufgabe die Hinwendung sensorischer Organe auf neue und relevante Reize in der Umwelt ist (Übersicht: Grantyn et al., 2004). Unter funktionalen Gesichtspunkten wird der CS als zweiteilige laminäre Struktur gesehen. Die oberflächlichen Schichten umfassen das *Stratum zonale*, *Stratum griseum superficiale* (SGS) und *Stratum opticum* (SO<sub>p</sub>) und verarbeiten ausschließlich visuelle Informationen. Die retinalen Afferenzen stellen einen Großteil der Eingänge der auch als visueller CS bezeichneten oberflächlichen Schichten dar. In ausgewachsenen Ratten und Mäusen handelt es sich hierbei hauptsächlich um die Axone kontralateraler retinaler Ganglienzellen (RGZ). Der Anteil ipsilateraler Axone liegt bei 3-5%. Weitere Afferenzen des CS stammen aus der Großhirnrinde und werden von den Pyramidenzellen der fünften Schicht des visuellen Kortex (Area striata [17] und extrastriata [18]) gebildet. Der Neurotransmitter dieser Afferenzen ist Glutamat (Grantyn et al., 2004).

Die oberflächlichen Schichten zeigen eine retinotopie Gliederung, wobei die fovealen Anteile der Retina in das anterolaterale Drittel der Colliculi und die peripheren Anteile in die posterolateralen zwei Drittel projizieren. Darüber hinaus terminieren im visuellen CS cholinerge Projektionsneurone aus dem kontralateralen *Nucleus parabigeminalis* (Binns, 1999) und NADPH-positive Neurone aus dem *Nucleus geniculatus lateralis ventralis*. Umgekehrt endet ein Teil der Axone von Projektionszellen des visuellen CS im *Nucleus parabigeminalis*.

Die tieferliegenden Schichten des CS, bestehend aus *Stratum griseum intermedium*, *Stratum medullare medium*, *Stratum griseum profundum* und *Stratum medullare profundum* zeichnen, sich durch einen multimodalen Input aus, der im einzelnen aus

taktilen, auditorischen, visuellen, thermalen und nozizeptiven Impulsen besteht. Motorische Signale aus dem *Cerebellum*, der *Formatio reticularis* und der *Substantia nigra* erreichen den CS ebenfalls in Form der sogenannten Efferenzkopie.

Im SGS der oberflächlichen Schichten liegen Neurone in hoher Dichte. Aufgrund ihrer Morphologie können sie in sechs Klassen unterteilt werden: Marginalzellen, Sternzellen, Horizontalzellen, multipolare Zellen, sowie Vertikalzellen mit weitem und schmalem Dendritenfeld (Isa und Saito, 2001; Edwards, 2002). Von diesen sind Sternzellen, Horizontalzellen und die sogenannten piriformen Zellen, die eine Subpopulation der Vertikalzellen darstellen, GABAerge inhibitorische Interneurone, die in großer Anzahl GABAerge Synapsen bilden (Mize, 1992). Die hier vorliegenden GABAergen Synapsen wurden bereits in einer Reihe von Untersuchungen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen, sowohl in Kultur (Warton et al., 1990, Kraszewski und Grantyn, 1992) als auch in Schnittpräparationen (Jüttner et al., 2001; Clark et al.; 2001, Edwards et al., 2002, Henneberger et al., 2002; Meier et al., 2003; Kirischuk et al., 2005), studiert.

Eine Besonderheit des CS der Säugetiere ist das Vorhandensein großer Mengen an GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren. Es wurde gezeigt, dass funktionelle GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren der somato-dendritischen Membran extrasynaptisch lokalisiert sind. Präsynaptisch lokalisierte GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren werden von endogenem GABA aktiviert und vermitteln eine abrupte Verminderung der Effizienz der synaptischen Übertragung (short-term depression) (Kirischuk et al., 2003).

Die Daten der vorliegenden Arbeit wurden an Mäusen erhoben. Die Entwicklung des visuellen Systems verläuft bei Mäusen und Ratten in ähnlicher Weise, wobei in der zweiten Hälfte der embryonalen Entwicklung die Maus der Ratte um einen Tag voraus ist. Die Schwangerschaft dauert bei Mäusen üblicherweise 19 Tage, das Öffnen der Augen erfolgt in der Regel am postnatalen Tag (P) 13.

Nicht unerwartet weisen bereits am embryonalen Tag (E) 19 44% der CS-Neurone elektrisch evozierte GABAerge postsynaptische Ströme (eIPSC) auf. Immunhistochemische Färbungen zeigten im gleichen Alter, dass der Anteil der GABAergen Synapsen an der Gesamtzahl synaptischer Kontakte bei etwa 75% liegt (Meier et al., 2003). Kurz nach der Geburt zeichnen sich GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelte Ströme durch ihre lange Halbwertszeit bei stabiler Amplitude, niedriger  $\alpha 1$ - und hoher  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$ -Expression aus (Jüttner et al., 2001). In Hirnschnitten von 3–4 Wochen alten

Ratten sind bereits in fast allen getesteten Neuronen GABAerge – zumeist GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelt - Eingänge festzustellen (Edwards et al., 2002).

