

Aus dem Johannes-Müller-Institut für Physiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

D I S S E R T A T I O N

**Neurotrophinerge Modulation der GABAergen  
Hemmung im Colliculus superior der Maus**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Christian Henneberger  
aus Berlin

Dekan:

Prof. Dr. Joachim Dudenhausen

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Grantyn

2. Prof. Dr. H. Kettenmann

3. Prof. Dr. R. Menzel

Datum der Promotion: 3. November 2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Inhibitorische synaptische Transmission im zentralen Nervensystem	1
1.2 Bedeutung neurotropher Faktoren . . . . .	3
1.3 Neurotrophinerge Modulation der GABAergen synaptischen Transmission . . . . .	6
1.4 GABAerge synaptische Transmission im Colliculus superior . . .	8
1.5 Neurotrophine und ihre Rezeptoren im Colliculus superior . . .	10
1.6 Aufgabenstellung . . . . .	12
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1 Verwendete Chemikalien und Präparation . . . . .	14
2.2 Elektrophysiologische Messungen . . . . .	15
2.3 Rechnergestützte Auswertung der elektrophysiologischen Daten	17
2.4 Genotypisierung . . . . .	19
2.5 Semiquantitative mRNA-Bestimmung durch RT-PCR . . . . .	21
2.6 Immunhistochemie . . . . .	23
2.7 Analyse der erhobenen Daten . . . . .	24
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1 Einfluss von BDNF auf die Dichte und die passiven Eigenschaften colliculärer Neurone . . . . .	25
3.2 BDNF-abhängige Modulation der Entladungsrate colliculärer Neurone . . . . .	26
3.2.1 Pharmakologische Charakterisierung spontaner Aktionspotentiale . . . . .	26
3.2.2 Postnatale Entwicklung des Entladungsverhaltens von <i>bdnf</i> <sup>+/+</sup> Mäusen . . . . .	28
3.2.3 BDNF erhöht die Entladungsrate colliculärer Neurone . .	28
3.2.4 Das intrinsische Entladungsverhalten colliculärer Neurone wird von BDNF nicht beeinflusst . . . . .	29

3.2.5	BDNF erhöht die Entladungsrate durch Modulation der GABAergen Hemmung . . . . .	31
3.3	Postsynaptische Suppression der GABAergen Transmission durch BDNF . . . . .	32
3.3.1	BDNF senkt die Amplitude spontaner und evozierter GABA-erger IPSC . . . . .	33
3.3.2	Die Amplitude GABAerger mIPSC, nicht jedoch deren Frequenz wird durch BDNF moduliert . . . . .	34
3.3.3	BDNF führt nicht zu einer Änderung des Paarpulsverhaltens . . . . .	37
3.3.4	Die Anzahl inhibitorischer Boutons wird durch BDNF nicht verändert . . . . .	38
3.4	Mechanismen der BDNF-Wirkung an der GABAergen Synapse .	38
3.4.1	Abwesenheit von BDNF führt zur Sättigung postsynaptischer Rezeptoren . . . . .	39
3.4.2	Die Expression von GABA-Rezeptor-Untereinheiten wird durch BDNF gesteuert . . . . .	41
3.4.3	Exogenes BDNF wirkt PKC-abhängig . . . . .	43
3.5	Der Einfluss von BDNF auf die Reifung GABAerger Synapsen .	45
3.5.1	BDNF moduliert die Entwicklung der GABAergen synaptischen Transmission . . . . .	45
3.5.2	BDNF- und TrkB-mRNA-Expression ändern sich durch die Augenöffnung nicht . . . . .	48
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>50</b>
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerung . . . . .	50
4.2	Einfluss von BDNF auf die spontane Entladungsrate . . . . .	51
4.3	Postsynaptische Mechanismen der BDNF-Wirkung . . . . .	53
4.3.1	Expression von GABA-Rezeptor-Untereinheiten . . . . .	54
4.3.2	Phosphorylierung von GABA-Rezeptoren . . . . .	56
4.3.3	Internalisierung und Diffusion von postsynaptischen Rezeptoren . . . . .	57
4.3.4	BDNF als Modulator der lokalen Proteinsynthese . . . . .	58
4.4	Fehlen präsynaptischer Effekte von BDNF . . . . .	58
4.5	Herkunft von BDNF und Lokalisation von TrkB . . . . .	60
4.6	Einfluss von BDNF auf die Entwicklung GABAerger Synapsen .	62
4.7	Zeitlicher Verlauf der BDNF-Wirkung an der GABAergen Synapse	63

<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>65</b>
<b>A. Danksagung</b>	<b>67</b>
<b>B. Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>C. Eigene Veröffentlichungen</b>	<b>80</b>
<b>D. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>E. Selbständigkeitserklärung</b>	<b>87</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Inhibitorische synaptische Transmission im zentralen Nervensystem

Im zentralen Nervensystem (ZNS) ist  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) der am weitesten verbreitete inhibitorische Neurotransmitter (Cherubini und Conti, 2001). GABA wird auf der präsynaptischen Seite durch die Glutamat-Decarboxylase (GAD) aus Glutamat synthetisiert, in präsynaptischen Vesikeln gespeichert und aus diesen in den synaptischen Spalt freigesetzt. Dort bindet es an GABA-Rezeptoren und wird durch Diffusion und GABA-Transporter (GAT) aus dem synaptischen Spalt eliminiert.

Aus der Präsynapse freigesetztes GABA kann sowohl an prä- als auch an postsynaptisch lokalisierte GABA-Rezeptoren binden, wobei die bei der Zusammensetzung verwendeten Untereinheiten die Eigenschaften des Rezeptors bestimmen. Unterschieden werden zum gegenwärtigen Zeitpunkt GABA<sub>A</sub>-, GABA<sub>B</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren. GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren sind über G-Proteine an Ca<sup>2+</sup>- und K<sup>+</sup>-Kanäle gekoppelt, können darüber hinaus jedoch in weitere intrazelluläre Signalwege einmünden und pharmakologisch von ionotropen GABA-Rezeptoren unterschieden werden (Mehta und Ticku, 1999). Zu den ionotropen GABA-Rezeptoren gehören die GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren, wobei letztere sich durch den Einbau von  $\rho$ -Untereinheiten auszeichnen. Auch diese unterscheiden sich von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in ihren pharmakologischen Eigenschaften – insbesondere werden sie nicht durch Bicucullin blockiert oder Benzodiazepine moduliert (Mehta und Ticku, 1999).

Hinsichtlich des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors besteht momentan Konsens dahin gehend, dass es sich hierbei um ein Pentamer handelt. Zusammengesetzt wird er aus einer Vielzahl möglicher Untereinheiten. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden die Untereinheiten  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-4}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  und  $\pi$  und  $\rho_{1-3}$  identifiziert (Cherubini und Conti, 2001) (Abb. 1.1C). Da von den einzelnen Untereinheiten zusätzlich noch Splice-Varianten existieren, ist eine unüberschaubare Anzahl von Kombinationen denkbar. Momentan geht man jedoch davon aus, dass ein GABA<sub>A</sub>-Rezeptor entweder aus zwei  $\alpha$ , zwei  $\beta$  und einer  $\gamma$  oder aber aus zwei  $\alpha$ , einer  $\beta$  und zwei  $\gamma$  Untereinheiten zusammengesetzt wird (Mehta und Ticku, 1999) (Abb. 1.1).

Nach Aktivierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors durch GABA kommt es zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit für Chloridionen (Cl<sup>-</sup>). Je nach Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Cl<sup>-</sup>-Konzentration kommt es zum Ein- oder Ausstrom von Cl<sup>-</sup> und damit zu einer Hyper- oder

