

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des chronischen Fehlens des Neurotrophins BDNF auf die entwicklungsabhängige Regulation von KCC2 untersucht. Neuronale GABA_A-Rezeptor-Aktivität wurde in akuten Schnittpräparaten charakterisiert, und zwar i) im spätembryonalen und ii) im früh postnatalen SC der Maus, wobei jeweils Wildtyp (*bdnf*^{+/+}) und BDNF-defiziente (*bdnf*^{-/-}) Mäuse verglichen wurden. Ganzzell oder Gramicidin-perforierte Patch-Ableitungen und Kalziumfluoreszenz-Messungen wurden durchgeführt um Membranruhepotentiale, Umkehrpotentiale der GABA-induzierten Chlorid-Ströme ($E_{(GABA)}$), sowie die GABA-induzierten Kalziumsignale zu bestimmen. Exogen appliziertes GABA war in der Lage, Neurone des Wildtyps bis zum postnatalen Tag (P) 1 zu depolarisieren. Zum Zeitpunkt P2 zeigten *bdnf*^{+/+} und *bdnf*^{-/-} Neurone einen signifikanten Unterschied in $E_{(GABA)}$, mit positiveren Werten in *bdnf*^{-/-} Mäusen. Die chronische Abwesenheit von BDNF verzögerte den Verlust der depolarisierenden GABA Wirkung. Zwischen P1 und P3 zeigten sich höhere Amplituden GABA-induzierter Kalziumfluoreszenzsignale in *bdnf*^{-/-} Mäusen. In keiner der getesteten Altersgruppen (von P0 bis P8) des Wildtyps, fand sich mRNA des Cl⁻ Transporters NKCC1, wogegen mRNA für KCC2 immer vorhanden war. Es zeigte sich, dass der Verlust der depolarisierenden GABA-Wirkung zum Zeitpunkt P2 in der *bdnf*^{+/+}-Präparation mit einem Anstieg der KCC2-Immunoreaktivität in der Plasmamembran assoziiert war. Im Gegensatz dazu wiesen *bdnf*^{-/-}-Neurone ein diffuseres KCC2 Verteilungsmuster auf. Die Daten stützen die Schlussfolgerung, dass die Anwesenheit von BDNF das Verschwinden der depolarisierenden GABA-Wirkung über eine verstärkende Wirkung auf die KCC2 Insertion in die neuronale Plasmamembran beschleunigt. Das Fehlen von BDNF verlängert dagegen die Entwicklungsphase in der GABA noch depolarisierend wirkt.

4.1 Die Mechanismen der GABA-induzierten Kalziumsignale

GABA_A-Rezeptorkanäle sind permeabel für die Anionen Cl⁻ und HCO³⁻ (Bormann et al., 1987). Deshalb kommen verschiedene Mechanismen als Erklärung für die depolarisierende Wirkung von GABA im unreifen CS in Betracht. Beispielsweise würde ein verstärkter HCO³⁻-Ausstrom durch GABA_A-Rezeptorkanäle das $E_{(GABA)}$ zu positiveren Werten hin verschieben. Dies könnte das Ergebnis einer veränderten HCO³⁻

-Leitfähigkeit der GABA_A-Rezeptorkanäle (Perkins und Wong, 1996) sein, oder durch ein Ansteigen der $[\text{HCO}_3^-]_i$ hervorgerufen werden. Allerdings scheinen GABAerge Depolarisationen eher durch eine erhöhte $[\text{Cl}^-]_i$ in unreifen Nervenzellen zustande zu kommen (Sun et al., 1999). Dies führt zu einem positiveren $E_{(\text{GABA})}$ und zu einem Cl^- -Ausstrom durch GABA_A-Rezeptorkanäle. Unterstützt wird letztere Hypothese von Studien, die gezeigt haben, dass unreife Nervenzellen, die noch keine Chloridextrusion besitzen (Zhang et al., 1991; Rivera et al., 1999) oder aktiv Chlorid in die Zelle hineinpumpen (Rohrbough und Spitzer, 1996; Kakazu et al., 1999) mit einer Depolarisation auf eine GABAerge Stimulation antworten. In der Tat wäre eine entwicklungsbedingte Hochregulation des Kalium-Chlorid-Transporters (Lu et al., 1999), der in adulten Nervenzellen höchstwahrscheinlich für die Chloridextrusion verantwortlich ist, vereinbar mit den in dieser Arbeit gezeigten Beobachtungen.