Der visuelle CS ist demnach eine Struktur mit der höchsten Konzentration an GABA und bereits zum Zeitpunkt der Geburt reich an GABAergen Neuronen. Er eignet sich deshalb hervorragend zum Studium der entwicklungsabhängigen Modulation GABAerger Neurone und der GABAergen synaptischen Transmission (Okada, 1992).

### 1.3 GABA als trophischer Faktor der Gehirnentwicklung

GABA spielt auch eine wichtige Rolle bei der prä- und postnatalen Entwicklung des Gehirns. Sowohl ontogenetisch als auch phylogenetisch manifestiert sich das GABAerge System als eines der ersten Neurotransmittersysteme im Gehirn von Säugetieren. Darüber hinaus gehören GABAerge Neurone zu den sich am frühesten entwickelnden Neuronenpopulationen im zentralen Nervensystem überhaupt. Da GABA noch vor der Synaptogenese synthetisiert wird, kann vermutet werden, dass GABA ein Differenzierungssignal für embryonale Neurone ist.

Ein wesentliches Merkmal des unreifen ZNS ist, dass während der Frühphase der Entwicklung der Anteil der glutamatergen Synapsen an der erregenden synaptischen Transmission gering ist. Dafür existieren erregende GABAerge Synapsen, d.h., unreife Neurone werden von dem Neurotransmitter GABA depolarisiert und zeigen eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$ , wenn ionotrope GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren aktiviert werden (Cherubini et al., 1991). Diese Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  über VACC stimuliert dann neuronale Reifungsprozesse, über eine Verstärkung der Genexpression (Bading et al., 1993), des neuronalen Wachstums und der neuronalen Differenzierung (Ben Ari et al. 1997; Marty et al. 1996; LoTurco et al., 1995).

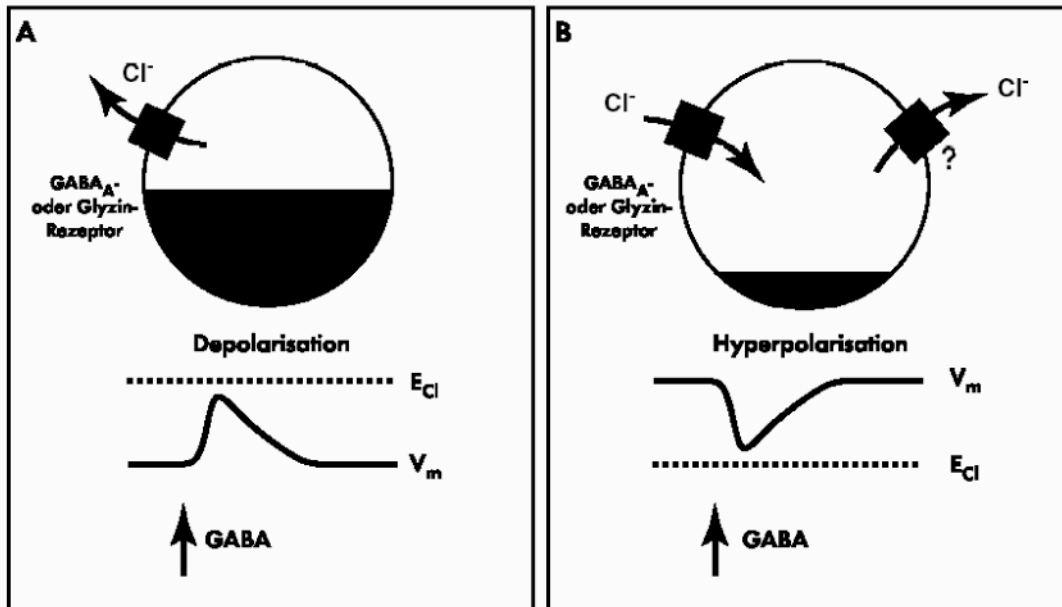
Trotz einer beträchtlichen Zunahme an Informationen, die diese anscheinend paradoxe Eigenschaft der GABAergen Übertragung betreffen, gibt es bisher noch keine genauen Erkenntnisse über den exakten zeitlichen Ablauf der Veränderung des GABA-Antwortverhaltens in irgendeinem Zelltyp. Bisherige Arbeiten zu diesem Thema erfassten entweder nur ein limitiertes Intervall dieser Übergangsphase (Wu et al., 1992) oder sie wurden an kultivierten Neuronen durchgeführt (z. B. (Wang et al., 1994)), d.h. an Präparaten, die keine zuverlässige Korrelation zur postnatalen Gehirnentwicklung *in vivo* zulassen.

Als *in vivo* nahes Modell der neuronalen Entwicklung haben sich akute Gewebeschnitte des Gehirns der Ratte und der Maus etabliert. In der hier vorliegenden Arbeit wurden das Entwicklungsprofil und der Mechanismus GABA-vermittelter Kalziumsignalgebung in visuell identifizierten Neuronen in Gewebeschnitten des *Colliculus superior* untersucht.