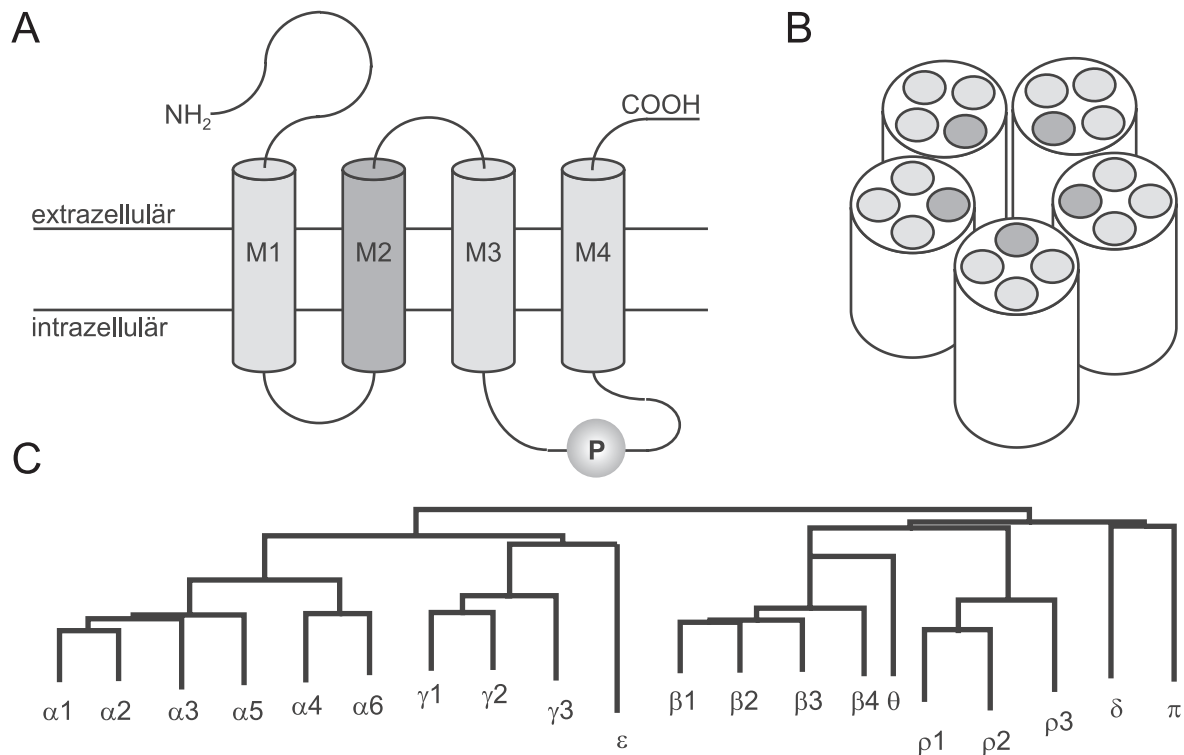


Abbildung 1.1: Aufbau des GABA-Rezeptors nach [Cherubini und Conti \(2001\)](#). A: GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten bestehen aus einem langen extrazellulären N-Terminus, vier Transmembrandomänen (M1-M4), einer intrazellulären Schleife zwischen den Abschnitten M3 und M4, welche Phosphorylierungsstellen enthält, sowie einem relativ kurzen extrazellulären C-Terminus. B: GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind Pentamere. Der zentrale Cl<sup>-</sup>-Kanal wird durch die fünf M2-Domänen gebildet. C: Verwandtschaftsgrad der verschiedenen GABA-Rezeptor-Untereinheiten.

Depolarisation. Unabhängig von der Veränderung des Membranpotentials können zusätzlich durch die Verringerung des Membranwiderstands distale, exzitatorische Eingänge unterdrückt werden („Shunt“-Mechanismus).

Sowohl die Hyperpolarisation als auch der Shunt-Mechanismus tragen im adulten ZNS zur schnellen, inhibitorischen synaptischen Transmission bei, die in verschiedenen physiologischen Prozessen wie der Netzwerksynchronisierung, der Generierung von Theta- oder Gamma-Rhythmen und nicht zuletzt bei kognitiven Funktionen eine herausragende Rolle spielt. Die GABAerge Inhibition spielt darüber hinaus eine wesentliche Rolle in der Genese und Pathophysiologie der Epilepsie ([Olsen et al., 1999](#)), und bietet Angriffspunkte für eine große Anzahl klinisch wirksamer Pharmaka.

Aufgrund der bereits angedeuteten Komplexität der GABAergen Inhibition ergibt sich eine Vielfalt an möglichen Modulationen. Auf jeder der erwähnten Ebenen – Präsynapse, synap-

tischer Spalt und Postsynapse – ist eine Steuerung der GABAergen Hemmung möglich. So kann die Anzahl der GABAergen Kontakte, die Synthese von GABA, das Beladen der präsynaptischen Vesikel, das Freisetzungsverhalten oder die Wiederaufnahme von GABA an der Präsynapse durch äußere Einflüsse verändert sein, während an der Postsynapse die große Anzahl möglicher Rezeptorzusammensetzungen, die Leitfähigkeit des einzelnen Rezeptors, deren Anzahl oder der Phosphorylierungszustand des Rezeptors als mögliches Ziel steuernder Mechanismen in Betracht kommen. Nicht zuletzt haben die Wiederaufnahme von GABA und die Diffusion aus dem synaptischen Spalt Einfluss auf die Eigenschaften der inhibitorischen Transmission. Dies verdeutlicht die Probleme, die bei dem Versuch einer eindeutigen Zuordnung zwischen einem modulierenden Faktor und einem bestimmten Wirkungsmechanismus entstehen.

## 1.2 Bedeutung neurotropher Faktoren

Die Entwicklung des peripheren und zentralen Nervensystems wird unter anderem von Neurotrophinen (NT) gesteuert (Huang und Reichardt, 2001). Klassischerweise werden sie als Überlebensfaktoren verstanden. Zum Beispiel führt das Fehlen von BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) zu einer drastischen Verringerung der Neuronzahl in peripheren sensorischen und sympathischen Ganglien (Ernfors et al., 1994; Klein, 1994), zu verlangsamtem neuronalen Wachstum und zu reduzierter axonaler Myelinisierung im ZNS (Cellerino et al., 1997).

Neurotrophine stellen eine Klasse diffundibler Neuropeptide dar, deren Prototyp NGF (nerve growth factor) bereits in den 50er Jahren entdeckt wurde (Levi-Montalcini et al., 1954). Darüber hinaus gehören fünf weitere Proteine zu den Neurotrophinen: BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6 und NT-7, wobei NT-6 und NT-7 bisher nur bei Fischen gefunden wurden und höchstwahrscheinlich für Säugetiere bedeutungslos sind (Huang und Reichardt, 2001). Sie kommen in Form nicht-kovalent gebundener Homodimere als auch als Heterodimere vor und werden in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität freigesetzt.

Neurotrophine können in sekretorischen Vesikeln gespeichert werden, die in unmittelbarer Nähe von Synapsen lokalisiert sind (Haubensak et al., 1998). Darüber hinaus ist bekannt, dass eine durch Kaliumchlorid (KCl) induzierte Depolarisation in hippokampalen Neuronen die Freisetzung von BDNF ebenso erhöht wie die Hochfrequenzstimulation glutamaterger Synapsen (Griesbeck et al., 1999; Hartmann et al., 2001), wobei ein Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  sowohl die Sekretion auslöst als auch die Transkription von BDNF selbst steigert (Hartmann et al., 2001; Tao et al., 2002).

Ob es sich bei der Freisetzung von BDNF um ein antero- oder retrogrades Signal mit auto- oder parakrinem Wirkungsweg handelt, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch offen. Sowohl



ein anterograde, axonaler Transport und postsynaptische Internalisierung von BDNF (Kohara et al., 2001; Caleo et al., 2000) als auch die postsynaptische Freisetzung von BDNF mit anschließender Wirkung an der präsynaptischen Terminalie (Hartmann et al., 2001) wurden beschrieben.

Jedes der Neurotrophine bindet mit niedriger Affinität an den p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor, welcher zur Familie der TNF-Rezeptoren gehört. Hochaffine und spezifischere Bindungen gehen Neurotrophine mit Tyrosinkinase-Rezeptoren (Trk) ein. Von diesen sind drei – TrkA, TrkB und TrkC – bekannt. Das hier interessierende Neurotrophin BDNF bindet hochspezifisch an TrkB, das auch als Rezeptor für NT-4/5 und NT-3 dienen kann. TrkA- und TrkC-Rezeptoren besitzen jedoch für BDNF keine nennenswerte Affinität (Abb. 1.2A). Die Vielfalt an Neurotrophin-Rezeptoren wird durch verschiedene Splice-Varianten weiter erhöht. Vom TrkB-Rezeptor sind zusätzlich zum vollständigen Rezeptor TrkB.FL eine ganze Reihe von Rezeptorvarianten mit verkürzten intrazellulären Domänen (u.a. TrkB.T1) bekannt (Barbacid, 1994; Stoilov et al., 2002).

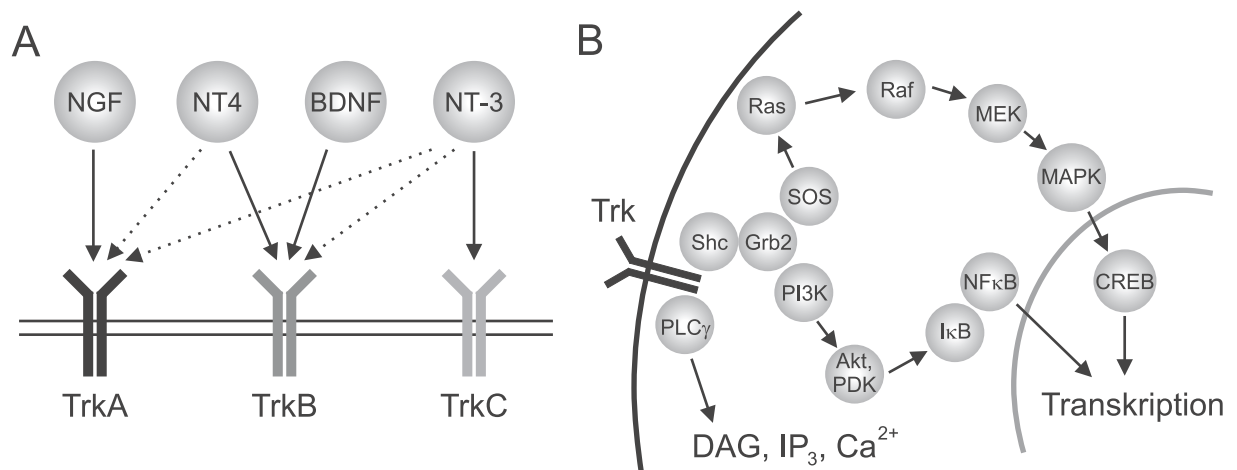


Abbildung 1.2: Neurotrophine und ihr Signalweg. A: Affinitäten der einzelnen Neurotrophine zu den verschiedenen Trk-Rezeptoren nach Barbacid (1994) und Klein (1994). Niedrige Affinitäten sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. B: Intrazelluläre Signalkaskade des Trk-Rezeptors (vereinfacht nach Patapoutian und Reichardt (2001) und Gunn-Moore und Tavaré (1998)).

