

3. Ergebnisse

3.1 GABA-induzierte Ströme in *bdnf*^{+/+}- und *bdnf*^{-/-}-Neuronen zeigen unterschiedliche Umkehrpotentiale

In der ersten Reihe von Experimenten wurden *whole-cell*-Messungen an Neuronen des visuellen CS durchgeführt, um BDNF-abhängige Änderungen des Antwortverhaltens auf GABA während der Entwicklung zu quantifizieren. Mit der Absicht, die $[Cl^-]_i$ während der Messungen nicht zu verändern, wurde die *perforated-patch*-Technik mit Gramicidin D als porenbildende Substanz angewendet (Abb. 1A; (Rhee et al., 1994; Kyrozis und Reichling, 1995)). Wie bei einer konventionellen *whole-cell* Messung ging die Perforation mit einem Anstieg des Leckstromes und einem Anstieg der Amplitude des durch den Test-Spannungspuls hervorgerufenen Stromes einher. Durch die Maxima dieser Stromsignale wurde der zelluläre Eingangswiderstand R_S bestimmt. In dem Experiment, das in der Abb. 4 A dargestellt ist, erreichte R_S 18 min nach Etablieren eines *seals* einen stabilen Wert von ungefähr 20 M Ω . In allen erfolgreich vollzogenen *perforated-patch*-Versuchen erreichte R_S in dieser Plateauphase Werte zwischen 10 und 25 M Ω .

Kurzzeitige GABA-Applikationen auf die Zellsomata riefen Ströme hervor, die in allen untersuchten Altersstufen einen ähnlichen zeitlichen Verlauf hatten. Zum Zeitpunkt P0 und P1 induzierte die Applikation von exogenem GABA einen Cl^- Auswärtsstrom, wenn die Zellen auf ein Haltepotential von -70 mV geklemmt wurden. Zum Zeitpunkt P2 waren diese Ströme in BDNF-defizienten Mäusen signifikant größer (Abb. 4 A, B).

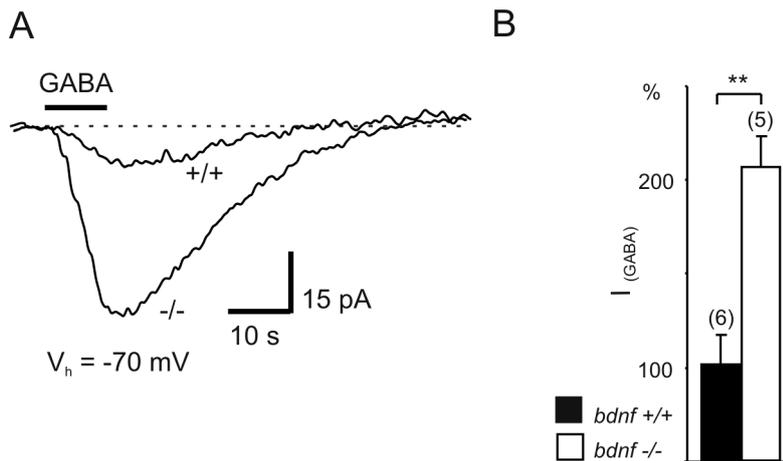


Abb. 4: (A) Durch GABA-Applikation (50 μ M) hervorgerufene Membranströme ($I_{(GABA)}$) zum Zeitpunkt P2. Die $I_{(GABA)}$ von jeweils einem Neuron der beiden untersuchten Genotypen sind überlagert dargestellt. (B) Normalisierte Amplituden der $I_{(GABA)}$ in Wildtyp- und BDNF-defizienten Neuronen.

Dieser Unterschied könnte auf die Gestalt des Neuron, oder auf einen antagonistischen BDNF-Effekt auf $GABA_A$ R zurückzuführen sein (Henneberger et al. 2002), oder auf eine unterschiedliche intrazelluläre Chloridkonzentration. Um letztere Möglichkeit zu prüfen, wurde das Umkehrpotential der GABA-induzierten Ströme ($E_{(GABA)}$) gemessen (Abb. 5). Dies erfolgte mittels GABA-Applikationen auf Neurone des visuellen CS, während diese bei verschiedenen Spannungen gehalten wurden. Die Strom-Spannungs-Abhängigkeit wurde aus den Strommaxima während der Antworten ermittelt. $E_{(GABA)}$ konnte dann anhand des Abszissenschnittpunktes der Strom-Spannungskurve bestimmt werden (Abb. 5 B).