#### **1.4 Entwicklung der GABAergen Neurotransmission – die Rolle der Ionentransporter**

Voraussetzung für die depolarisierende Wirkung von GABA ist ein im Vergleich zum Ruhemembranpotential des Neurons positives Gleichgewichtspotential für  $\text{Cl}^-$ . Die ontogenetische Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration  $[\text{Cl}^-]_i$  wird maßgeblich von zwei Chloridtransporterproteinen geleistet: der Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter NKCC1 (NKCC1) und der Kalium-Chlorid-Kotransporter KCC2 (KCC2). Der zelleinwärts gerichtete NKCC1 leistet eine aktive intrazelluläre Chloridakkumulation ( Sun und Murali, 1999; Yamada et al., 2004 ). NKCC1 kommt außer in Neuronen auch in Oligodendrozyten und in Zellen des Plexus choroideus vor (Plotkin et al., 1997; Wang et al., 2003). KCC2 ist die neuron-spezifische Isoform innerhalb einer Familie elektroneutraler Kalium-Chlorid-Kotransporter (KCC1 – KCC4)(Li et al., 2002). KCC2 nutzt den zellauswärts gerichteten Kaliumkonzentrationsgradienten, um  $\text{Cl}^-$  gegen den elektrochemischen Gradienten zellauswärts zu transportieren und die  $[\text{Cl}^-]_i$  auf Werte unterhalb des elektrochemischen Gleichgewichtspotentials zu setzen. In der Entwicklung werden beide Transportproteine gegensinnig reguliert. Die Expression von NKCC1 ist zum Zeitpunkt der Geburt hoch und nimmt im Verlauf der Entwicklung ab (Hübner et al., 2001a). Die Expression von KCC2 ist zum Zeitpunkt der Geburt niedrig und nimmt im Laufe der postnatalen Entwicklung zu (Lu et al., 1999). Die Aufregulation der KCC2-Expression und die Abregulation der NKCC1-Expression sind vereinbar mit der beobachteten Abnahme der  $[\text{Cl}^-]_i$  während der postnatalen Entwicklung. Diese Änderung des Chloridgradienten ist verantwortlich für die Veränderung der Richtung GABAerger Ströme im Laufe der postnatalen Hirnentwicklung.

Es wurde gezeigt, dass die chronische Blockade von  $\text{GABA}_A\text{R}$  den entwicklungsabhängigen Wechsel im Umkehrpotential der GABA-induzierten Ströme ( $E_{\text{GABA}}$ ) verzögert (Ganguly et al., 2001).



**Abb. 2:** (A) Zu Beginn der Entwicklung ist das Gleichgewichtspotential von Chlorid ( $E_{Cl}$ ) positiv relativ zum Ruhemembranpotential ( $V_m$ ). Das Öffnen von Chloridkanälen durch GABA oder Glyzin depolarisiert die Zelle. (B) Entwicklungsabhängig wird KCC2 aufreguliert, und Chlorid wird aus der Zelle transportiert. Dadurch verschiebt sich  $E_{Cl}$  so, dass es negativ relativ zum  $V_m$  ist. Die Voraussetzung für eine hyperpolarisierende GABA-Wirkung ist somit gegeben. (Nach Miles, 1999).

Deshalb wurde postuliert, dass GABA selbst, über die Regulation der KCC2-Expression, die Veränderung der GABAergen Wirkung von Depolarisation zu Hyperpolarisation fördert. Diese originelle Hypothese, schließt ein, dass die depolarisierende GABA-Wirkung durch eine Art entwicklungsabhängigen Rückkopplungsmechanismus terminiert wird. In der Tat wurde gezeigt, dass sowohl die Verschiebung von  $E_{(GABA)}$  zu negativeren Werten (Titz et al., 2003), als auch die Steigerung der Expression von KCC2 (Ludwig et al., 2003) in Neuronenkulturen unter chronischer  $GABA_A$ -Blockade stattfindet.

Dennoch kann man von einer engen Korrelation zwischen der Expression der Kationen-Chlorid-Transporter und der  $[Cl]_i$ , bzw. der Richtung GABAerger Chloridströme ausgehen. Rivera und Mitarbeiter (1999) haben an kultivierten hippokampalen Neuronen gezeigt, dass sich durch Inkubation mit KCC2-Antisense-RNA, die intraneuronale Chloridkonzentration erhöht. Dies resultierte in einem nahezu kompletten Verschwinden des negativen (hyperpolarisierenden) Gleichgewichtspotentials für  $GABA_A$ -vermittelte Ströme.

Noch kontrovers wird die Frage diskutiert, ob allein die Expression, also das Vorhandensein von KCC2, oder auch die Lokalisation und Funktionalität des



Transporterproteins eine Rolle in der entwicklungsabhängigen Regulation der  $[Cl^-]_i$  spielt. In Kortexneuronen wurde gezeigt, dass die entwicklungsabhängige Verschiebung von E(GABA) primär durch die Aufregulation der KCC2-Expression verursacht wird (Stein et al., 2004). In anderen Hirnregionen scheint die entwicklungsabhängige Regulation der KCC2-Aktivität primär durch posttranslationale Mechanismen (Kelsch et al., 2001, Vale et al., 2003) und/oder durch subzelluläre Translokation (Balakrishnan et al., 2003) reguliert zu werden. Ein Ziel dieser Studie war es sowohl die Expression der K-Cl-Kotransporterproteine als auch deren Lokalisation in Neuronen zu untersuchen. Als potentielle Regulatoren der KCC2-Expression und -Funktion sind Tyrosin-Kinase-Rezeptoragonisten beschrieben worden, wie beispielweise Insulin-Like Growth Factor (IGF) oder Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)(Kelsch et al., 2001, Aguado et al., 2003).