Die Bindung von BDNF an den TrkB-Rezeptor führt zur Dimerisation zweier TrkB-Rezeptoren, die intrazellulären Tyrosinreste werden phosphoryliert und stoßen über Adapterproteine eine Vielzahl intrazellulärer Signalkaskaden an (Huang und Reichardt, 2001). Die drei wesentlichen Signalwege nehmen ihren Ausgang von der Aktivierung der Phospholipase C (PLC)  $\gamma$ , von Ras und der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Insbesondere die letzteren steuern die Transkription verschiedener Gene - unter anderem der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha_{1,6}$  und  $\gamma_2$  (Bulleit und Hsieh, 2000).

Diesen langsamen und letztlich auf einer Steuerung der Transkription beruhenden Signalwegen steht der schnelle PLC- $\gamma$ -vermittelte Anstieg von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und sukzessive des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> gegenüber. Damit sind die Voraussetzungen für die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) wie auch Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-regulierter Kinasen und Phosphatasen gegeben (Huang und Reichardt, 2001).

Unklarheit besteht momentan darüber, ob freigesetztes BDNF die Proteinkinase A (PKA) aktivieren kann und wenn ja, ob es sich hierbei um einen TrkB-vermittelten Prozess handelt (Knipper et al., 1993; Cai et al., 1999; Tartaglia et al., 2001). Im Gegensatz hierzu, verdichten sich die Hinweise darauf, dass cAMP- und TrkB-abhängige Signalwege in eine gemeinsame Endstrecke einmünden können (Gaiddon et al., 1996; Tartaglia et al., 2001).

Aufgrund dieser Vielfalt intrazellulärer Signalwege kann vermutet werden, dass BDNF auf eine Reihe von Mechanismen der synaptischen Übertragung Einfluss nehmen kann.

Hier ist zunächst die hippocampale Langzeitpotenzierung (LTP) zu nennen. Diese ist bei chronischer Abwesenheit von BDNF in genmanipulierten Tieren beeinträchtigt (Korte et al., 1995; Patterson et al., 1996). Aber auch eine akute, BDNF-induzierte Veränderung der LTP durch BDNF wurde beschrieben (Minichiello et al., 2002; Kovalchuk et al., 2002). Die Erregbarkeit von Neuronen ist ein weiterer funktioneller Parameter, der durch BDNF beeinflusst wird. So hat ein Fehlen von BDNF durch die Verringerung der Dichte spannungsabhängiger Na<sup>+</sup>-Kanäle sowohl eine Reduktion der Erregbarkeit als auch funktionelle Defizite im Entladungsverhalten retinaler Ganglienzellen (RGZ) zur Folge (Rothe et al., 1999). Auf der anderen Seite kann BDNF auch durch Aktivierung eines Na<sup>+</sup>-permeablen Kanals zur Depolarisation von Neuronen führen (Kafitz et al., 1999; Blum et al., 2002), wobei momentan nicht geklärt ist, welcher Natur die Interaktion zwischen dem Na<sup>+</sup>-Kanal und dem TrkB-Rezeptor ist. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass hinsichtlich der BDNF-Wirkung auf die neuronale Erregbarkeit offensichtlich regionale Unterschiede bestehen. So konnte in hippocampalen Kulturen keine Veränderung des intrinsischen Entladungsverhaltens durch BDNF nachgewiesen werden (Bolton et al., 2000).

Die glutamaterge synaptische Transmission als das wesentliche exzitatorische Neurotransmittersystem im ZNS unterliegt ebenfalls BDNF-abhängigen Veränderungen. So konnte gezeigt werden, dass BDNF durch eine präsynaptische Modulation die Freisetzung von Glutamat erhöhen und damit die glutamaterge Exzitation verstärken kann (Lessmann und Heumann, 1998). Interessanterweise scheint dieser Effekt vom Phänotyp des postsynaptischen Neurons abzuhängen: Liegt ein GABAerges Interneuron vor, so kommt es zwar ebenso wie im Falle eines glutamatergen Neurons zu einer Erhöhung der Freisetzungswahrscheinlichkeit, nicht aber zu einer Amplitudenzunahme evozierter exzitatorischer Ströme (eEPSC) (Schinder et al., 2000).

Fehlt BDNF, so kommt es zu einer Verringerung angedockter Vesikel an der Präsynapse und

anschließend zur Beeinträchtigung der synaptischen Funktion. Dies beruht auf einer Reduktion von Synaptophysin und -brevin, wie von [Tyler und Pozzo-Miller \(2001\)](#) an exzitatorischen Synapsen im Hippokampus gezeigt werden konnte. Zusätzlich spielt BDNF durch Steuerung der Öffnungswahrscheinlichkeit von NMDA-Rezeptoren auch an der postsynaptischen Seite glutamaterger Synapsen eine bedeutende Rolle ([Levine et al., 1998](#)).

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 dopaminerger Neurone anzusehen ist ([Parain et al., 1999](#)). Weniger auf neurotrophe Wirkungen als vielmehr auf eine Modulation der neuronalen Erregbarkeit und der synaptischen Transmission ist die Rolle von BDNF bei der Entwicklung von Epilepsien zurückzuführen ([Binder et al., 2001](#)).

### 1.3 Neurotrophinerge Modulation der GABAergen synaptischen Transmission

Dass auch die GABAerge synaptische Transmission einer neurotrophinergen Modulation unterliegt, stellte sich erst kürzlich heraus ([Tanaka et al., 1997](#)). Die entscheidende Frage ist jedoch nach wie vor, in welcher Richtung und über welchen Mechanismus BDNF die GABAerge Inhibition beeinflusst.

Betrachtet man in erster Linie BDNF-induzierte morphologische Veränderungen, so besteht momentan Übereinkunft dahin gehend, dass BDNF die Reifung GABAerger 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 GABAerger Neurone ([Vicario-Abejón et al., 1998](#)). Doch auch die Morphologie der präsynaptischen Seite wird durch BDNF verändert: In hippocampalen Kulturen zeigen GAD-markierte Boutons unter BDNF eine Größenzunahme, ohne ihre Anzahl zu verändern ([Bolton et al., 2000](#)). Im Widerspruch dazu steht die Arbeit von [Murphy et al. \(1998\)](#), die im gleichen Präparat eine Zunahme der Dichte GAD-postiver Punctae durch BDNF beobachteten. In der Regel bewirkt eine Steigerung der neuronalen Aktivität eine Zunahme der Anzahl GAD-

positiver Boutons, ein Effekt der durch TrkB-Blockade mittels spezifischer Antikörper gehemmt wird (Marty et al., 2000). Dies stützt den Standpunkt, dass BDNF die Bildung GAD-positiver Boutons und damit GABAerger Synapsen fördert.

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 Inhibition 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 Synapsen auch herabsetzen und so zu einer Suppression der GABAergen Transmission führen kann.

Zusätzlich wird die Lage dadurch kompliziert, dass GABA in jungen hippocampalen Kulturen im Gegensatz zu älteren als exzitatorischer Neurotransmitter wirkt und die BDNF-Expression verstärken kann (Obrietan et al., 2002). Die postsynaptische Wirkung von GABA entscheidet also darüber, ob es eine Rückkopplung über BDNF mit zum Beispiel Modulation der präsynaptischen Freisetzungswahrscheinlichkeit geben kann oder nicht. In Präparationen mit unreifen Neuronen – zum Beispiel in Kulturen oder Hirnschnitten sehr junger Tiere –, in denen GABA noch exzitatorisch wirkt, könnten somit vollständig andere Wirkungen von BDNF beobachtet werden. Dafür spricht, dass in hippocampalen Schnitten mit reiferen Neuronen größtenteils eine BDNF-induzierte Suppression der GABAergen Inhibition beobachtet wurde (Tanaka et al., 1997; Frerking et al., 1998; Olofsdotter et al., 2000). Ob diese Suppression der GABAergen Hemmung auf eine prä- oder postsynaptische Wirkung von BDNF zurückzuführen ist, wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Sowohl für eine präsynaptische Wirkung (Frerking et al., 1998; Vicario-Abejón et al., 1998; Bolton et al., 2000; Olofsdotter et al., 2000; Baldelli et al., 2002) als auch für eine postsynaptische (Tanaka et al., 1997; Brünig et al., 2001) existieren eindrucksvolle Hinweise.

Wie schon angedeutet, könnten diese Diskrepanzen auf unterschiedliche Entwicklungsstände des jeweils untersuchten Systems zurückzuführen sein, da sowohl die GABAerge synaptische

Transmission als auch das neurotrophinerge System deutlichen entwicklungsbedingten Veränderungen unterworfen sind. So verändert sich die Expression von BDNF und TrkB-Rezeptor mit zunehmendem Alter (Klein et al., 1990; Friedman et al., 1991; Merlio et al., 1992) und ansteigender neuronaler Aktivität (Goodman et al., 1996; Griesbeck et al., 1999; Hartmann et al., 2001). Als weitere Ursachen für die deutlich verschiedenen Beobachtungen sind die BDNF-abhängige Myelinisierung (Cellerino et al., 1997) und die Entwicklung des Entladungsverhaltens, die ebenfalls unter dem Einfluss von BDNF steht (Rothe et al., 1999), in Betracht zu ziehen.

## 1.4 GABAerge synaptische Transmission im Colliculus superior

Die paarig angelegten *Colliculi superiores* (CS) bilden als mesencephale Strukturen zusammen mit den *Colliculi inferiores* das *Tectum mesencephalicum*. Die Hauptaufgabe des CS liegt in der Hinwendung sensorischer Organe auf neue und relevante Reize in der Umgebung (Grantyn, 1988) - im Falle orientierender Augenbewegungen auch als „visueller Greifreflex“ bezeichnet.