In Abb. 5 A und B ist als Beispiel ein *bdnf*+/+-Neuron gezeigt, dass ein $E_{(GABA)}$ von -50 mV aufweist. Dieser Wert ist nahe an dem $E_{(GABA)}$ -Wert, welcher in akuten Neocortexschnitten ermittelt wurde (Owens et al., 1996). Im Vergleich der untersuchten Genotypen zeigte sich, dass $E_{(GABA)}$ in *bdnf*-/-Neuronen (-38 ± 1 mV; n=5) positiver war als in *bdnf*+/+-Neuronen (-50 ± 1 mV; n=6; $p < 0.05$) (Abb. 5 C). Geprüft wurde auch das Ruhemembranpotential der Neurone beider untersuchten Genotypen. Unmittelbar nach Durchbrechen des perforierten Patch in die Ganzellkonfiguration zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Ruhemembranpotentialen der beiden Populationen (-47.2 ± 1.2 mV (n = 4) für *bdnf*+/+ und -44.5 ± 3.2 mV (n=4) für *bdnf*-/ (p = 0.47)).

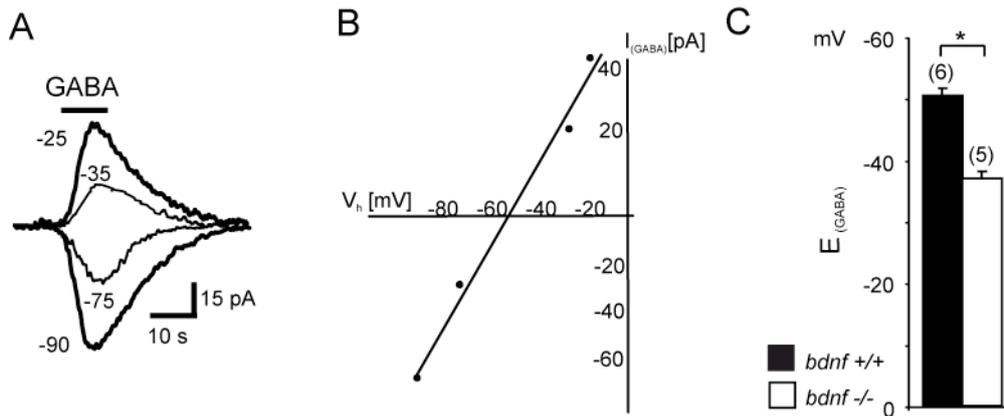


Abb. 5: (A) $I_{(GABA)}$ bei verschiedenen Haltepotentialen in einem $bdnf^{+/+}$ Neuron. (B) $E_{(GABA)}$ wurde anhand des Abszissenschnittpunktes der Strom-Spannungskurve (I-V) bestimmt (dasselbe Neuron wie (A)). (C) $E_{(GABA)}$ -Werte in Wildtyp- und BDNF-defizienten Neuronen.

Diese Ergebnisse stützen die Schlussfolgerung, dass zum Zeitpunkt P2 der Entwicklung BDNF-defiziente Neurone eine höhere intrazelluläre Chloridkonzentration haben als Wildtyp-Neurone. Es kann also erwartet werden, dass die Aktivierung von $GABA_{A}R$ abhängig von der intrazellulären Chloridkonzentration und damit BDNF-abhängig ist.

3.2 Neurone des CS verlieren ihre GABA-induzierten Kalziumsignale zum Zeitpunkt P1

Die altersabhängige Veränderung der Fähigkeit von GABA, Kalziumsignale zu induzieren, wurde mit Kalziumfluoreszenz-Experimenten untersucht (Abb. 6). Ziel war es, eine präzise Beurteilung des entwicklungsabhängigen Wechsels der GABA-Wirkung im visuellen CS der Maus zu erhalten. Dazu wurden akute Schnitte des visuellen CS angefertigt und mit dem Kalziumindikator Oregon Green Green 488-BAPTA-1-AM beladen, wie unter 2.1 und 2.5 beschrieben. Die an Wildtyp-Neuronen durchgeführten Experimente führten zu folgenden Ergebnissen: zwischen den Altersstufen E19 und P1 induzierte die Applikation von GABA (50 μ M) eine Erhöhung der intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$. Die Kalziumsignale konnten durch Ko-Applikation des spezifischen $GABA_{A}$ -Rezeptor-Antagonist Gabazine (3 μ M) oder des unspezifischen Kalziumkanalblockers Kadmium (100 μ M) (Abb. 6 C) blockiert werden. Es kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass im visuellen CS die GABA-evozierte Kalziumsignalgebung auf einer $GABA_{A}$ -

Rezeptor-vermittelten Depolarisation der Membran und konsekutiver Aktivierung spannungsgesteuerter Kalziumkanäle hervorgerufen beruht.