Es scheint sehr wahrscheinlich, dass im CS, wie auch in einer Reihe anderer Gehirnregionen, die GABA-evozierte Kalziumsignalgebung durch eine GABA_A-Rezeptor-vermittelte Depolarisation mit einer nachfolgenden Aktivierung spannungsgesteuerter Kalziumkanäle hervorgerufen wird.

4.2 Die spätembryonale und postnatale neuronale Chlorid-Homöostase

Mit wenigen Ausnahmen (Gulacsi et al., 2003; Bartho et al., 2004) sind reife Neurone des ZNS der Säugetiere durch eine niedrige intrazelluläre Chloridkonzentration gekennzeichnet, und dies ist die Voraussetzung für die klassische GABA_AR-vermittelte hyperpolarisierende Inhibition. Neben der Aufrechterhaltung dieser Chloridkonzentration besitzt das Neuron, wie andere Zellen auch, die bedeutende Fähigkeit, den intrazellulären pH und das Zellvolumen zu regulieren. In den meisten Zellen ist diese Fähigkeit abhängig von einer intrazellulären Chloridquelle, die zur Aufnahme von HCO_3^- (im Falle der pH-Regulation) oder zur Kaliumextrusion (im Falle der Zellvolumen-Regulation) benötigt wird. Die hohe intrazelluläre Chloridkonzentration in unreifen Neuronen muss demnach als physiologische Notwendigkeit betrachtet werden. Die Aufrechterhaltung der Chlorid-Homöostase in Neuronen wird hauptsächlich von Kationen-Chlorid-Kotransportproteinen geleistet. Diese Transportproteine selbst verbrauchen kein ATP, beziehen ihre Energie aber aus dem Na^+ - und K^+ -Gradienten, der von der Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten wird. Zusätzlich zu diesen

Transportproteinen, haben die Na^+ -abhängigen und Na^+ -unabhängigen Anionenaustauscher (NDAE, respektive AE) Einfluss auf die neuronale $[\text{Cl}^-]_i$, da sie einen Austausch von Chlorid gegen HCO_3^- leisten (Choi et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Neuronen des visuellen CS bis zum Zeitpunkt P1 ein zellauswärts gerichteter Chloridgradient besteht. Die Ansicht, dass NKCC1 die Aufnahme von Chlorid in unreife Neurone leistet, ist weit verbreitet (Sun und Murali, 1999; Yamada et al., 2004). Ein neues und interessantes Ergebnis dieser Arbeit ist, dass im visuellen CS bereits im spätembryonalen Alter, hier getestet ab E19, keine mRNA für NKCC1 nachweisbar war. Dies impliziert, dass NKCC1 im visuellen CS keinen signifikanten Beitrag zur frühen depolarisierenden GABA-Wirkung leistet. Daraus folgt auch, dass der Transportmechanismus, der Cl^- in das Neuron pumpt und, damit ein im Verhältnis zum Ruhemembranpotential positives $E_{(\text{GABA})}$ aufbaut, im visuellen CS weiterhin unbekannt bleibt. Kongruente Ergebnisse konnten in Präparationen aus dem inferioren Colliculus (Vale et al., 2003) und dem auditorischen Hirnstamm (Balakrishnan et al., 2003) gewonnen werden. Interessanterweise zeigen NKCC1 knock-out Mäuse keinen auffälligen Phänotyp, obwohl sie keine entwicklungsabhängige GABA_A -vermittelte Depolarisation zeigten (Sung et al., 2000). Anscheinend ist nicht ein Transporterprotein allein für das Aufrechterhalten der Chloridhomöostase verantwortlich. Es bleibt die Frage, welches Transportprotein, wenn nicht NKCC1, ein positives $E_{(\text{GABA})}$ im Verhältnis zum Ruhemembranpotential in unreifen Neuronen des CS aufbaut. Möglicherweise spielt hier das $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Transportprotein AE3 eine Rolle, welches bereits in einer Reihe anderer Hirnregionen beschrieben wurde (Kobayashi et al., 1994).