## **1.5 Die Funktion von Brain-Derived Neurotrophic Factor ( BDNF )**

Neurotrophinen wird generell eine große Bedeutung für die Steuerung der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems zugeschrieben. Sie sind notwendig für das Überleben und die Differenzierung von Nervenzellen. Neurotrophine stellen eine Klasse diffundibler Neuropeptide dar, deren Prototyp NGF (Nerve Growth Factor) bereits in den fünfziger Jahren des vorigen Jahrhunderts entdeckt wurde (Levi-Montalcini et al., 1954). Die Familie der Neurotrophine enthält neben NGF und BDNF noch NT-3 (neurotrophin-3), NT-4/5 (neurotrophin-4/5), NT-6 (neurotrophin-6) und NT-7 (neurotrophin-7).

BDNF wird, wie andere Neurotrophine auch, zuerst als Zwischenprodukt (proBDNF) synthetisiert und durch Proteolyse in die reife Form (mBDNF) umgewandelt. BDNF bindet an zwei verschiedene Rezeptortypen (Thoenen, 1995). Der erste Typus, die Trk-Rezeptoren, repräsentiert „klassische“ Rezeptor-Tyrosinkinasen, die wahrscheinlich für alle überlebens- und wachstumsfördernden Wirkungen der Neurotrophine verantwortlich sind. Dabei werden Signalkaskaden ausgelöst, welche die Gentranskription und zelluläre Proteinsynthese beeinflussen (Li et al., 1998). Unter den Trk-Rezeptoren, die spezifisch an die verschiedenen Neurotrophine binden, ist TrkB der Rezeptor für mBDNF. Vom TrkB-Rezeptor sind zusätzlich zum vollständigen Rezeptor

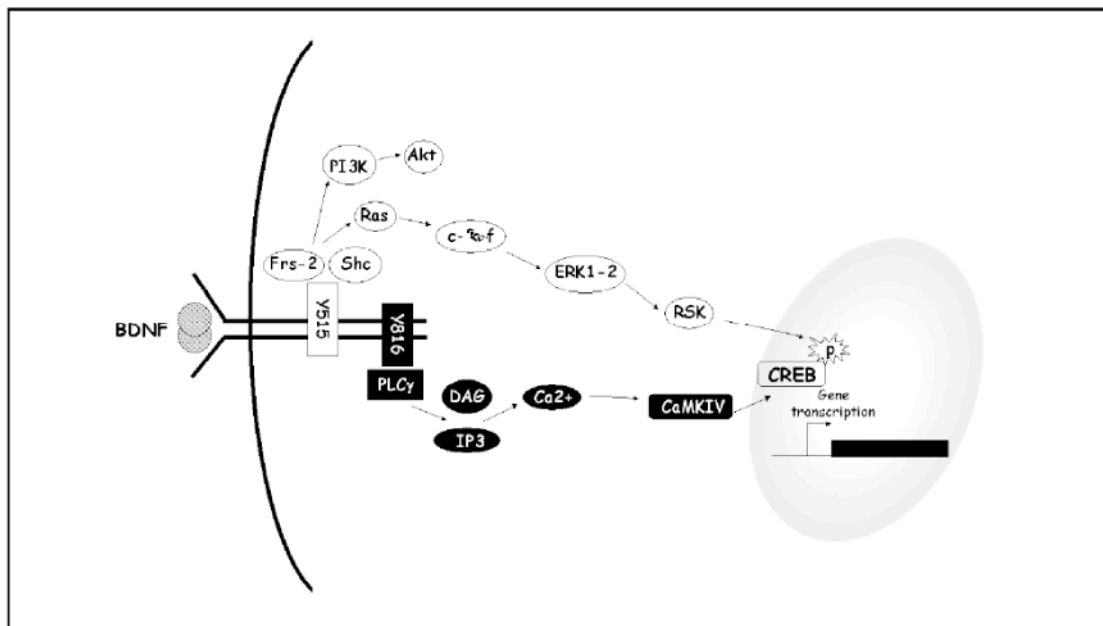
TrkB.FL eine ganze Reihe von Rezeptorenvarianten mit verkürzten intrazellulären Domänen (u.a. TrkB.T1) bekannt (Barbacid, 1994; Haapasalo et al., 2002).

Der p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor (p75<sup>NTR</sup>) stellt den zweiten Typus von Neurotrophin-Rezeptoren dar. p75<sup>NTR</sup> gehört zur Superfamilie der Tumor-Nekrose-Faktoren und bindet alle Pro-Neurotrophine, also auch proBDNF mit hoher Affinität, die allerdings geringer ist als die der spezifischen Trk-Rezeptoren (Barbacid, 1995). Eine Anzahl neuer Arbeiten zeigen, dass Pro-Neurotrophine, nach Binden an p75<sup>NTR</sup> im peripheren Nervensystem Apoptose auslösen (Lee et al., 2001; Beattie et al., 2002; Nykjaer et al., 2004; Teng et al., 2005). Das steht in deutlichem Gegensatz zur Wirkung der reifen Neurotrophine, welche eine antiapoptotische und differenzierende Wirkung haben.