Der CS besitzt eine laminäre Struktur und setzt sich aus dem *Stratum zonale*, *Stratum griseum superficiale* (SGS), *Stratum opticum* (SOp), *Stratum griseum medium*, *Stratum medullare medium*, *Stratum griseum profundum* und schließlich dem *Stratum medullare profundum* zusammen. Die drei erstgenannten Schichten werden dabei zum visuellen CS zusammengefasst (Grantyn, 1988) (Abb. 1.3), dessen Aufgabe ausschließlich in der Verarbeitung visueller Informationen liegt. Während im SOp vorwiegend Axone verlaufen, liegen in den oberflächlicheren Schichten Neurone in hoher Dichte. Diese können aufgrund ihrer Morphologie in sechs Klassen unterteilt werden: Marginalzellen, multipolare Zellen, Horizontalzellen, Sternzellen sowie Vertikalzellen mit weitem und schmalen Dendritenfeld (Isa und Saito, 2001; Edwards et al., 2002).

Retinale Afferenzen stellen einen Großteil der Eingänge des visuellen CS dar. In ausgewachsenen Ratten und Mäusen handelt es sich hierbei in der großen Mehrheit um Axone kontralateraler retinaler Ganglienzellen (RGZ); nur 3-5% der Axone ziehen von der ipsilateralen Retina zum visuellen CS. Jedem Areal auf der Retina entspricht eine charakteristische Projektionszone im CS - es entsteht eine retinotopie Karte. Die Aktivitätsverteilung im visuellen CS korrespondiert also mit der der Retina und des ipsilateralen visuellen Kortex, von welchem der visuelle CS weitere Afferenzen erhält. Neurotransmitter dieser zwei Haupteingänge ist Glutamat (Grantyn, 1988). Weiterhin terminieren im visuellen CS Axone aus dem kontralateralen *Nucleus paraventricularis*, bei denen es sich um Axone cholinergischer Projektionsneurone handelt (Binns, 1999). Umgekehrt endet ein Teil der Axone von Projektionszellen aus dem visuellen CS im *Nucleus paraventricularis*.

Damit erhalten die oberflächlichen Schichten des CS ausschließlich visuelle Informationen –

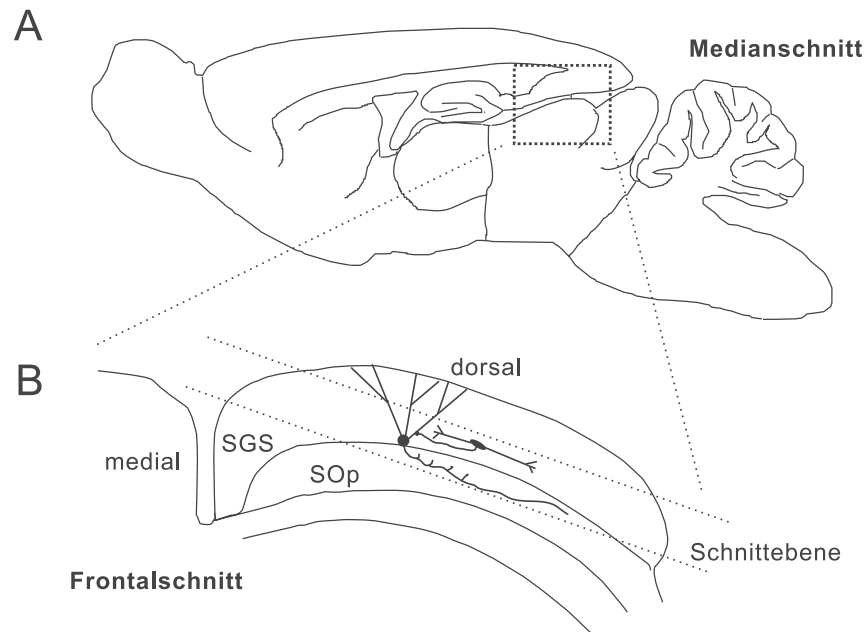


Abbildung 1.3: Der *Colliculus superior* ist eine Struktur des *Tectum mesencephalicum* und besteht aus *Stratum zonale* (nicht illustriert), *Stratum griseum superficiale* (SGS) und *Stratum opticum* (SOp) (vereinfacht nach Grantyn (1988) und Jüttner et al. (2001b)). Schematisch sind eine Horizontal- und Projektionszelle und die in der Präparation verwendete Schnittführung dargestellt.

im Gegensatz zu den tieferen Anteilen, wo die eigentliche Integration multimodaler Informationen und die Generierung von Sakkaden stattfindet. Neurone im visuellen CS projizieren sowohl in die tieferen Schichten des CS als auch in eine ganze Reihe anderer Strukturen wie z.B. den Thalamus (Isa et al., 1998; Lee et al., 2001; Isa und Saito, 2001), weshalb die Aufgabe des visuellen CS also nicht allein im Weiterreichen visueller Signale an die tieferliegenden Schichten liegt.

Lange bevor Mäuse an ihrem 13. Lebenstag ihre Augen öffnen und der Colliculus seine physiologische Rolle erfüllen muss, erreichen erste retinale Axone am Embryonaltag 16 und damit 3 Tage vor der Geburt den CS (Reece und Lim, 1998). Wenig später, am ersten Tag nach Geburt, haben diese bereits exzitatorische Synapsen gebildet und sind funktionstüchtig (Lo und Mize, 1999). Kortikale Afferenzen erreichen den CS deutlich später am postnatalen Tag 3 (Thong und Dreher, 1986). Ungeklärt ist, zu welchem Zeitpunkt die kortikotektale Verbindung vollständig entwickelt ist.

Auch die synaptischen Verbindungen innerhalb des visuellen CS unterliegen Reifungsprozessen. Bereits kurz nach der Geburt konnte Spontanaktivität in Schnittpräparaten des CS nachgewiesen werden, die sowohl durch Antagonisten der GABAergen Hemmung als auch der glutamatergen Exzitation beeinflusst werden konnte (Jüttner et al., 2001a). Dies lässt vermuten,

dass bereits zu diesem frühen Zeitpunkt funktionstüchtige synaptische Verbindungen vorliegen.

Von den bereits angesprochenen Neuronklassen sind Sternzellen, Horizontalzellen und eine Subpopulation der Vertikalzellen – die sogenannten piriformen Zellen – GABAerge inhibitorische Interneurone (Mize, 1992), die GABAerge Synapsen in hoher Zahl bilden. Das erklärt, warum in Hirnschnitten von 3-4 Wochen alten Ratten elektrophysiologisch GABAerge Eingänge – zumeist GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelt – in fast allen getesteten Neuronen festzustellen sind (Edwards et al., 2002). Der visuelle CS ist also als eine Hirnregion zu betrachten, die besonders reich an GABAergen Neuronen ist und sich demzufolge zum Studium der GABAergen Inhibition und deren Modulatoren hervorragend eignet. Die hier vorliegenden GABAergen Synapsen wurden bereits in einer Reihe von Untersuchungen unter verschiedensten experimentellen Bedingungen sowohl in Kultur (Warton et al., 1990; Kraszewski und Grantyn, 1992) als auch in Schnittpräparationen (Jüttner et al., 2001a,b; Clark et al., 2001; Edwards et al., 2002) studiert.

Kurz nach der Geburt zeichnen sich GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelte Ströme durch ihre lange, fluktuierende Halbwertszeit bei stabiler Amplitude, niedriger  $\alpha_1$ - und hoher  $\alpha_3$ -Expression aus (Jüttner et al., 2001b). Innerhalb der ersten drei postnatalen Wochen, in die auch die Augenöffnung fällt, wandelt sich das Bild: die Halbwertszeit geht signifikant zurück und stabilisiert sich, die Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit steigt an, während die  $\alpha_3$ -Untereinheit an Bedeutung verliert (Jüttner et al., 2001b). Dabei könnte es sich um einen um die Augenöffnung angesiedelten Plastizitätseffekt (Schmidt et al., 2002) oder um eine allgemeine postnatale Reifung der GABAergen Inhibition handeln.

## 1.5 Neurotrophine und ihre Rezeptoren im Colliculus superior

Sowohl BDNF-mRNA (Friedman et al., 1991; Vizuete et al., 2001) als auch -Protein (Frost et al., 2001) wurden bereits im CS nachgewiesen, was für die lokale Transkription und Translation von BDNF in colliculären Neuronen und/oder Gliazellen spricht. 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 in den CS gelangen (Caleo et al., 2000). 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 und ob weitere BDNF-Quellen (z.B. aus kortikalen Afferenzen) vorhanden sind, 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 unter-

sucht 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.

Über den Einfluss von BDNF auf die synaptische Transmission im visuellen CS ist bisher kaum etwas bekannt. 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.

Angesichts der vielfältigen Möglichkeiten von BDNF, die GABAerge Inhibition zu steuern, und der Dynamik, mit der sich die synaptische Inhibition im visuellen CS postnatal entwickelt, stellt sich die interessante Frage, in welchem Maße BDNF an der Modulation der GABAergen Hemmung im visuellen CS zum jeweiligen Entwicklungszeitpunkt teilnimmt, und auf welchen Mechanismen die neurotrophinerge Modulation beruht.