Die beobachtete Koinzidenz zwischen der entwicklungsabhängigen Aufregulation von KCC2 und der Verschiebung von $E_{(\text{GABA})}$ zu negativeren Werten beweist keinen kausalen Zusammenhang. Ein solcher Zusammenhang wurde jedoch durch *kcc2 knock-down* Experimente wahrscheinlich gemacht. Die resultierende Blockade der KCC2 Expression führte zu einem nahezu kompletten Verschwinden des negativen (hyperpolarisierenden) Gleichgewichtspotentials für GABA_A -vermittelte Ströme (Rivera et al., 1999).

Es ist wahrscheinlich, dass NDAE in der Lage sind, unabhängig von KCC2, Chlorid aus dem Neuron zu transportieren (Gulacsi et al., 2003). Das würde auch die residuale hyperpolarisierende GABA_A Wirkung, die in diesen Experimenten beobachtet wurde, erklären. Auch die hier präsentierten Ergebnisse sprechen dafür, dass nicht KCC2

alleine die neuronale $[Cl^-]_i$ reguliert. Weitere Untersuchungen sollten folgen, um die Rolle der NDAE bzw. AE in der Regulation der neuronalen $[Cl^-]_i$ aufzuklären.

Die hier vorgestellten Ergebnisse liessen keinen Einfluss der KCC2-Expression auf den Zeitpunkt des Wechsels der GABA-Wirkung erkennen. KCC2-mRNA war bereits vor der Umkehr der GABA-Wirkung vorhanden. Darüberhinaus zeigte sich in *bdnf*^{-/-}-Neuronen bei anscheinend gleicher KCC2-Expression eine gestörte Chloridhomöostase. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen dem Vorhandensein von KCC2 und dem Fehlen der hyperpolarisierenden GABA-Wirkung, ist eine entwicklungsabhängige Regulation auf funktionaler Ebene. Vorstellbar wäre ein entwicklungsabhängiger Einbau von KCC2 in die neuronale Zellmembran. Eine entwicklungsabhängige Membrantranslokation wurde bereits im auditorischen Hirnstamm beschrieben (Balakrishnan et al., 2003). Auch die vorliegenden Daten sprechen für eine entwicklungsabhängige Regulation der Membrantranslokation.

Ein interessantes Ergebnis dieser Studie ist, dass im weiteren Verlauf der postnatalen Entwicklung, nämlich zum Zeitpunkt P5 *bdnf*^{-/-}-Neurone die Störung der KCC2 Membrantranslokation funktionell kompensieren konnten, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass redundante Transportmechanismen existieren, die zur Chloridhomöostase beitragen. Bedenkt man den engen Zusammenhang zwischen $[Cl^-]_i$ und der Regulation des neuronalen pH und des Zellvolumen, ist es nicht verwunderlich, dass dem Neuron zur Regulation dieser wichtigen Parameter mehr als ein Regulator zur Verfügung steht. Gestützt wird diese Hypothese durch die von Becker et al. (2003) vorgestellte Arbeit, die die entwicklungsabhängige Expression von sechs Chlorid-Transporter Genen im auditorischen Hirnstamm untersuchten und den Bikarbonat-Chlorid-Transporter AE3 als massgebliches Regulatorprotein für die neuronale Chlorid-Homöostase identifizieren konnten.