Viele Neurone besitzen Bindungsstellen beider Rezeptorklassen (Trk und p75<sup>NTR</sup>), sodass gefolgert wird, dass Pro-Neurotrophine und reife Neurotrophine über unterschiedliche Signalkaskaden gegensätzliche Signalantworten auslösen können. Obwohl vor allem die Trk-Rezeptoren für die Vermittlung der Neurotrophineffekte verantwortlich sind, erleichtert p75<sup>NTR</sup> die Bindung der Liganden an die Trk-Rezeptoren und kann die intrazelluläre Signaltransduktion unabhängig von Trk initiieren (Chao und Hempstead, 1995). So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Blockierung der NGF-Bindung an p75<sup>NTR</sup> aber nicht an TrkA die hochaffine Bindung von NGF an TrkA reduziert (Weskamp und Reichardt, 1991). Zum Überleben sensorischer Neurone von transgenen Mäusen ohne p75<sup>NTR</sup> muss die Konzentration an NGF erhöht werden (Davies et al., 1993).

Die intrazelluläre Signaltransduktion verläuft ähnlich wie bei anderen Tyrosinkinase-Reaktionen. Die Bindung von BDNF (bzw. auch der anderen Mitglieder der Neurotrophinfamilie) an seinen Trk-Rezeptor führt als erstes zur Trk-Dimerisierung und Aktivierung der Tyrosinkinase-Aktivität. Durch die ligandenvermittelte Aggregation der Rezeptoren kommt es zur Autophosphorylierung intrazellulärer Domänen, die eine Aktivierung von Signalmolekülen – wie der Phospholipase C (PLC- $\gamma$ ), der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und des Adapterproteins Shc (SH-2 enthaltendes Protein) – zur Folge haben. Die weitere Signalkaskade (vor allem die ras-abhängige MAP-Kinase-Kaskade) beeinflusst letztendlich die zelluläre Gentranskription und Proteinsynthese (Greene und Kaplan, 1995). Während dieser Mechanismus der Neurotrophinwirkung Stunden bis Tage andauert, sind auch Neurotrophin-Wirkungen bekannt, die innerhalb von Minuten auftreten und nur kurz anhalten. Es ist anzunehmen, dass es in diesem Falle nicht zu Änderungen in der Genexpression

zustande kommt (Thoenen, 1995; Henneberger et al., 2002). Diese Veränderungen betreffen sowohl morphologische als auch physiologische Eigenschaften von Neuronen (McAllister, 1999).



**Abb. 3:** Intrazelluläre Signalkaskade nach TrkB-Aktivierung durch BDNF (modifiziert nach Greene et al., 1995)

Der schnelle PLC- $\gamma$ -vermittelte Anstieg von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP3) und die damit verbundene Steigerung der  $[Ca^{2+}]_i$  wird als wahrscheinlicher Signalweg angenommen. Damit sind die Voraussetzungen für die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) wie auch  $Ca^{2+}$ -calmodulinregulierter Kinasen und Phosphatasen gegeben (Huang und Reichardt, 2001).

Zusätzlich zu diesem Konzept wurde eine weitere, ultraschnelle Wirkung nach Aktivierung vollständiger TrkR beschrieben, die Neurotrophinen erstmals ähnliche funktionelle Eigenschaften wie konventionellen erregenden Transmittern zuweist (Kafitz et al. 1999). Für diesen überraschenden Effekt wird als mögliche Ursache eine direkte und damit schnelle Interaktion des TrkB-Rezeptors mit dem Natriumkanal Na(V)1.9. diskutiert (Blum et al., 2002).

BDNF ist sowohl im ZNS als auch im peripheren Nervensystem (PNS) in Regionen der Neurogenese und Differenzierung anzutreffen. Obwohl schon in sehr frühen Entwicklungsstadien vorhanden, treten die höchsten Konzentrationen an BDNF – im Gegensatz zu NT-3 – erst postnatal auf (Das et al., 2001). Auch im adulten Hirn ist BDNF noch weit verbreitet, die höchste Expression wurde im Hippokampus beobachtet.

Im Gegensatz zu Neurotransmittern werden Peptide und Proteine zur regulierten Sekretion in *Large Dense Core Vesicles* (LDCV, auch sekretorische Granula genannt) verpackt. Neuropeptide werden ähnlich wie Neurotransmitter  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig aus sekundären Zellen freigesetzt (Lang et al., 1997).

Umstritten ist die Herkunft des Kalziums, das die Ausschüttung der Neurotrophine induziert. Für eine Abhängigkeit der Freisetzung von BDNF von Kalzium aus intrazellulären Speichern plädieren Griesbeck und Kollegen (Canossa et al., 1997; Griesbeck et al., 1999), während unter anderen Gegebenheiten eine Abhängigkeit vom extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  gezeigt werden konnte (Goodman et al., 1996). Vermutlich ist das jeweilige Ergebnis abhängig vom Füllzustand der intrazellulären Speicher. Sind diese durch hohe Aktivität in den neuronalen Netzwerken geleert, so muss extrazelluläres Kalzium in die Zellen einströmen, um eine Neurotrophinausschüttung zu bewirken.