## 1.6 Aufgabenstellung

Es sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Die spontane Generierung von Aktionspotentialen kann als das komplexe Produkt exzitatorischer und inhibitorischer Einflüsse, wie auch passiver neuronaler Eigenschaften aufgefasst werden. Somit eignet sich die Registrierung spontaner Aktionspotentiale für die Beantwortung der Frage, ob BDNF im visuellen CS ein Modulator der neuronalen Funktion ist.
- Durch gezielte Blockade bzw. Aktivierung der exzitatorischen und/oder inhibitorischen synaptischen Transmission lässt sich die Wirkung eines Liganden eingrenzen. Ist also die Modulation der neuronalen Entladung durch BDNF an ein spezifisches Neurotransmittersystem gebunden oder spiegelt sie eine Veränderung passiver neuronaler Eigenschaften wieder?
- Unter der Annahme, dass BDNF die GABAerge synaptische Transmission in ihrer Funktion beeinflusst, stellt sich die Frage, ob der Angriffspunkt von BDNF in diesem Neurotransmittersystem an der prä- oder postsynaptischen Seite liegt. Dies sollte durch entsprechende elektrophysiologische Messungen beantwortet werden.
- Kann unter der Vielzahl der denkbaren Mechanismen einer prä- oder postsynaptischen Modulation ein spezieller Mechanismus isoliert werden, über den die BDNF-Effekte vornehmlich realisiert werden?
- Die GABAerge Hemmung im visuellen CS durchläuft einen dramatischen postnatalen Reifungsprozess, der – von vielen anderen Faktoren abgesehen – auch durch die Augenöffnung um den 13. postnatalen Tag nachhaltig beeinflusst wird. Spielt BDNF als potenter Modulator synaptischer Transmission in diesem Zusammenhang eine Rolle?

Als experimentelles Modell wurde der Vergleich von gentechnisch veränderten Mäusen gewählt. Diese exprimieren BDNF (*bdnf*<sup>+/+</sup>) oder verfügen über kein funktionelles BDNF-Gen (*bdnf*<sup>-/-</sup>)

- Eine Voraussetzung der Arbeit mit gentechnisch veränderten Tieren ist die effiziente Genotypisierung. Gängige Verfahren gehen mit einem hohen Zeitaufwand einher, welcher insbesondere die Arbeit mit frühpostnatalen Tieren erschwert. Eine wichtige methodische Vorarbeit war demzufolge die Optimierung der Genotypisierung der verwendeten Mäuse.

- Aufgrund der zu erwartenden Fülle elektrophysiologischer Messdaten stellte sich die Frage nach einem effizienten Verfahren der Auswertung. Im Zuge der Registrierung von Aktionspotentialen oder postsynaptischen Strömen können durchaus mehrere tausend Ereignisse auftreten, die nur mit extremem Aufwand manuell auszuwerten waren. Im Standardanalyseprogramm des Labors (TIDA) stehen entsprechende Routinen nicht zu Verfügung. Deshalb sollte ein Analyseprogramm für die halb- bzw. vollautomatische Auswertung einer Reihe verschiedener Messdaten erstellt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Chemikalien und Präparation

Die hier verwendeten BDNF-defizienten Mäuse wurden auf der Basis heterozygoter Mutanten (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) mit einem gemischten genetischen Hintergrund (129Sv, BALB/c, C57Bl/6) gezüchtet (Ernfors et al., 1994). Sie zeigen dieselben Defizite, wie die von Thoenen et al. erzeugten Tiere (Korte et al., 1995). Diese *bdnf*<sup>-/-</sup> Mäuse sind für gewöhnlich kleiner als ihre *bdnf*<sup>+/+</sup> bzw. *bdnf*<sup>+/-</sup> Geschwister und sterben in der dritten bis vierten postnatalen Woche. Weiterhin entwickeln sie mit zunehmendem Alter Defekte in der Motorik wie z.B. Ataxie und Episoden von Hyperaktivität. Bei ihnen ist keine BDNF-mRNA nachweisbar (siehe auch Abschnitt 3.3). Heterozygote Mäuse sind fertil, zeigen keine offensichtlichen Defizite und sind somit zur Zucht geeignet. Vor jedem Experiment wurde der Genotyp der jeweiligen Maus bestimmt (siehe auch Abschnitt 2.4).

Zu einem definierten Zeitpunkt wurden horizontale Schnitte des visuellen CS angefertigt (Abb. 1.3). Das Geburtsdatum wurde als postnataler Tag (P) 0 definiert. Bei fünf verschiedenen Altersstufen (P2/3, P11/12, P15/16, P20/21 und P30/31) wurden Experimente durchgeführt, wobei beide Genotypen zwischen P13 und 14 die Augen öffneten. Soweit nicht explizit anders angegeben, wurden die Experimente zum Zeitpunkt P15/16 (im folgenden als P15 bezeichnet) durchgeführt.

Nach vorangehender Äther-Narkose wurden die Mäuse durch Dekapitation getötet. Das Hirn und anschließend die *Colliculi superiores* wurden durch Präparation unter dem Binokular in eiskaltem künstlichen Liquor (ACSF) (NaCl 120 mM, KCl 5 mM, Glucose 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 7.3) isoliert. Anschließend wurden horizontale Schnitte von 150  $\mu$ m Dicke mit Hilfe eines Vibratoms (Vibratome Series 1000 Sectioning System, Vibratome, St. Louis, MO, USA) ebenfalls in eiskaltem ACSF hergestellt (Abb. 1.3) und eine Stunde bis zum Beginn der Messungen unter Begasung (5% CO<sub>2</sub> / 95% O<sub>2</sub>) bei Raumtemperatur (20-22 °C) gelagert. In einem Teil der Experimente wurden die Schnitte mindestens anderthalb Stunden mit K-252a (200 nM; Alexis, San Diego, CA, USA) inkubiert.

Lidocain-N-ethyl-bromid (QX-314) wurde von RBI, Tetrodotoxin (TTX) von Alomone, 6,7-dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione (DNQX) von Tocris gekauft. Soweit nicht anders angegeben, sind alle weiteren Chemikalien von Sigma bezogen worden.

## 2.2 Elektrophysiologische Messungen

Zur Durchführung elektrophysiologischer Messungen wurden die Schnitte in einer Immersionskammer unter einem platingestützten Nylonnetz fixiert und mit begaster ACSF superfundiert (1 ml/min). In einem Teil der Messungen mit lokaler Applikation unter Verwendung einer separaten Superfusionspipette enthielt die ACSF weiterhin humanes, rekombinantes BDNF (100 ng/ml; Alomone, Jerusalem, Israel) und Cytochrom-C (0.05%). Kontrollexperimente bestätigten, dass die Cytochrom-C Superfusion allein keine Wirkung auf die GABAerge synaptische Transmission besitzt.

Die Intrazellulärlösung (KCl 120 mM, EGTA 10 mM, Glucose 10 mM, HEPES 10 mM, KOH 14 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7.3) enthielt für Ganzzelleableitungen zusätzlich QX-314 (2 mM) zur Unterdrückung überlagerter Aktionspotentiale und in einem Teil der Messungen PKC inhibitor peptide 19-31 (600 nM; Calbiochem, Bad Soden, Deutschland).

Die Positionierung der Pipetten (Stimulation, Patchpipette, Superfusion) und die Auswahl der Neuronen erfolgte visuell unter Verwendung eines 63x Wasserimmersionsmikroskops. Es wurde nicht versucht, die verschiedenen Neuronenpopulationen durch histologische Aufbereitung der verwendeten Schnitte zu unterscheiden. Jedoch zeigten mit Lucifer Yellow gefüllte Neurone für gewöhnlich ein Dendritenfeld mit einem Durchmesser von mehr als 200  $\mu\text{m}$  und einen Somadurchmesser von mehr als 12  $\mu\text{m}$ , sodass zu vermuten ist, dass es sich hierbei um Vertikalzellen mit weitem Dendritenfeld (sogenannte *wide field neurons*) handelt (Jüttner et al., 2001b). Jedoch wurden alle Daten ohne Rücksicht auf die Morphologie der postsynaptischen Zelle zusammengefasst.

Spontane Aktionspotentiale (AP) wurden in der *cell attached*-Konfiguration mit einem Haltepotential ( $V_h$ ) von 0 mV, einem Seal-Widerstand von 30-250 M $\Omega$ , einem Pipettenwiderstand von 3-5 M $\Omega$  und der oben beschriebenen KCl basierten Intrazellulärlösung registriert (Abb. 3.1). Pharmakologische Untersuchungen wurden mit 200  $\mu\text{M}$  DNQX, 200  $\mu\text{M}$  APV, 20  $\mu\text{M}$  d-Tubocurarin und 50  $\mu\text{M}$  Bicucullin durchgeführt.

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Pharmaka über die Badlösung appliziert.