Die selektive Blockade der beteiligten Proteine könnte ein vielversprechender experimenteller Ansatz sein, die Bedeutung des individuellen Proteins für die $[Cl^-]_i$ zu erhellen. Bedauerlicherweise sind momentan keine Pharmaka verfügbar, die als selektive K^+ - Cl^- -Kotransporter-Antagonisten funktionieren. Zwei Substanzen, Furosemid und DIOA (R(+)-((2-n-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl)oxy)acetat), sind verbreitet im Gebrauch, haben aber deutliche Effekte auf Enzym- und Rezeptorfunktionen. Insbesondere sollte darauf aufmerksam gemacht werden, dass beide Substanzen eine höhere Affinität zu NKCC1 als zu KCC2 haben (Payne, 1997) und, dass sie auch die Karboanhydratase hemmen (Supuran et al., 2003).

4.3 Die Wirkung von BDNF auf die entwicklungsabhängige Regulation von $E_{(GABA)}$

In dieser Studie konnte eine entwicklungsabhängige Verschiebung von $E_{(GABA)}$ zu negativeren Werten, und damit das Verlieren der Fähigkeit von GABA Kalziumsignale zu erzeugen, demonstriert werden. In anderen *in vivo* Präparationen, etwa des Neocortex, zeigte sich eine entwicklungsabhängige Verschiebung von $E_{(GABA)}$ hin zu negativeren Werten während der ersten zwei postnatalen Wochen (Owens et al. 1996). In Kulturen des ventralen Mittelhirns trat K-Cl-Cotransport, und damit ein negativeres $E_{(GABA)}$ früher auf als in Neuronen, die aus der hippocampalen Anlage stammten. Das *in vivo* beobachtete zeitliche Muster bleibt also *in vitro* erhalten.

In hippocampalen Neuronen führte die Inkubation mit IGF-1 zu einem deutlich früheren Auftreten des K-Cl-Cotransportes (Kelsch et al., 2001). In Neuronen ohne aktiven Transporter wurde KCC2 sofort aktiviert, wenn IGF-1 und eine zytosolische Proteintyrosinkinase appliziert wurden. IGF-1 oder die zytosolische Proteintyrosinkinase allein hatten keine Wirkung. Somit hatte die zytosolische Proteintyrosinkinase einen permissiven Effekt auf die Wirkung des IGF-1.

Man kann schlussfolgern, dass der Mechanismus, der KCC2 aktiviert und dadurch zur hyperpolarisierenden Hemmung führt, ein Wachstumsfaktor ist, der im Zusammenspiel mit zytosolischen Proteintyrosinkinasen wirkt. Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass in colliculären Neuronen BDNF einer dieser Wachstumsfaktoren ist.

Das Fehlen von BDNF verzögert die entwicklungsabhängige Verschiebung von $E_{(GABA)}$. Diese Arbeit erweitert frühere Studien, die eine wichtige Rolle für BDNF in der Reifung der GABAergen synaptischen Transmission vorgeschlagen haben. Hier wurde gezeigt, dass BDNF Defizienz die exzitatorische Phase der GABA-Wirkung verlängert. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Soriano und Mitarbeitern (Aguado et al. 2003), die zeigen konnten, dass BDNF den entwicklungsabhängigen Wechsel der GABA-Wirkung kontrolliert. Dazu wurde eine Präparation gewählt, die BDNF überexprimiert, was sich in reduzierten Amplituden Muscimol-induzierter Kalziumsignale und in einem erhöhtem Gehalt an KCC2-mRNA in E19 Neuronen des Hippocampus manifestierte. In dem vorliegenden Präparat zeigten sich keine signifikanten