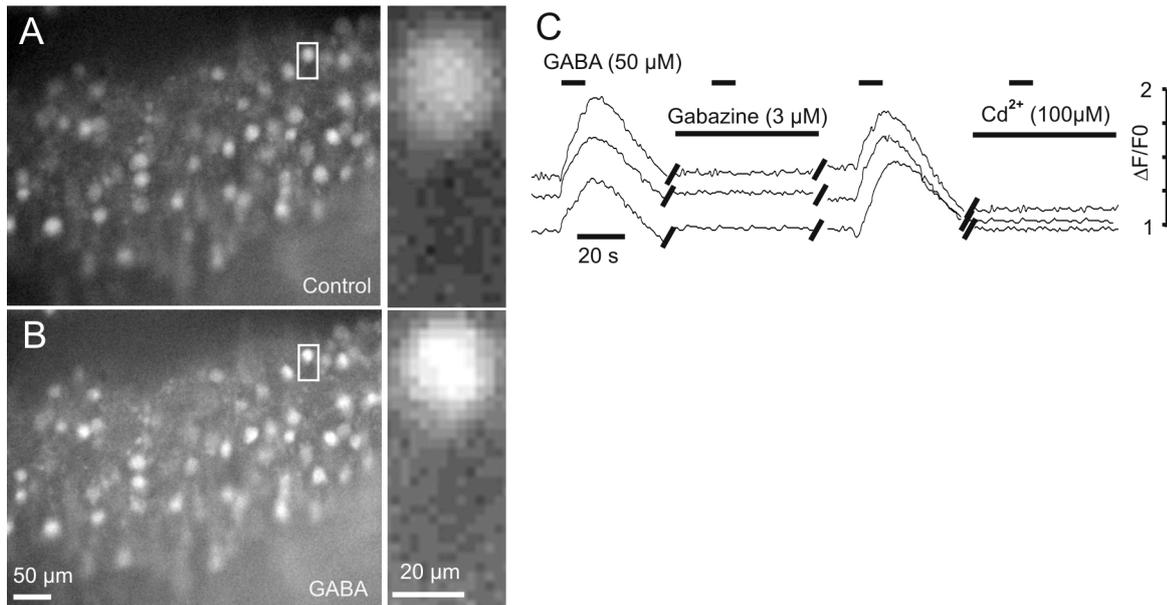


Abb. 6: Kalziumfluoreszenzsignale nach GABA-Applikation in akuten Hirnschnitten des postnatalen Colliculus superior. **(A)** Ruhefluoreszenz in einem Schnittpräparat zum Zeitpunkt P1 nach Laden mit Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (control). **(B)** Kalziumfluoreszenzsignal während der Applikation von GABA (50 µM). **(C)** GABA-induzierte Kalziumfluoreszenzsignale konnten durch Ko-Applikation des spezifischen GABA_AR-Antagonisten Gabazine (3 µM) und des unspezifischen Kalziumkanalblocker Kadmium (100 µM) blockiert werden. Fluoreszenzsignale wurden als relative Änderung der Ruhefluoreszenz angegeben ($\Delta F/F_0$).

Der Vergleich der durchschnittlichen Amplituden der Kalziumsignale zeigt mit zunehmendem Alter einen abnehmenden Verlauf (Abb. 7 A, B). Bereits zum Zeitpunkt P2 waren GABA-induzierte Kalziumsignale in *bdnf*^{+/+}-Neuronen selten zu beobachten (10% aller *bdnf*^{+/+}-Neurone) (Abb. 7 C). Zum Zeitpunkt P3 waren sie kaum noch zu finden. Zum Zeitpunkt P4 bis P15 zeigte sich in keiner der untersuchten Präparationen aus *bdnf*^{+/+} Tieren depolarisierende Antworten auf die Applikation von GABA. An dieser Stelle wird geschlossen, dass während der physiologischen Entwicklung des CS, Neurone ihre Eigenschaft, GABA-induzierte Kalziumsignale zu generieren, um den postnatalen Tag 1 verlieren.