Als schwierig erweist sich die eindeutige Beantwortung der Frage, ob BDNF prä- oder postsynaptisch (d.h. axonal oder somatodendritisch) lokalisiert ist. Die Überexpression eines BDNF-GFP Fusionsproteins (BDNF::EGFP) durch Haubensak und Kollegen (1998) führte nicht zu eindeutigen Ergebnissen. BDNF::EGFP fand sich zwar in den sekretorischen Granula der Dendriten, war aber vereinzelt auch in Axonen zu finden. Sehr interessant im Hinblick auf die Modulation der synaptischen Plastizität war jedoch die synaptische Ansammlung des BDNF-Fusionsproteins (Haubensak et al., 1998). Diese Ergebnisse wurden drei Jahre später von Kojima et al. (2001) und Kohara et al. (2001) bestätigt. Die Arbeitsgruppe von Kojima und Kollegen konnte zusätzlich noch eine Ausschüttung ihres BDNF-GFP Fusionsproteins nach Stimulation zeigen. Sie blieben jedoch eine genauere Charakterisierung dieser Freisetzung schuldig (Kojima et al., 2001). Damit bleibt die postsynaptische Lokalisation und Ausschüttung von BDNF umstritten. Ein gegenteiliger Bericht deutet auf die axonale Freisetzung eines BDNF::EGFP an (Kohara et al., 2001). Es könnte jedoch sehr wohl so sein, dass BDNF gerade wegen der so unterschiedlichen Funktionen, z.B. während der Entwicklung je nach Zellkontext, auf unterschiedliche Weise sekretiert wird.

BDNF-TrkB-vermittelte Signale erscheinen als wichtiges Verbindungsglied zwischen der neuronalen Aktivität und der Regulation der Proteinexpression im Zusammenhang mit Plastizitätsphänomenen wie der Langzeitpotenzierung (LTP) und der Epileptogenese (Thoenen, 1995; Binder et al., 1999; Lu und Chow, 1999; Lu und Gottschalk, 2000; Woo et al., 2005). Langzeitbehandlung colliculärer Neuronenkulturen mit BDNF zeigte sowohl prä- als auch postsynaptische Effekte. In Abhängigkeit von der

präsynaptischen Aktivität kommt es bei niedriger präsynaptischer Aktivität zur postsynaptischen Depression, die aber bei hoher Entladungsrate durch eine Verstärkung der asynchronen Freisetzung kompensiert wird (Henneberger et al., 2005).

Nach Hirnverletzungen ist die Expression sowohl von BDNF als auch von seinem hochaffinen Rezeptor (TrkB) in den betroffenen Gebieten erhöht. So konnte gezeigt werden, dass im Hippokampus der Ratte nach künstlich induzierten Krämpfen (kindling) und im Gyrus dentatus nach zerebraler Ischämie bzw. hypoglykämischem Koma TrkB-mRNA und -Protein vermehrt vorkommen (Merlio et al., 1993) und zwar zeitgleich mit der Erhöhung von BDNF-mRNA. Umgekehrt zeigt sich nach lokaler Applikation von BDNF nach fokaler ischämischer Hirnläsion eine reduzierte reaktive Astroglie und ein verbessertes funktionelles *Outcome* (Schäbitz et al., 2004).

## **1.6 Die Entwicklung der GABAergen Neurotransmission – die Rolle von BDNF**

Neuere Arbeiten demonstrieren eine wichtige Rolle von BDNF in der Regulation der Reifung der GABAergen Neurotransmission. Betrachtet man in erster Linie die morphologischen Veränderungen der Zellen, so scheint es, dass BDNF die Reifung der GABAergen Synapsen und Neurone beschleunigt (Huang et al., 1999; Yamada et al., 2002). Darunter fällt auf der einen Seite die BDNF-induzierte und auf GABAerge Neurone beschränkte Zunahme des Somadurchmessers in Kultur (Yamada et al., 2002). Zum anderen fördert BDNF in hippocampalen Kulturen die Formation GABAerger Verbindungen wahrscheinlich durch vermehrtes Aussprossen von Dendriten und Verlängerung der Axone GABAerger Neurone (Vicario-Abejón et al., 1998).

Ebenfalls in hippocampalen Kulturen zeigten BDNF::EGFP exprimierende Neurone eine höhere Anzahl an synaptischen Terminalien im Vergleich zu BDNF-defizienten Neuronen. Transfizierung mit BDNF führte zur Bildung von *Clustern* in der Nähe glutamaterger Terminalien. Glutamaterge und GABAerge Synapsen zeigten dabei unterschiedliche Reaktionen auf exogene postsynaptische BDNF Applikation: die Anzahl glutamaterger Synapsen erhöhte sich, wogegen die Anzahl GABAerger Synapsen sich verringerte. BDNF::EGFP-exprimierende Neurone unterschieden sich auch von BDNF-defizienten Neuronen in der Morphologie ihrer Dendriten. Sie zeigten ein vermehrtes Aussprossen bei einer verkürzten Dendritenlänge (Singh et al., 2006).

Im Widerspruch dazu steht die Arbeit von Murphy et al. (1998), die im gleichen Präparat eine Zunahme der Dichte der GAD-positiven Punctae durch BDNF beobachteten. In der Regel bewirkt eine Steigerung der neuronalen Aktivität eine Zunahme der Anzahl der GAD-positiven Boutons, ein Effekt der durch TrkB-Blockade mittels spezifischer Antikörper gehemmt wird (Marty et al., 2000).

Ein direkter Zusammenhang zwischen der BDNF-Wirkung und der neuronalen Aktivität konnte auch in einer neuen Arbeit bestätigt werden. Nach Langzeitbehandlung mit BDNF zeigten nur die Hochfrequenz-stimulierten Neurone eine höhere Dichte an GAD65 (Henneberger et al., 2005).