Unterschiede bezüglich des KCC2-mRNA Gehaltes. Ein neues Ergebnis dieser Studie ist, dass die BDNF-abhängigen Unterschiede der GABA-Wirkung um den Zeitpunkt des Wechsels von Depolarisation zu Hyperpolarisation auf Unterschiede in der Lokalisation von KCC2 zurückzuführen sind. Die Insertion von KCC2 in die neuronale Plasmamembran scheint von BDNF gefördert zu werden. Unter der Annahme, dass BDNF, PKC-Aktivierung und/oder hohe $[Ca^{2+}]_i$ zu einer Unterdrückung der GABA_AR-Aktivität führen, und dass niedrige GABA_AR Aktivität die Genese inhibitorischer Synapsen fördert (Meier et al. 2003), könnte man erwarten, dass große BDNF-Mengen zu einer gesteigerten Genese inhibitorischer Synapsen führen. In der Tat wurde gezeigt, dass die Überexpression von BDNF im spätpränatalen Hippocampus in einer Hochregulation der KCC2 mRNA Expression und einer erhöhten Anzahl an inhibitorischen synaptischen Terminalien resultiert (Aguado et al. 2003). Gegensätzliche Effekte konnten an reifen Neuronen des Hippocampus demonstriert werden. Die Exposition akuter Hippocampusschnitte mit magnesiumfreier ACSF führte zu einer Induktion interiktaler spontaner Aktivität, die ihrerseits eine erhöhte BDNF-Freisetzung zur Folge hat. Die resultierende TrkB-Rezeptor-Aktivierung führte dann zur Abregulation von KCC2 (Rivera et al., 2004). Die offensichtlich gegensätzlichen Wirkungen von BDNF auf die KCC2-Expression in unreifen und reifen Neuronen spiegelt wahrscheinlich die Aktivierung unterschiedlicher TrkB-vermittelter Signalwege wider (Abb. 3). Beide PLC γ -und Shc-Bindungsstellen von TrkB sind notwendig um die BDNF–TrkB–vermittelte Abregulation von KCC2 zu erreichen, wogegen eine KCC2 Aufregulation über eine isolierte Shc Bindung zu erzielen ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass sich, zumindest im CS, die BDNF-Wirkung auf die Aktivitätsregulation von KCC2 beschränkt. Das Transportprotein wird dabei BDNF-abhängig in die neuronale Plasmamembran eingebaut und aktiviert. Eine direkte Aktivitätsregulation von KCC2 durch BDNF konnte in Xenopus-Oozyten gezeigt werden. Die KCC2-Transporterfunktion wird dabei durch Veränderung eines Tyrosin-Rests der Kinase reguliert (Strange et al., 1999)

4.4 Funktionelle Auswirkungen auf die inhibitorische Synaptogenese im CS

Depolarisierende GABAerge synaptische Aktivität und der resultierende Kalzium-Einstrom können die Genese und Differenzierung der Synapsen beeinflussen. Vergleichbar mit der Rolle der NMDA-Rezeptoren in der Entwicklung glutamaterger Synapsen im *Tectum opticum* (TO) scheinen depolarisierende GABA_AR die inhibitorische Synaptogenese zu stimulieren. Im caudalen TO kennzeichnet das Fehlen von AMPA-Rezeptoren den unreifen Zustand der glutamatergen synaptischen Transmission. In dieser Phase finden sich ausschliesslich NMDA-Rezeptoren auf der postsynaptischen Seite glutamaterger Terminalien, deren Aktivierung mit resultierendem Kalzium-Einstrom die Voraussetzung für die Insertion von AMPA-Rezeptoren ist. Die aktivitätsabhängige Transformation von „nur-NMDA-“ zu „NMDA- und-AMPA-“ Synapsen ist anerkannterweise ein grundlegender Mechanismus der Reifung der glutamatergen synaptischen Transmission. Außerdem wurde gezeigt, dass im Hippokampus depolarisierende GABA_AR zur Generierung spontaner intrazellulärer Kalzium-Oszillationen beitragen, die ihrerseits die Formation von glutamatergen Synapsen fördern (Ben-Ari et al., 1997; Davies et al., 1998).

Im CS der Nagetiere beginnt die Genese von inhibitorischen Synapsen am embryonalen Tag 17 und dauert etwa sechs Wochen an (Grantyn et al. 2004). Bereits am zweiten postnatalen Tag funktioniert GABA als inhibitorischer Transmitter, da GABA_AR Antagonisten eine Disinhibition spontaner Aktionspotentialentladungen bewirken (Jüttner et al. 2001). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt und erweitert werden. Es wurde gezeigt, dass der Verlust der depolarisierenden Antworten auf GABA zwischen P1 und P2 stattfindet. Diese kurze Übergangsperiode spricht für eine geringe Variabilität in der Entwicklungsstufe der untersuchten individuellen Neurone und unterstreicht, dass es sich jeweils um den gleichen Zelltyp handelt.