Die bei der Ganzzelleableitung verwendeten Pipetten besaßen einen Öffnungsdurchmesser von 1-2  $\mu\text{m}$  und einen Widerstand von 4-6 M $\Omega$ . Der Serienwiderstand wurde weitestmöglich korrigiert (50-70%). Es wurden ausschließlich Messungen mit einem Zugangswiderstand von weniger als 35 M $\Omega$  akzeptiert. Inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSC) wurden in der Ganzzelleableitung ( $V_h = -70$  mV) gemessen. Diese kommen aufgrund des Cl<sup>-</sup>-Ausstroms bei hoher intrazellulärer Cl<sup>-</sup>-Konzentration als einwärts gerichtete Ströme zur Darstellung. Sie wurden durch Verwendung von 20  $\mu\text{M}$  DNQX, 100  $\mu\text{M}$  APV, 0.5  $\mu\text{M}$  Strychnin und 20  $\mu\text{M}$  d-Tubocurarin isoliert (siehe auch Abschnitt 3.3). Miniatur-IPSC (mIPSC) wurden in der Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  TTX zur Vermeidung AP-induzierter IPSC aufgenommen. Die blinde Sti-

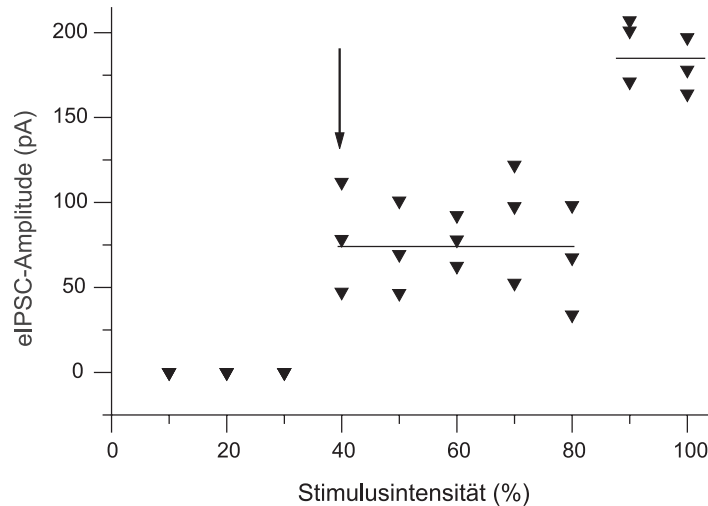


Abbildung 2.1: Darstellung des Zusammenhangs zwischen Stimulusintensität (100% entspricht  $10 \mu\text{A}$ ) und Amplitude individueller eIPSC. Hier sind zwei Amplitudenniveaus der eIPSC zu erkennen, wobei das höhere wahrscheinlich auf die Stimulation zweier Axone zurückzuführen ist. Der Pfeil gibt die in diesem Experiment anschließend verwendete Stimulusintensität an.

mulation von Axonen bzw. Neuronen wurde zur Auslösung evozierter IPSC (eIPSC) verwendet. Es wurde nicht versucht, den Ursprung der GABAergen Afferenzen zu identifizieren. Es ist jedoch sicher, dass es sich hierbei ausschließlich um intrinsische GABAerge Interneurone handelt (Jüttner et al., 2001b). Die Stimulationspipette (Öffnungsdurchmesser  $2\text{-}3 \mu\text{m}$ , Widerstand  $0.5\text{-}2 \text{M}\Omega$ ) wurde unter visueller Kontrolle platziert. Es wurden Stimulationsintensitäten zwischen  $2$  und  $10 \mu\text{A}$  bei einer Stimulusdauer von  $0.5 \text{ms}$  gewählt. eIPSC sind durch Anwendung der minimalen Stimulation unter Verwendung der folgenden Bedingungen registriert worden:

- Die postsynaptische Antwort tritt nach dem Alles-oder-Nichts Prinzip auf.
- Die Latenz zwischen Stimulus und postsynaptischer Antwort fluktuiert um weniger als  $40\%$  des Mittelwerts.
- Die mittlere Amplitude der Antwort bleibt trotz Erhöhung der Stimulusintensität um  $20\%$  stabil.
- Die Verringerung der Stimulusintensität um mehr als  $20\%$  führt zum kompletten Ausfall der postsynaptischen Antwort.

Abb. 2.1 zeigt ein Beispiel des Zusammenhangs zwischen Stimulusintensität und Amplitude des eIPSC.

## 2.3 Rechnergestützte Auswertung der elektrophysiologischen Daten

Die Menge der bei elektrophysiologischen Messungen anfallenden Daten macht die manuelle Auswertung unpraktikabel, sodass eine automatische Analyse der gewonnenen Daten wünschenswert ist. Eine Gemeinsamkeit der mit der *patch clamp*-Technik gewonnenen Signale und insbesondere von PSC ist die abrupte Abweichung von der Grundlinie (Abb. 2.2A).

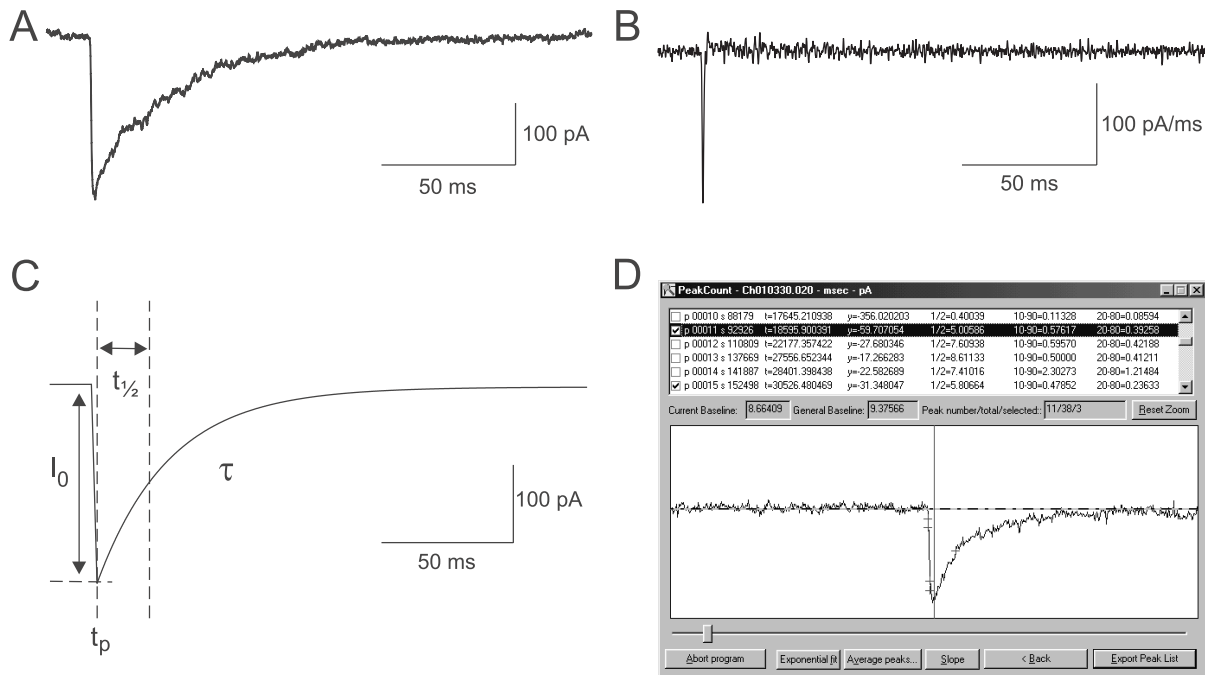


Abbildung 2.2: Auswertung postsynaptischer Ströme. A: Beispiel eines GABAergen IPSC. Der Zeitpunkt des maximalen Stromflusses stellt ein lokales Minimum der aufgenommenen Spur dar. B: Der Ausschlag der Ableitung  $\frac{dI}{dt}$  markiert die steile Flanke des Stromsignals. C: Nach Bestimmung des lokalen Minimums kann der Zeitpunkt des Auftretens des PSC, dessen Amplitude, die Halbwertszeit sowie – durch monoexponentiellen Fit – die Zeitkonstante  $\tau$  ermittelt werden. D: Bildschirmfoto der erstellten Anwendung mit detektiertem Ereignis.

Es bieten sich zwei Möglichkeiten zur Auffindung eines Ereignisses an: Es wird entweder detektiert, wenn der Abstand zwischen Signal und Grundlinie eine festgelegte Schwelle überschreitet. Oder aber man betrachtet es als lokales Minimum/Maximum und sucht anhand der 1. Ableitung nach diesem (Cochran, 1993; Hwang und Copenhagen, 1999). Vorteil des letzteren Verfahrens ist vor allem seine Robustheit in Hinsicht auf Grundlinienverschiebungen (z.B. durch Applikation von Pharmaka), sodass unsere Wahl auf dieses Verfahren fiel.

Das hierfür in C++ entwickelte Programm detektiert nach eventuellem Filtern (Fouriertransformation oder Mehrpunktfiler) und anschließender Berechnung der ersten Ableitung  $\frac{dI}{dt}$

ein Ereignis dann, wenn  $\frac{dI}{dt}$  einen visuell oder relativ zur Standardabweichung des Rauschens der ersten Ableitung festgelegten Schwellenwert überschreitet und nachfolgend die Abszisse kreuzt (Abb. 2.2A,B). Parameter wie Amplitude ( $I_0$ ), Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) und Anstiegszeit werden unmittelbar berechnet.

Nach Ermittlung aller Ereignisse stehen diese zur visuellen Kontrolle zur Verfügung. Da – im wesentlichen durch Rauschen bedingt –  $t_{1/2}$  keine hinreichende Aussagekraft hinsichtlich der Kinetik besitzt, kann ein monoexponentieller Fit durchgeführt werden (Grundlinie  $I_B$ , Zeitkonstante  $\tau$ ):

$$I(t) = I_B + I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Die monoexponentielle Approximation der einzelnen Antworten ist für die in dieser Arbeit vorgestellten GABAergen IPSC ausreichend. Auf komplexere PSC (z.B. ein EPSC mit NMDA- als auch AMPA-Komponente) ist dieser vereinfachte Ansatz natürlich nicht anwendbar.

Die ermittelten Daten stehen anschließend zur Weiterbearbeitung mit geeigneter statistischer Software bereit.