Sowohl auf der Ebene der Transkription als auch der Translation von GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten konnte BDNF als steuernder Faktor ausgemacht werden (Thompson et al., 1998; Yamada et al., 2002). Diese Wirkung von BDNF wurde in zerebellären Kulturen als MEK-abhängig und TrkB-vermittelt beschrieben (Bulleit und Hsieh, 2000). Damit entsteht eine weitere Möglichkeit für BDNF, die GABAerge Transmission entscheidend zu beeinflussen.

Auf der funktionellen Seite sind die vorliegenden Ergebnisse ausgesprochen widersprüchlich. Sie reichen von fehlender Modulation GABAerger Miniaturströme (mIPSC) durch BDNF (Paul et al., 2001) über die deutliche Erhöhung der mIPSC Frequenz bei unveränderter Amplitude (Bolton et al., 2000) bis zur ausschließlichen Verringerung der Amplitude bei konstanter Frequenz (Brünig et al., 2001) in ein und demselben Präparat – der hippocampalen Kultur. Da bereits gezeigt wurde, dass BDNF die Freisetzung von GABA, Dopamin, Acetylcholin (ACh), Glutamat und Serotonin TrkB-abhängig verstärken kann (Sala et al., 1998; Goggi et al., 2002; Yamada et al., 2002), erscheint eine präsynaptische Steuerung durch BDNF an der GABAergen Synapse wahrscheinlich und erklärt zumindest einen Teil der Beobachtungen. Frerking et al. (1998) fanden allerdings, dass BDNF die Freisetzungswahrscheinlichkeit GABAerger Synapses auch herabsetzen und so zu einer Supression der GABAergen Transmission führen kann. Die Widersprüchlichkeit der vorgestellten Arbeiten könnte in erster Linie auf den Wechsel in der postsynaptischen Wirkung von GABA im Laufe der Entwicklung zurückzuführen sein. In unreifen kultivierten Neuronen des Hippocampus erhöht die chronische Stimulation von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren die BDNF Expression über den p42/44 mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalweg und über den Transkriptionsfaktor des cAMP Signalwegs CREB (cAMP-responsive-element-binding-protein)(Obrietan et al. 2002). Die erhöhte BDNF Expression wiederum verstärkt die synaptische

Freisetzung von GABA, so dass hier ein positiver Rückkopplungsmechanismus vorliegt. Unter Berücksichtigung des entwicklungsabhängigen Wechsels der GABA-Wirkung erscheint eine entwicklungsabhängige bidirektionale Regulation wahrscheinlich. In der Tat konnte dies in Pyramidenzellen der CA1 Region demonstriert werden. Am Tag P6 führt die Applikation von exogenem BDNF zu einer akuten und reversiblen Potenzierung der postsynaptischen GABA<sub>A</sub>-vermittelter Ströme. Diese Potenzierung wird durch eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  als Antwort auf eine Aktivierung der TrkB-Rezeptor- Tyrosinkinase und Phospholipase C- $\gamma$  ausgelöst. Zu späteren Zeitpunkten in der Entwicklung (P14) löst die Applikation von BDNF dagegen eine langanhaltende Suppression der postsynaptischen GABA<sub>A</sub>-vermittelter Ströme aus (Mizoguchi et al., 2003c).

Ebenfalls kontrovers wird die Wirkung von BDNF auf die Expression von KCC2 diskutiert. Die Überexpression von BDNF reduziert die über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vermittelten Kalziumsignale und verstärkt die Expression von KCC2 (Aguado et al. 2003). Der Zusatz von exogenem BDNF zu hippocampalen Kulturen löst eine TrkB-vermittelte Verringerung der KCC2 mRNA Expression und Proteinsynthese mit resultierender Störung der intrazellulären Chloridhomöostase aus (Rivera et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit sollen die Effekte der chronischen BDNF-Defizienz auf die Entwicklung der GABAergen Inhibition im visuellen CS untersucht werden. In dieser Hirnstruktur ist bisher weder etwas über den Einfluss von BDNF auf den zeitlichen Verlauf des Wechsels der GABA-Wirkung von Exzitation zu Inhibition, noch auf die Regulation der Chloridtransporterproteine NKCC1 und KCC2, bekannt.

## **1.7 Die Funktion von BDNF im *Colliculus superior***

Auch im CS ist BDNF ein wichtiger Modulator der synaptischen Inhibition. Die neuronale Aktivität reguliert die BDNF- und TrkB-Expression, sowie die Freisetzung von BDNF. Sowohl BDNF-mRNA (Vizuete et al., 2001) als auch -Protein (Frost et al., 2001) wurden im CS nachgewiesen, was für die lokale Transkription und Translation von BDNF in colliculären Neuronen und/oder Gliazellen spricht.