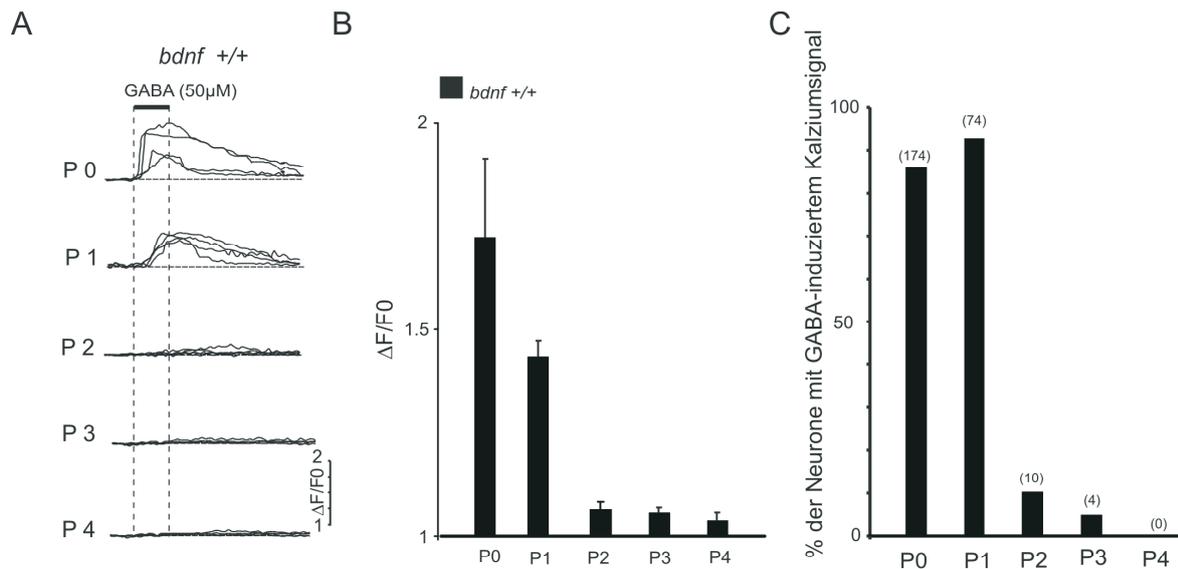


Abb. 7: (A) Kalziumfluoreszenzsignale in Wildtyp-Neuronen verschiedener Altersstufen (P1 bis P4). Einzelne Signalspuren repräsentieren die gemittelten Kalziumfluoreszenzsignalantworten von mindestens 92 Neuronen in einem Schnittpräparat. (B) Amplituden der GABA-induzierten Kalziumfluoreszenzsignale in Abhängigkeit vom Lebensalter. (C) Prozentualer Anteil der Neurone, die eine GABA-induzierte Kalziumantwort in Abhängigkeit vom Lebensalter zeigten. Ziffern über den Säulen: Anzahl der Neurone mit Kalziumantwort.

3.3 Das chronische Fehlen von BDNF verzögert den Zeitpunkt der entwicklungsabhängigen Umkehr der GABA-Wirkung

Um den Einfluss von BDNF auf die entwicklungsabhängige Umkehr der GABA-Wirkung zu untersuchen, wurden Kalziumfluoreszenz-Experimente (siehe 2.5) an akuten Schnitten des visuellen CS durchgeführt die aus BDNF-defizienten Mäusen (siehe 2.1) präpariert wurden. Es sollte getestet werden ob, und in welchem Ausmass die beobachtete Verschiebung von $E_{(GABA)}$ zu positiveren Werten in *bdnf*^{-/-}-Neuronen mit einer veränderten Fähigkeit der Neurone auf GABA-Applikation Kalziumsignale zu generieren korreliert. Zwischen den Altersstufen E19 und P1 führte die Applikation von GABA (50 μM) zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in *bdnf*^{-/-}-Neuronen (Abb. 8 A). Der Vergleich der durchschnittlichen Amplituden der Kalziumsignale zeigt zu diesen Zeitpunkten keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen (Abb. 8 B). Bereits zum Zeitpunkt P2 waren GABA-induzierte Kalziumsignale in *bdnf*^{+/+}-Neuronen selten zu beobachten, während sie noch in mehr als der Hälfte der

bdnf^{-/-}-Neuronen vorhanden waren (10% in *bdnf*^{+/+} vs. 53% in *bdnf*^{-/-}) (Abb. 8 C). Wie unter 3.2 beschrieben verlieren die CS-Neurone um den Tag P1 die Fähigkeit GABA-induzierte Kalziumsignale zu generieren.