Zur Bestimmung passiver Zellparameter, wie des Membranwiderstands ( $R_M$ ), der Ganzzellkapazität (C), oder zur Ermittlung des Serienwiderstands ( $R_S$ ) als Gütekriterium der Ganzzelleableitung, kann die Auswertung der Stromantwort auf depolarisierende/hyperpolarisierende Spannungsschritte herangezogen werden (Abb. 2.3). Die Ganzzelleableitung kann vereinfacht als eine Reihenschaltung von  $R_S$  mit einer Parallelschaltung von  $R_M$  und C aufgefasst werden (Numberger und Draguhn, 1996, S.88). Die in Numberger und Draguhn (1996, S. 93) angegebenen Näherungen für  $R_S$ ,  $R_M$  und C gelten unter der Bedingung  $R_S \ll R_M$  – der Hauptbedingung für eine korrekte Ganzzelleableitung. Verzichtet man für die Berechnung von  $R_S$ ,  $R_M$  und C auf diese Annahme, um präzisere Ergebnisse zu erhalten, so verhält sich die Stromantwort  $I(t)$  in Abhängigkeit von  $R_S$ ,  $R_M$ , C und  $U_0$  (Größe des Spannungsschrittes) wie folgt:

$$I(t) = \frac{U_0}{R_S + R_M} \left( 1 + \frac{R_M}{R_S} e^{-\frac{R_S + R_M}{C R_M R_S} t} \right)$$

Für die hier vorgestellten Anpassungen von Daten an die jeweilige Funktion wurde als Gütekriterium (G) die Abweichung der approximierten Funktion  $y(x)$  von den Messdaten  $(x_i, y_i)$  verwendet:

$$G = \sum_{i=0}^{n-1} (y_i - y(x_i))^2$$

Als Optimierungsverfahren wurde ein Evolutionsalgorithmus (Blümecke, 1991) gewählt, bei

dem eine Anzahl von Parametersets untereinander kombiniert und anschließend anhand des Gütekriteriums selektiert werden. Dies kann beliebig oft unter Verwendung der jeweils vorhergehenden Parametersets wiederholt werden. Der Algorithmus bietet den Vorteil, auch bei vielen abhängigen Variablen ausreichend schnell zu konvergieren.

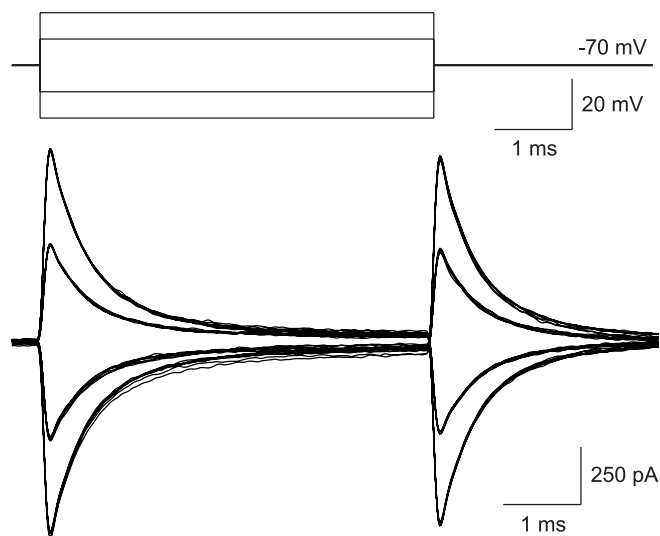


Abbildung 2.3: Zur Bestimmung des Eingangswiderstands, des Membranwiderstands und der Zellkapazität wurde die Zelle ausgehend von einem Haltepotential von  $-70$  mV mehrfach um  $10$  mV und  $20$  mV depolarisiert bzw. hyperpolarisiert. Es sind das Haltepotential (obere Spuren) und der aufgezeichnete Stromverlauf (untere Spuren) dargestellt.

Eine bisher nicht angesprochene Anwendung der erstellten Software ist die Analyse spontaner, in der *cell attached*-Konfiguration gemessener AP (Abb. 3.1). Diese sind aufgrund der schnellen Abfolge eines Einwärts- und eines Auswärtsstroms mit dem vorgestellten Algorithmus gut zu detektieren. Das Muster und die Frequenz der AP lässt sich anschließend leicht beurteilen und quantifizieren.

Durch Verwendung der hier vorgestellten Auswertungstechnik steht ein – im Vergleich zur manuellen Auswertung – komfortables, auf die Analyse von PSC zugeschnittenes Verfahren zur Verfügung, welches für die Evaluation von Messdaten mehrfach Anwendung gefunden hat (Jüttner et al., 2001a,b; Henneberger et al., 2002; Meier et al., 2002).

## 2.4 Genotypisierung

Eine Voraussetzung für die Durchführung von experimentellen Arbeiten mit gentechnisch veränderten Tieren ist die Klärung des Genotyps des verwendeten Tiers. Da *bdnf*<sup>-/-</sup> Mäuse innerhalb der ersten vier Wochen nach Geburt sterben, ist eine Zucht mit homozygoten *bdnf*<sup>-/-</sup>



Mäusen nicht möglich; eine Erhaltungszucht ist mit *bdnf*<sup>+/-</sup> Mäusen durchzuführen, weshalb die konsequente Genotypisierung aller Würfe notwendig ist, will man mit definierten Genotypen arbeiten.

Die Genotypisierung kann in zwei Schritte unterteilt werden: die Isolation der genomischen DNA und die Amplifikation eines bestimmten Gens mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR). Beide Schritte sind methodisch aufwendig und zeitintensiv (Laird et al., 1991). Für die Durchführung gängiger Protokolle werden bis zu drei Tagen benötigt, was Untersuchungen an besonders jungen Tieren P1-3 unmöglich macht. Daher bestand die Notwendigkeit, den Prozess der Genotypisierung zu optimieren.

Als Ausgangsmaterial zur Isolation der genomischen DNA dienten 0.3-0.5 cm lange Stücke der Schwanzspitze. DNA wurde durch eine Kombination verschiedener Methoden (Internet, Laird et al. (1991), Tovar et al. (2000)) isoliert.

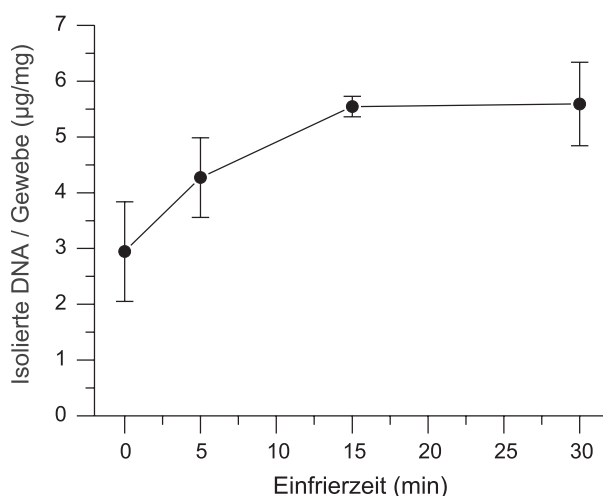


Abbildung 2.4: Die Menge an isolierter DNA pro verwendetem Gewebe steigt mit zunehmender Dauer der Einfrierzeit bei -80 °C, um nach 15 Minuten ein Plateau zu erreichen. Die dargestellten Werte sind die Mittel zweier, doppelt durchgeführter Isolationen (n=4).

Zunächst sind die Proben für 15 min auf -80 °C gekühlt und anschließend in 500 µl Lysispuffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 100 mM EDTA; 0.5% SDS; 0.2 mg/ml Ribonuclease A; 1 mg/ml Proteinase K) verdaut worden. Die Lyse war bei 56 °C und zwischenzeitlichem Mischen nach 2 Stunden komplett. Danach wurden die Proben bei Raumtemperatur 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um Rückstände zu entfernen. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol zum Überstand wurde die DNA präzipitiert und anschließend in 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Letztendlich wurde die genomische DNA in 50 µl eines 5 mM Tris-HCl Puffers (pH 8.5) durch Inkubation bei 65 °C für 5 min wieder gelöst. Die Qualität der Probe und die DNA-Konzentration wurde

photometrisch (Spectrophotometer, Beckman, Fullerton, USA) bestimmt. Die Konzentration der DNA wurde auf 250 ng/ $\mu$ l eingestellt.

Im Anschluss wurde unter Verwendung der in Tabelle 2.1 angegebenen Primer nach dem aus Tabelle 2.2 zu ersiehenden Protokoll die PCR durchgeführt. Der PCR-Mix (50  $\mu$ l) enthielt 0.2 mM dNTP, 1.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M eines der Primersets und 1.25 U *RedTaq* DNA-Polymerase in 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl (pH 8.3). 1  $\mu$ l der DNA-Probe wurde jedem der beiden Ansätze – zum Nachweis des BDNF-Gens sowie der statt des BDNF-Gens vorhandenen Sequenz – zugesetzt und amplifiziert.

Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gel-Elektrophorese (2% Agarose in TAE-Puffer [40 mM Tris-Azetat, 1 mM EDTA, pH 8.0]) bei 80 V aufgetrennt, durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht und fotografiert.

Durch Verwendung der hier vorgestellten Methode konnte der Zeitaufwand der Genotypisierung von ursprünglich 3 Tagen auf weniger als 6 Stunden reduziert werden. Die drastische Verkürzung der Isolation genomischer DNA trägt dazu den Hauptanteil bei. Es zeigte sich, dass allein das Einfrieren der Probe auf -80 °C für 15 min die letztendlich isolierte DNA Menge ( $5.5 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$  n=4) im Vergleich zu nicht eingefrorenen Gewebeproben signifikant erhöht ( $2.9 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{mg}$  n=4,  $P < 0.05$ ) (Abb. 2.4). Die Resuspension von präzipitierter DNA bei 65 °C für 5 min statt – wie vorher durchgeführt – bei 4 °C über Nacht hatte keinen Einfluss auf die Qualität der isolierten DNA und konnte das Protokoll ganz erheblich verkürzen.