Die Aufzucht in Dauerlicht erhöht die Menge von BDNF und BDNF-mRNA im CS. Die Menge an BDNF zeigt eine tageszeitliche Schwankung (Pollock et al., 2001). Im CS des Hamsters wurden die höchsten BDNF Konzentrationen am P12 (Tag der Augenöffnung)

gemessen, gefolgt von einem Absinken der Konzentration bis auf eine relative Konzentration von 0,63 am P18 (Frost et al., 2001). In allen untersuchten Altersstufen zeigten sich im CS höhere BDNF Konzentrationen als in der Retina. Noch ist wenig bekannt über die intrazelluläre Verteilung von BDNF im visuellen CS, obwohl eine starke BDNF-Immunoreaktivität im adulten CS der Ratte gefunden wurde (Furukawa et al., 1998). Die *in situ* Hybridisierung zeigte verstreute Zellen mit hohem BDNF-mRNA Gehalt, während die Mehrheit der Zellen nicht oder nur schwach markiert waren (Wetmore et al., 1991). Die Darstellung von BDNF im CS ist allerdings in einem gewissen Maße vom eingesetzten Antikörper abhängig, sodass momentan nicht präzise geklärt ist, welcher Zelltyp wann und in welchem Maße BDNF exprimiert. BDNF kann jedoch auch durch anterograden, axonalen Transport über retinale Axone (Caleo et al., 2000) oder aus anderen Hirnregionen (Kohara et al., 2001) in den CS gelangen. Aber auch der umgekehrte Weg, das heißt ein retrograder Signalweg vom CS zur Retina, scheint möglich (Lom et al., 2002). In welchem Verhältnis das im CS produzierte BDNF zu dem anterograd in den CS transportierten BDNF steht, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

Der BDNF-Rezeptor TrkB wurde ebenfalls im visuellen CS nachgewiesen (Barbacid, 1994; Vizuete et al., 2001). Ob TrkB zelltypspezifisch exprimiert wird, ist im Detail noch nicht untersucht worden. Zumindest die Transkription des TrkB-Gens scheint in fast allen Neuronen des CS abzulaufen (Vizuete et al., 2001). Aber gerade die interessanten Fragen, in welchem Verhältnis die Expression vollständiger und verkürzter TrkB-Rezeptoren zueinander stehen und wo der membranständige, funktionstüchtige Rezeptor lokalisiert ist, sind momentan unbeantwortet.

Henneberger und Mitarbeiter (2002) konnten zeigen, dass das Fehlen von BDNF in BDNF-defizienten Mäusen hinsichtlich Neuronendichte und -größe akute Schnittpräparate des visuellen CS nicht verändert. In elektrophysiologischen Experimenten blieben der Membranwiderstand und die Ganzzellkapazität von der chronischen Abwesenheit von BDNF unbeeinflusst.

Bedenkt man aber, dass RGZ die Hälfte der Synapsen im adulten *Colliculus* bilden (Lund und Lund, 1972) und die chronische Abwesenheit von BDNF zu gravierenden funktionellen Defekten in RGZ führen (Rothe et al., 1999), so ist davon auszugehen, dass das Fehlen von BDNF auch im visuellen CS Spuren hinterlässt. Die Beobachtung, dass im *Tectum* appliziertes BDNF das Dendritenwachstum von RGZ deutlich beschleunigen kann (Lom et al., 2002), legt nahe, dass auch ein Fehlen von BDNF im



CS zu funktionellen Defekten der RGZ führen könnte, was wiederum Konsequenzen für den visuellen CS hätte. Tatsächlich zeigten elektrophysiologische Experimente im visuellen CS, dass die chronische Abwesenheit von BDNF eine Aufregulation der inhibitorischen postsynaptischen Antworten bewirkt, die durch die akute Applikation von BDNF invertiert werden konnte. In Wildtyp-Mäusen konnte die chronische BDNF-Defizienz durch die Applikation des Tyrosin-Kinase-Inhibitors K252a oder eines intrazellulären Protein Kinase C Blockers nachgeahmt werden. Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass die Aufregulation der synaptischen Inhibition in BDNF-defizienten Mäusen kein Ergebnis einer langsam verlaufenden synaptischen Reorganisation ist, sondern ein akuter Effekt, verursacht durch das Fehlen von BDNF. Die Unterdrückung der GABAergen Inhibition ist also durch eine TrkB-vermittelte PKC-Aktivierung bedingt (Henneberger et al., 2002). Die Aktivierung der PKC und/oder die Blockade von GABA<sub>A</sub>R konnte als starker Stimulus für die inhibitorische Synaptogenese in embryonalen Neuronen der Ratte des CS identifiziert werden (Meier et al. 2003). Dieses Szenario setzt aber eine depolarisierende GABA-Wirkung mit anschließender Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  voraus.

Die vorliegende Arbeit soll klären, ob BDNF die Fähigkeit von GABA, intrazelluläre Kalziumsignale zu generieren, beeinflusst. Wenn BDNF eine Potenzierung der GABAergen postsynaptischen Ströme bewirkt, und zu diesem Zeitpunkt GABA Kalziumsignale auslöst, sollte das Fehlen von BDNF eine deutliche Entwicklungsverzögerung bewirken. Ein möglicher Mechanismus dieser BDNF-Wirkung wäre die Beeinflussung der Expression oder Translokation der Kalium-Chlorid-Transporterproteine KCC2 und NKCC1.

## **1.8 Aufgabenstellung**

Durch den Vergleich akuter Schnitte des CS von Wildtyp- und BDNF-defizienten Mäusen im spätembryonalen und frühpostnatalen Alter wird beabsichtigt:

- 1.) die Effekte der chronischen BDNF-Defizienz auf das Umkehrpotential GABA-induzierter Ströme zu erfassen,
- 2.) das Zeitfenster zu bestimmen, in dem GABA depolarisierende Antworten in den untersuchten Genotypen liefert, und

- 3.) den Einfluß von BDNF auf die Expression und/oder die Translokation von KCC2 und NKCC1 aufzuklären.