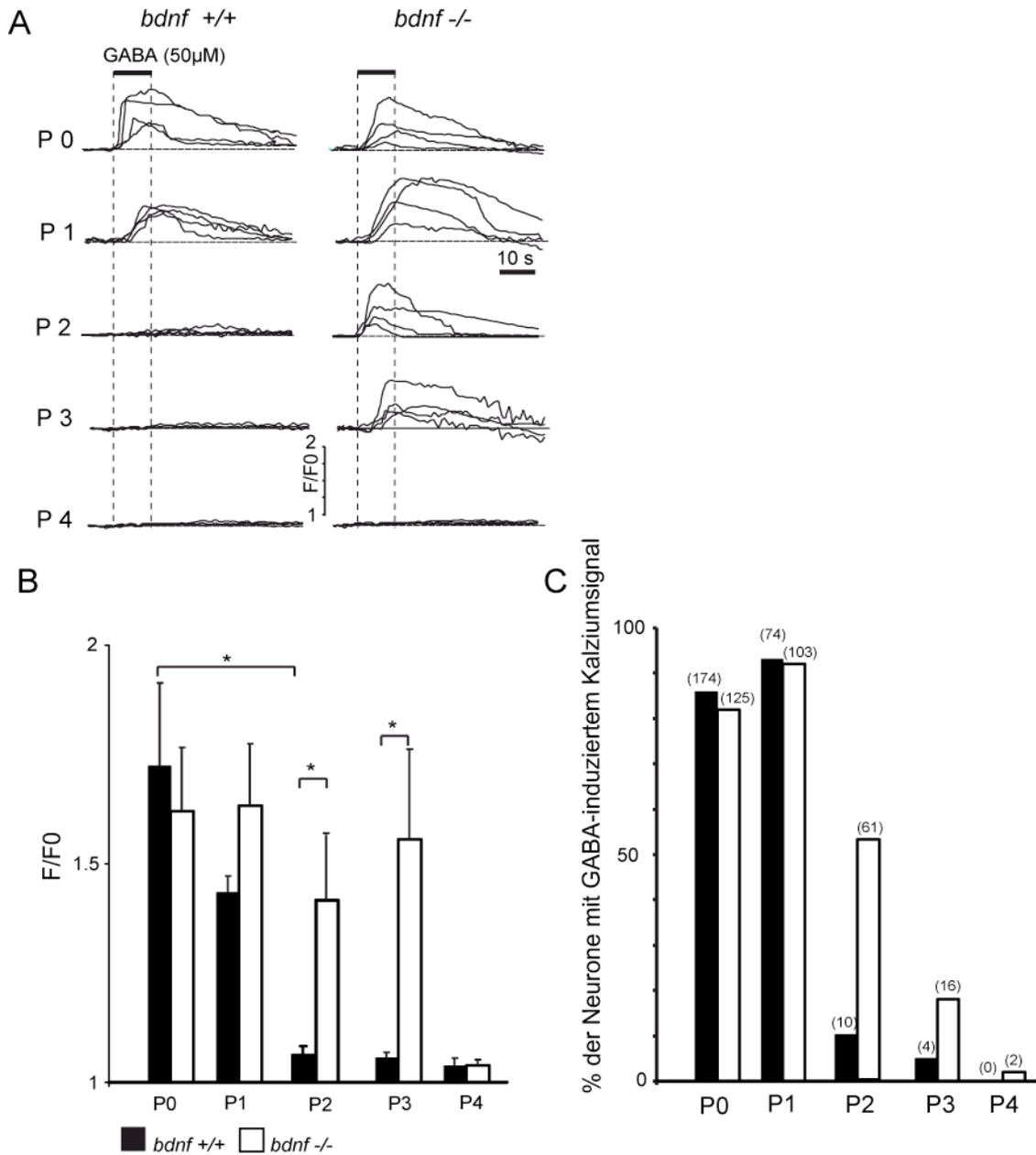


Abb. 8: **(A)** Kalziumfluoreszenzsignale in Wildtyp- und BDNF-defizienten Neuronen verschiedener Altersstufen (P1 bis P4). **(B)** Amplituden der GABA-induzierten Kalziumfluoreszenzsignale in Abhängigkeit vom Lebensalter und untersuchtem Genotyp. **(C)** Prozentualer Anteil der Neurone, die eine GABA-induzierte Kalziumantwort zeigten in Abhängigkeit vom Lebensalter und untersuchtem Genotyp

Im Gegensatz dazu erhalten sich *bdnf*^{-/-}-Neurone diese Eigenschaft über einen längeren Zeitraum (Abb. 8 A, B, C). Bis zum postnatalen Tag 3 wurden GABA-induzierte Kalziumsignale beobachtet. Der Vergleich der durchschnittlichen Amplituden der Kalziumsignale zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen zum Zeitpunkt P2 und P3 (Abb. 8 B). Zum Zeitpunkt P4 bis P15 wies keiner der beiden Genotypen depolarisierende Antworten auf die Applikation von GABA auf. Folglich erhalten sich BDNF-defiziente Neurone ihre Eigenschaft GABA-induzierte Kalziumsignale zu generieren länger, und das zu einem Zeitpunkt der intensiven Synaptogenese im CS. Eine weitere Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen ist, dass im BDNF-defizienten Tier eine Entwicklungsverzögerung von zwei Tagen gegenüber dem Wildtyp vorliegt. Offensichtlich liegt ein Kompensationsmechanismus zum Erreichen der adulten Chloridhomöostase im BDNF-defizienten Tier vor.

3.4 Die verzögerte Entwicklung der GABAergen Inhibition in *bdnf*^{-/-} Neuronen kann durch exogenes BDNF normalisiert werden

Um zu testen, ob exogen zugeführtes BDNF die Entwicklungsverzögerung der GABAergen Reifung aufheben kann, wurden *bdnf*^{-/-}-Schnitte unmittelbar nach der Präparation in ACSF transferiert, dem 100 ng/ml BDNF zugesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte mindestens 90 min bei 20–22°C. Danach wurden die Kalziumfluoreszenzmessungen wie unter 2.5 beschrieben durchgeführt. Die Inkubation der akuten Schnittpräparate in BDNF-haltiger ACSF führte zu einer signifikanten Reduktion der mittleren Amplituden der Kalziumsignale zum Zeitpunkt P2. (Fig. 9 A). Darüberhinaus reduzierte sich der prozentuale Anteil der Neurone die ein Kalziumsignal auf die Applikation von GABA generierten (27% in *bdnf*^{-/+}BDNF vs. 53% in *bdnf*^{-/-}) (Abb. 9 B). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass BDNF eine Schlüsselstellung in der Entwicklung der GABAergen Inhibition im CS hat.