Demzufolge löst die Aktivierung von GABA_AR nur in einem engen Zeitfenster von fünf Tagen, zwischen E17 und P2, auffällige Kalziumsignale aus. Im Vergleich zu anderen Präparationen erscheint der Wechsel von GABAerger Exzitation zur Inhibition im CS der untersuchten Tiere zu einem relativ frühen Zeitpunkt stattzufinden. In zerebellären Purkinjezellen wurde dieser Wechsel zwischen P 5 und P7 demonstriert (Eilers et al., 2001). Deutlich zeigt sich aber auch hier ein enges Zeitfenster von nur

acht Tagen für GABA-induzierte Kalziumsignale. Gleichfalls ist zu diesem Zeitpunkt die inhibitorische Synaptogenese bei weitem noch nicht abgeschlossen. Das erlaubt folgende zwei Rückschlüsse: A) Die große Mehrheit der Synapsen des CS wird ohne die Mitwirkung GABA-induzierter Kalziumsignale gebildet. Dies würde in direktem Widerspruch zu dem von Kirsch und Betz (1998) postulierten Szenario stehen. B) Inhibitorische Synapsen werden nur an solchen Stellen gebildet, an denen KCC2 fehlt. Eine mögliche Antwort auf diese Frage wurde von Hübner und Kollegen (2001b) geliefert, die gezeigt haben, dass KCC2 vorwiegend postsynaptisch angereichert wird und dort mit Gephyrin kolokalisiert. Es ist somit vorstellbar, dass es, über die gesamte Plasmamembran gesehen, regionale Unterschiede in der Wirkung von GABA_AR gibt, je nachdem ob die Rezeptoren in der extrasynaptischen Plasmamembran (Abwesenheit von KCC2) oder aber in inhibitorischen postsynaptischen Domänen (Anwesenheit von KCC2) aktiviert werden. Damit wäre das Konzept der kalziumabhängigen inhibitorischen Synaptogenese weiterhin gültig.

Die vorliegende Arbeit gibt Hinweise, dass dieses Konzept auf den visuellen CS übertragbar ist. Unter der Voraussetzung GABA-induzierter Kalziumsignale, sollte die Blockade von GABA_AR oder Kalziumkanälen einen Effekt auf die Synapsenentwicklung haben. In der Tat konnte dieser Effekt demonstriert werden (Meier et al. 2003). Über eine PKC-Aktivierung konnte die inhibitorische Synaptogenese stimuliert werden. BDNF aktiviert PKC über seinen hochaffinen Rezeptor TrkB. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Hypothese zu, dass BDNF die inhibitorische Synaptogenese über eine lokale Aktivitätsregulation von KCC2 fördert.

4.5 Grenzen des methodischen Ansatzes

Zur Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in einer Zelle stehen eine Vielzahl von Indikatorfarbstoffen zur Verfügung. Kalziumindikatoren werden gerne eingesetzt, da die $[Ca^{2+}]_i$ ein ungefähres Maß für den Erregungszustand einer Zelle darstellt: wenn eine Zelle depolarisiert, dann öffnen sich spannungsabhängige Kalziumkanäle – diese sind in nahezu jeder Nervenzelle vorhanden – und es kommt zum Einstrom von freien, d.h. ungebundenen Kalziumionen. Die resultierende Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in der Zelle bewirkt, dass mehr Kalzium von den Indikatormolekülen gebunden werden kann und sich das Gleichgewicht zwischen freiem Indikator und an Kalzium gebundenem Indikator