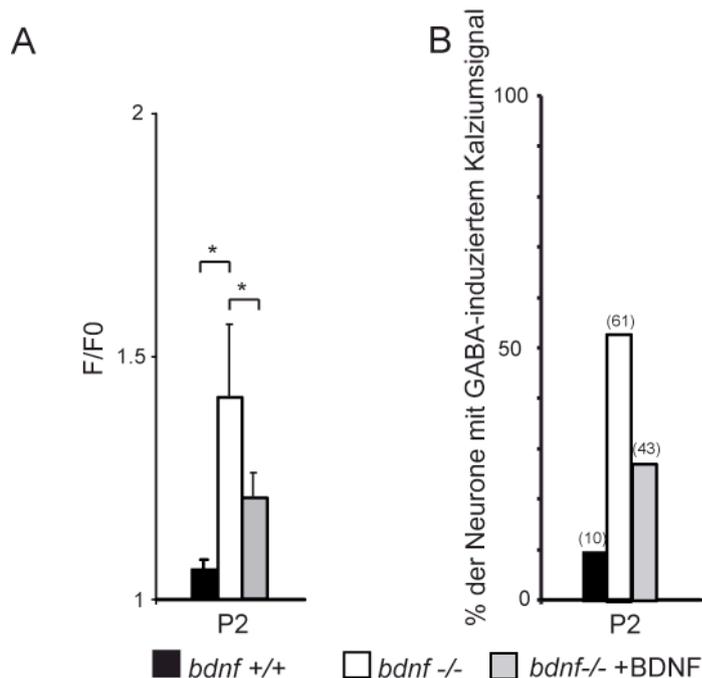


Abb 9: Inkubation der *bdnf* -/-Hirnschnitte mit BDNF hebt die Entwicklungsverzögerung auf. **(A)** Amplituden der GABA-induzierten Kalziumfluoreszenzsignale in Abhängigkeit vom untersuchten Genotyp zum Zeitpunkt P2. **(B)** Prozentualer Anteil der Neurone, die eine GABA-induzierte Kalziumantwort zeigten in Abhängigkeit vom untersuchtem Genotyp zum Zeitpunkt P2

3.5 Die Expression der GABA_AR Subtypen und der Chloridtransporterproteine zeigt keinen genotypabhängigen Unterschied

Die molekularen Grundlagen der BDNF-abhängigen Unterschiede in der GABA-induzierten Depolarisierung zum Zeitpunkt P2 wurden mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Fragestellung war hierbei, ob Unterschiede in der Expression der GABA_AR Untereinheiten (α 1, α 2, α 3, β 2, β 3, γ 2) oder der Chloridtransporterproteine (KCC2, NKCC1) vorliegen, welche die beobachteten Unterschiede der $[Cl^-]_i$ sowie der Fähigkeit, depolarisierende GABA Antworten zu generieren, erklären könnten.

Ein Zusammenhang zwischen BDNF und Proteinexpression konnte schon in verschiedenen Arbeiten demonstriert werden. So erhöht BDNF die Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten α 1, α 6 und γ 2 von zerebellären Körnerzellen in Kultur (Bulleit und Hsieh, 2000). In der rezessiven Mausmutante *stargazer* können zerebelläre Körnerzellen kein BDNF exprimieren, was zu einer reduzierten Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten α 6 und β 3 führt (Thompson et al., 1998).

Die untersuchten GABA-Rezeptor Untereinheiten beschränkten sich auf die oben genannten, da die Rezeptorzusammensetzung im CS bereits gut untersucht und somit

als bekannt gilt. *In-situ*-Hybridisierungen zeigten, dass im CS mRNA der GABA-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1;3$, $\alpha 5$, $\beta 1;3$ und $\gamma 2$ exprimiert wird (Wisden et al., 1992). Henneberger und Kollegen (2002) konnten zeigen, dass im CS keine $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten am Aufbau des GABA_A-Rezeptors beteiligt sind, da Rezeptoren, die entweder $\alpha 4$ - oder $\alpha 6$ - Untereinheiten enthalten, nicht Zolpidem-sensibel sind (Crestani et al., 2000). Zum Zeitpunkt P12 konnte in Abwesenheit von BDNF eine erniedrigte mRNA-Expression von $\alpha 1$ -3-Untereinheiten im CS beobachtet werden (Henneberger et al., 2002). Untersuchungsmaterial waren akute Schnitte des CS, die in gleicher Art und Weise angefertigt wurden wie unter 2.1 beschrieben. Für jedes Protein wurden mindestens 4 PCR Experimente durchgeführt.

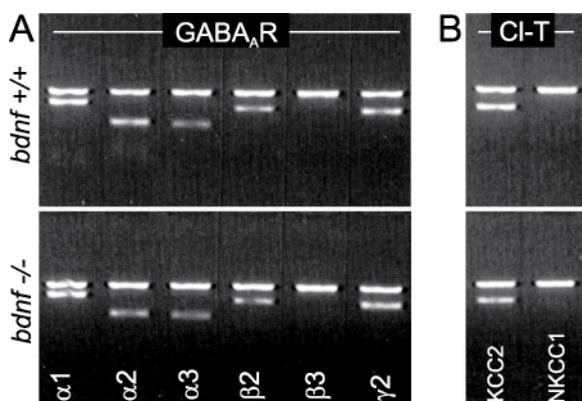


Abb. 10: Resultate der RT-PCR. Expression der (A) GABA_AR Untereinheiten und der (B) K⁺-Cl⁻-Kotransporter in Wildtyp- und BDNF-defizienten Mäusen zum Zeitpunkt P2. Die obere Bande in beiden Reihen zeigt die mRNA für β -Aktin.

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression der GABA_AR Untereinheiten zum Zeitpunkt P2 (Abb. 10 A) und auch nicht zu anderen untersuchten Zeitpunkten (E19 bis P5).

In allen getesteten Altersstufen (E19 bis P8) ließ sich in Neuronen des Wildtyps keine mRNA für NKCC1 nachweisen. Interessanterweise fand sich mRNA für KCC2 bereits zum Zeitpunkt E19 und auch zu allen getesteten späteren Zeitpunkten (E19 bis P8). In Neuronen des BDNF-defizienten Genotyps zeigte sich für die mRNA der Chloridtransporterproteine ein nahezu identisches Muster. Obwohl in der Tendenz ein etwas geringerer KCC2-mRNA Gehalt in den BDNF-defizienten Neuronen vorzuliegen scheint, ergab die Quantifizierung keinen signifikanten Unterschied. Deshalb konnten an dieser Stelle Unterschiede in der molekularen Komposition der GABA_AR oder ein Defizit in der KCC2 Expression als Ursache für die beobachteten Unterschiede von $E_{(GABA)}$ und der GABA-induzierten Kalziumsignale ausgeschlossen werden.

3.6 Der chronische Mangel an BDNF beeinträchtigt die Translokation von KCC2 in die Plasmamembran

Eine Möglichkeit, die unterschiedlichen Antworten auf GABA zwischen Wildtyp und BDNF-defizienten Neuronen zu erklären, wäre das Fehlen von funktionalem KCC2 in der Plasmamembran in Abwesenheit von BDNF.

Immunhistochemische Färbungen wurden angefertigt, um die subzelluläre Lokalisation von KCC2 in beiden Genotypen zu untersuchen (Abb. 11). In vier verschiedenen Experimenten an P2 *bdnf*^{+/+}-Mäusen zeigten sich KCC2-immunoreaktive Punkte in der somato-dendritischen Membran. Deutlich markiert sich die KCC2-Immunoreaktivität dicht und gleichmässig entlang der somatischen und dendritischen Plasmamembran, wie man es für ein funktionelles Transportprotein erwarten würde (Abb. 11 A). Im Gegensatz dazu zeigte die KCC2-Immunoreaktivität in *bdnf*^{-/-}-Mäusen ein diffuses Verteilungsmuster. KCC2-immunoreaktive Fluoreszenz fand sich primär diffus im Zytosol verteilt, möglicherweise in perinukleären Kompartments, dem Golgi-Apparat, dem endoplasmatischen Retikulum, oder in Transportvesikeln. (Abb. 11 B).