verschiebt. Diese Gleichgewichtsverschiebung kann schließlich als Änderung der Fluoreszenz gemessen werden (Grynkiewicz et al. 1985). Man sollte allerdings bedenken, dass spannungsabhängige Kalziumkanäle in der Regel nicht die einzige Quelle für freies Kalzium sind. Kalzium kann auch durch einige Neurotransmitterrezeptoren (z.B. Glutamatrezeptoren vom NMDA-Typ) in die Zelle fließen oder aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden. Diese alternativen Kalziumquellen können die Interpretation eines gemessenen Kalziumsignals erschweren. Wie alle ionenselektiven Indikatorfarbstoffe verhalten sich auch Kalziumindikatoren wie Chelatbildner, d.h. zu einem gewissen Grad puffern sie freies Kalzium in der Zelle und können damit die Messung verfälschen. Daher ist es wichtig, einen Indikator mit der 'passenden' Kalziumaffinität in einer 'geeigneten' Konzentration einzusetzen. Die Messungen zeigten auch eine inhomogene Verteilung der Fluoreszenzintensität innerhalb des Zytosols vieler Nervenzellen. Dieser Heterogenität liegt wahrscheinlich eine erhöhte Affinität von Oregon-Green 488 BAPTA-1 zu subzellulären Strukturen zugrunde. Es scheint jedoch, dass die derart *geclusterten* Oregon-Green-Moleküle frei für Kalzium zugänglich sind, da infolge einer GABA_A-Rezeptor-Aktivierung die Fluoreszenzänderung in allen Bereichen der Zelle homogen ist.

4.6 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Die pharmakologische Modulation der inhibitorischen Wirkung des Neurotransmitters GABA wird in der klinischen Praxis häufig genutzt. Benzodiazepine, Barbiturate, Propofol, Etomidat, volatile Anästhetika, Valproat, Topiramid wirken teils als echte Agonisten, teils wirkungsverstärkend, Gabapentin erhöht die extrazelluläre Konzentration von GABA durch eine erhöhte Freisetzung, Vigabatrin und Tiagabin hemmen den Abbau (Czuczwar und Patsalos, 2001). In der klinischen Therapie werden diese Substanzen unter anderem zur Behandlung von Epilepsien, von Angst- und Spannungszuständen und von Schlafstörungen eingesetzt.

Aufgrund der Wirkung von GABA als trophischer Faktor im unreifen Nervengewebe stellt sich die Frage, ob die Einnahme dieser Substanzen während einer Schwangerschaft und/oder im Neugeborenenalter zu einer Beeinflussung der Reifung des kindlichen Gehirns führt. Auswirkungen von Kurzzeitanwendungen zur Sedierung (Benzodiazepine), Narkoseinduktion (Propofol, Etomidat, Barbiturate, volatile

Anästhetika) oder supportiven Schmerztherapie (Benzodiazepine, Gabapentin) sind hinsichtlich einer Beeinflussung der Neuronenreifung kaum zu evaluieren, aber nicht sicher auszuschliessen. So kann etwa die Frage besorgter Eltern, ob häufige Narkosen im Säuglingsalter potentiell schädlich für die Entwicklung des Kindes seien, nicht ausdrücklich verneint werden.

Einige Studien berichteten ein erhöhtes Vorkommen teratogener Schäden infolge von Benzodiazepinen während der Schwangerschaft (Laegreid et al., 1992; Bergmann et al., 1992). Allerdings bestand laut Aussage der Autoren kein eindeutiger kausaler Zusammenhang zwischen Benzodiazepinen und teratogenen Schäden, da häufig ein gleichzeitiger Mißbrauch von Alkohol und einer Reihe anderer Substanzen vorlag (Bergman et al., 1992).

Deutlichere Hinweise auf die Folgen einer pränatalen Langzeitexposition mit Benzodiazepinen auf die Gehirnentwicklung geben Studien an Tiermodellen. Beispielsweise beeinflussten trächtigen Ratten verabreichte Benzodiazepine die Verhaltensentwicklung der Nachkommen bis in deren Erwachsenenalter. Es kam unter anderem zu einer erhöhten Aggressionsbereitschaft (Singh et al., 1998) und veränderten Bewegungs- und Eßgewohnheiten (Fiore et al., 1995). Molekularbiologische Untersuchungen an Rattengehirnen zeigten, dass der intrauterine Kontakt mit Benzodiazepinen eine veränderte Expression der mRNA von GABA-Rezeptoruntereinheiten in Feten zur Folge hatte (Roberts et al., 2001). Zusätzlich kam es in adulten Tieren zu einer verminderten Expression des Wachstumsfaktors BDNF (Kellogg et al., 2000). Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass in einem Reifestadium, in dem GABA Kalziumsignale in Nervenzellen hervorruft, die Anwendung GABAmimetischer Pharmaka gravierende Folgen für die Hirnentwicklung haben kann.