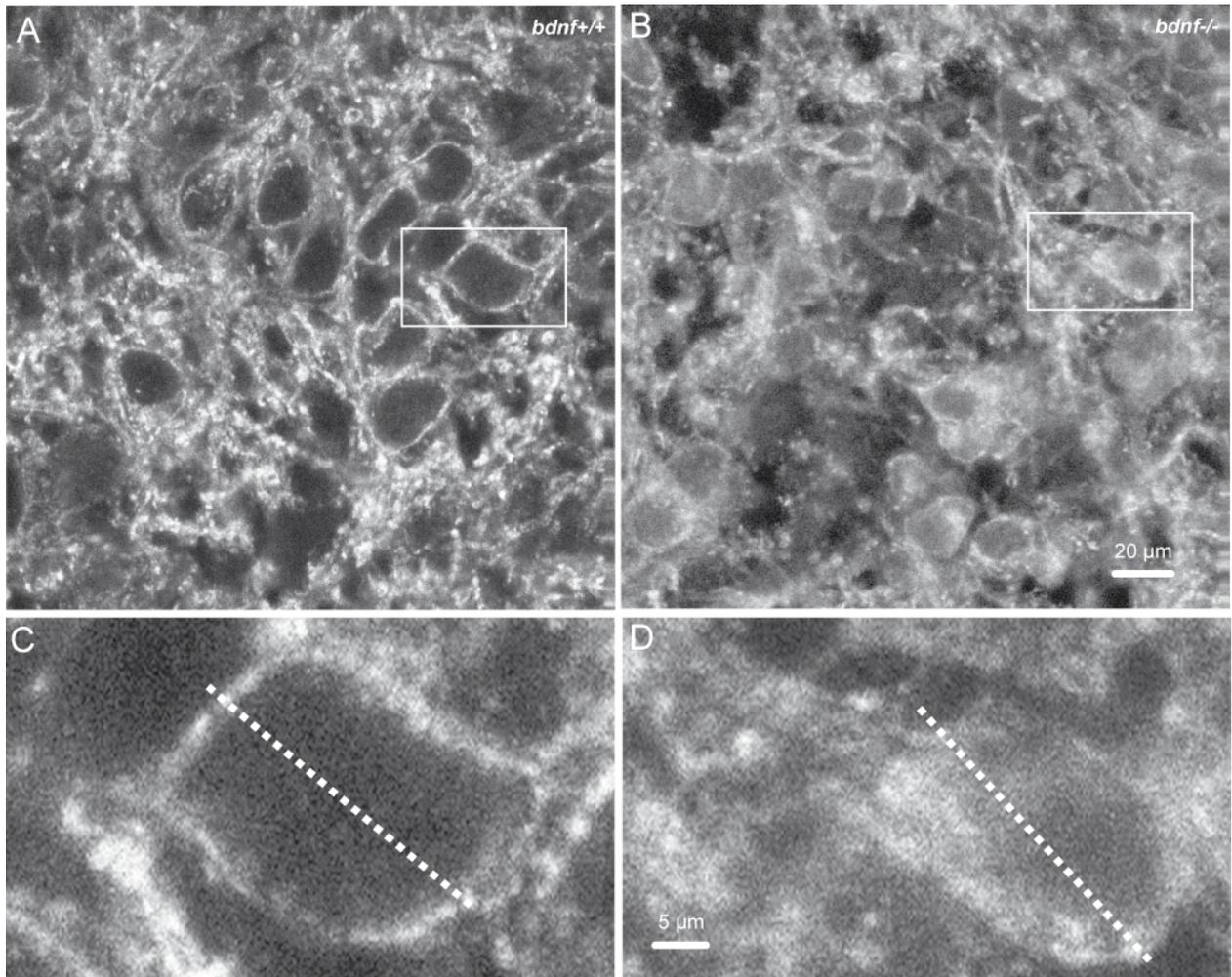


Abb. 11: Immunfluoreszenzfärbung von KCC2 in Gefrierschnitten aus **(A)** Wildtyp oder **(B)** BDNF-defizienten Mäusen. Durch Rechtecke markierte Flächen sind unter dem entsprechenden Bild vergrößert dargestellt. Es zeigt sich **(C)** eine preferenzielle Markierung von KCC2 in der Plasmamembran von *bdnf+/+*-Tieren und **(D)** eine diffuse, auf Cytosol und perinukleäre Kompartments verteilte Immunreaktivität in *bdnf-/-*-Mäusen.

Die quantitative Analyse der Verteilung der Immunoreaktivität im gesamten Neuron ergab einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den beiden untersuchten Genotypen.

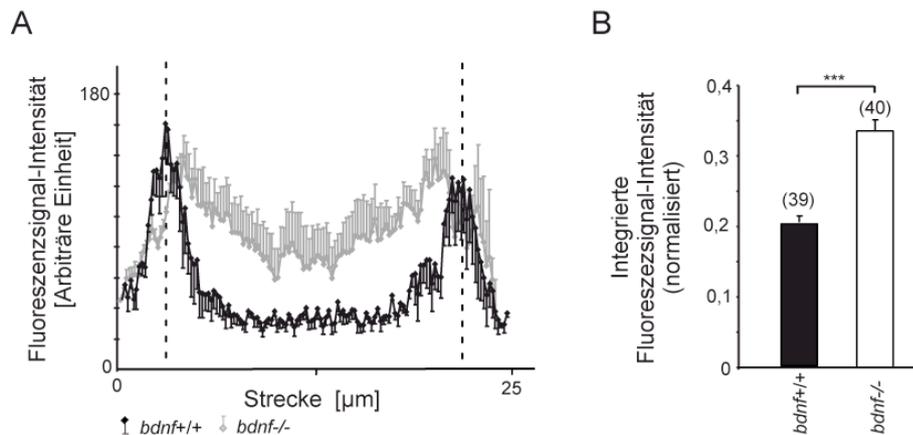


Abb. 12: (A) Gemittelte Profile der Fluoreszenzsignal-Intensität durch die Somata von *bdnf+/+*- und *bdnf-/-*-Neuronen. Für das Erstellen des Fluoreszenzsignal-Profiles eines einzelnen Neurons wurden die Fluoreszenzwerte im maximalen Durchmesser der Zelle bestimmt. Die Strecke zwischen den beiden Maximalwerten (gestrichelte Linie in A) wurde integriert, normalisiert und zur Auswertung herangezogen (siehe auch Abb. 11 C, D: gestrichelte Linien zeigen Beispiel-Profile). **(B)** Die Ergebnisse der Auswertung beider untersuchten Genotypen als Säulendiagramm dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen ein Defizit in der Translokation von KCC2 in *bdnf-/-*-Neuronen auf. Somit erscheint BDNF als treibende Kraft der Translokation von KCC2 in die Plasmamembran. Ein Schritt der Entwicklung, der aus dem KCC2-Protein einen aktiven Kotransporter macht.