Die klinische Relevanz von BDNF ergibt sich zum einen aus der beschriebenen Eigenschaft als neurotropher Faktor, zum anderen aus der Fähigkeit, die synaptische Transmission zu steuern. So wurde spekuliert, dass die drastische Reduktion von BDNF-mRNA im parietalen Cortex beim Morbus Alzheimer als eine Ursache des Funktionsverlusts cholinergischer Neurone in Betracht kommt (Holsinger et al., 2000). Beim Morbus Parkinson – einer weiteren neurodegenerativen Erkrankung – kommt es zu einer Reduktion von BDNF in der *Pars compacta* der *Substantia nigra*, weshalb auch hier das Fehlen von neurotrophen Faktoren als möglicher Grund für den Verlust dopaminergischer Neurone anzusehen ist (Parain et al., 1999; Baquet et al., 2005). Als

therapeutischer Ansatz liegt es nahe den Mangel an BDNF auszugleichen. Tatsächlich konnte BDNF das Überleben nigraler dopaminerger Neurone der pars compacta im MPP+ Modell der Parkinsonschen Krankheit begünstigen, allerdings nur bei direkter, lokaler Applikation durch Implantation von BDNF-freisetzenden transfizierten Fibroblasten (Levivier et al., 1995).

Darüber hinaus zeigten neuere Befunde, dass BDNF wesentlich am Überleben der Striatum-Neurone im gesunden Gehirn beteiligt ist und dass die Konzentration von BDNF beim Morbus Huntington im Striatum auffällig erniedrigt ist. Der Zusammenhang zwischen beiden Befunden blieb jedoch bisher unklar. Da BDNF im Striatum selbst nicht synthetisiert werden kann, muss der Wachstumsfaktor von seinem Herstellungsort in der Großhirnrinde zum Striatum hin transportiert werden. Dieser Transport erfolgt im gesunden Gehirn entlang von Nervenfasern, die aus dem Großhirn zum Striatum ziehen. Dort wird BDNF aus den Endigungen der Nervenfasern ausgeschüttet und entfaltet seine lebenserhaltende Wirkung auf die Neurone des Striatums. Das mutierte Huntingtin hemmt nun allerdings die Wechselwirkung der BDNF enthaltenden Vesikel mit den Mikrotubuli in den Nervenfasern. Da in der Folge zu wenig BDNF in das Striatum gelangt, kommt es dort zum Neuronensterben (Gauthier et al., 2004).

Leider konnten klinische Studien zum therapeutischen Einsatz von BDNF bei verschiedenen anderen neurodegenerativen Erkrankungen bisher keine Wirksamkeit belegen (Tuszynski et al., 2002).

Neuere Studien zeigen, dass exogen zugeführte Neurotrophine einen Antidepressiva- ähnlichen Effekt haben. Die Neurotrophinausschüttung ist umgekehrt unter der Gabe von Antidepressiva erhöht (Einat et al., 2003). Neurotrophine könnten so über Antidepressiva die Bildung und Stabilisierung von synaptischen Verbindungen bewirken. Über diesen Mechanismus könnten Neurotrophine für den depressionslösenden und stimmungstabilisierenden Effekt der Medikamente verantwortlich sein.

Zusätzlich fördern Neurotrophine das Wachstum neuer Zellen im Hippocampus. Über einen ähnlichen Mechanismus könnten diese Medikamente auch vor den Einschränkungen der Lernfähigkeit im Alter schützen (Hashimoto et al. 2004).