Bei Einsatz von 50 bis 500 ng genomischer DNA pro PCR-Ansatz waren Amplifikate, wenn auch im ersteren Fall nur als gerade wahrnehmbare Banden, sicher erkennbar, sodass die in der PCR eingesetzte Menge an DNA über einen großen Bereich ohne qualitative Einbußen variiert werden kann. Ein weiterer wichtiger Parameter der PCR ist die MgCl<sub>2</sub> Konzentration: Während der Nachweis des *bdnf* Allels bei MgCl<sub>2</sub> Konzentrationen von 1.1 bis 3.1 mM zuverlässig gelang, war die sichere Amplifikation des inaktivierten *bdnf* Allels nur bei einer MgCl<sub>2</sub> Konzentration von 1.1 mM möglich.

Durch Anwendung dieses Protokolls konnte erfolgreich genomische DNA mit ausreichender Qualität zur Genotypisierung von eNOS- und H1F1 $\alpha$ -defizienten Mäusen (Dr. K.D. Wagner, persönliche Mitteilung) isoliert werden, sodass man davon ausgehen kann, dass es sich um ein vielfach einsetzbares Protokoll handelt.

## 2.5 Semiquantitative mRNA-Bestimmung durch RT-PCR

Für die semiquantitative mRNA-Bestimmung wurden Schnitte des visuellen CS analog zu den elektrophysiologischen Messungen gewonnen. Im Anschluss an die Präparation, Inkubation und Entfernung der restlichen Flüssigkeit wurden die Schnitte schockgefroren (-80°C). Die Gesamt-

RNA wurde unter Verwendung von Trizol (GibcoBRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert, anschließend photometrisch die Reinheit überprüft und die Menge bestimmt. Durch reverse Transkription (Reverse Transkriptase PCR [RT-PCR], GibcoBRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) wurden 2 mg der zuvor gewonnenen Gesamt-RNA mit Hilfe eines oligo-dT Primers in komplementäre DNA (cDNA) überführt (15 min bei 70 °C, 60 min bei 42 °C und 10 min bei 70 °C). Aliquots der cDNA wurden unter Einsatz des entsprechenden Primerpaars (Tab. 2.1) amplifiziert.

Primer	Vorwärts (5' → 3')	Rückwärts (5' → 3')
BDNF	ATA AGG ACG CGG ACT TGT ACA	GTG TCT ATC CTT ATG AAT CGC
3'-neo	GAT TCG CAG CGC ATC GCC TT	GTG TCT ATC CTT ATG AAT CGC
TrkB.T1	AAG GAA AGA CAA AGG CTG GG	TAA GTG TGT TCT TCT GCT GCT TCT
TrkB.FL	TGC ACG CAA GGA CTT TCA TCG	CGA TAG TAG TCG GTG CTG TAG
GABA-A $\alpha_1$	ATC GTC TGA GAC CAG GTT TGG	CCC ATC TTC TGC TAC AAC CAC
GABA-A $\alpha_2$	AAT CGG CTT AGA CCA GGA CTG	GGG CCA CTG ACT TTT TCC CAT
GABA-A $\alpha_3$	TCA AGA CGA CAA GAA CCT GGG	TAT CAG TGT CTG ACA CAG GGC
GABA-A $\gamma_2$	CAA GGT CTC CTA TGT CAC AGC	AAG GCG GTA GGG AAG AAG ATC
$\beta$ -Aktin	ACC AAG GTG TGA TGG TGG GAA	CGC TCG TTG CCA ATA GTG ATG

Tabelle 2.1: Aufstellung der für Genotypisierung und semiquantitative mRNA-Bestimmung verwendeten Primerpaare.

Für die anschließende PCR enthielt ein Ansatz (25  $\mu$ l) entsprechend den Herstellerangaben 0.2 mM dNTP, 1.1 mM MgCl<sub>2</sub> und 1.25 U *RedTaq* DNA-Polymerase. Die Konzentration der Primer betrug in allen Ansätzen 200 nM. Als Thermocycler kam ein PCRSprint (Hybaid-AGS, Heidelberg, Deutschland) unter Verwendung der in Tabelle 2.2 angegebenen Protokolle zum Einsatz.

Genotypisierung			mRNA-Bestimmung					
BDNF, 3'-neo			GABA-A $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \gamma_2$ TrkB.T1, BDNF			TrkB.FL		
1 ×	5 min	94°C	1 ×	5 min	94°C	1 ×	5 min	94°C
	30 sec	58.5°C		1 min	58.5°C		1 min	58.5°C
	60 sec	72°C		1 min	72°C		1 min	72°C
30 ×	30 sec	94°C	29 ×	1 min	94°C	35 ×	1 min	94°C
	30 sec	58.5°C		1 min	58.5°C		1 min	58.5°C
	60 sec	72°C		1 min	72°C		1 min	72°C
1 ×	5 min	72°C	1 ×	10 min	72°C	1 ×	10 min	72°C

Tabelle 2.2: Aufgeführt sind die für die PCR und RT-PCR verwendeten Protokolle.

Bei der semiquantitativen mRNA-Bestimmung wurde durch Titration der eingesetzten Men-

ge cDNA sichergestellt, dass sich die PCR im linearen Bereich der Amplifikation befand. Kreuzreaktionen der verwendeten Primer mit unerwünschten Sequenzen wurden durch die Ähnlichkeitssuche BLAST der NCBI-Datenbank ausgeschlossen. Zur Quantifizierung wurde als Standard die Expression von  $\beta$ -Aktin (Primerkonzentration der jeweiligen Ansätze: TrkB.FL 40 nM; TrkB.T1, BDNF, GABA-A  $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \gamma_2$  100 nM) gewählt und in allen Ansätzen mitamplifiziert.  $\beta$ -Aktin ist insofern geeignet, als dass seine Protein-Expression durch BDNF nicht beeinflusst wird (Thompson et al., 1998).

Die PCR-Produkte wurden wie in Abschnitt 2.4 nachgewiesen und anschließend mit ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) quantifiziert. Die relative Expression an mRNA wurde als das Verhältnis zwischen der Intensität der nachzuweisenden mRNA und der Intensität von  $\beta$ -Aktin berechnet.

## 2.6 Immunhistochemie

Ein gegen den vesikulären inhibitorischen Aminosäuretransporter gerichteter, polyklonaler Antikörper (VIAAT, 1:600, Hase, (Dumoulin et al., 2000), freundlicherweise überlassen von B. Gasnier) und ein monoklonaler, gegen das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 gerichteter Antikörper (MAP-2, 1:50, Maus, Sigma) fanden als primäre Antikörper Verwendung. Als sekundäre Antikörper wurden Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-konjugierte Antikörper verwendet (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, PA, USA).

Ausschließlich aus einem *Colliculus superior* bestehende Gewebeblöcke wurden über Nacht bei 4 °C in phosphatgepufferter Saline (PBS; 120 mM, pH 7.4) einschließlich 4% (w/v [Menge/Volumen]) Paraformaldehyd und 4% Saccharose fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde das Gewebe für 15 min in 50 mM Ammoniumchlorid (in PBS) inkubiert, anschließend in PBS gespült und in TissueTek OCT Compound 4583 (Plano W. Plannet GmbH, Wetzlar, Deutschland) eingebettet. Die anschließend angefertigten, 10  $\mu$ m dicken, horizontalen Gefrierschnitte (Jung CM 1800, Leica, Bensheim, Germany) des visuellen CS wurden auf Gelatinebeschichtete Glasträger aufgezogen. Diese wurden einmal in PBS und nachfolgend zweimal in 0.12% (w/v) Gelatine-PBS gewaschen, bevor sie über Nacht mit dem primären Antikörper in 0.12% (w/v) Triton X-100 in Gelatine-PBS bei 4 °C inkubiert wurden. Nach mehrfachem Waschen in Gelatine-PBS, Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur und nochmaligem Waschen in Gelatine-PBS und PBS wurden die Schnitte mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) überzogen und mit einem Glasplättchen abgedeckt.

In Kontrollfärbungen wurde die Spezifität der Immunfärbung durch Weglassen der primären Antikörper überprüft. Fluoreszenzbilder wurden mit einer gekühlten, 12-bit CCD Kamera (KAF

1400, Photometrics, Tucson, AZ, USA) an einem Standard Epifluoreszenzmikroskop (Objektiv 100x, Axiovert, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) unter Verwendung eines für FITC spezifischen Filtersatzes (Omega Optical Inc., Brattleboro, VT, USA) aufgenommen.

Drei Schnitte von jeweils drei verschiedenen *bdnf*<sup>+/+</sup> und *bdnf*<sup>-/-</sup> Mäusen wurden einer morphologischen Analyse unter Benutzung von ScionImage (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA) unterzogen. In jedem Schnitt wurde die mittlere Anzahl VIAAT-immunoreaktiver Boutons und MAP-2-immunoreaktiver Somata in jeweils zwei willkürlich ausgewählten Ausschnitten mit einer Fläche von 40 x 40  $\mu\text{m}^2$  bestimmt. Von Bildern mit VIAAT-immunoreaktiven Boutons wurde vor der Analyse der Hintergrund subtrahiert und interaktiv ein Schwellenwert der Intensität festgelegt. Der Durchmesser MAP-2-immunoreaktiver Somata wurde als das Mittel des größten und des dazu senkrecht stehenden Durchmessers bestimmt.

## 2.7 Analyse der erhobenen Daten

Elektrophysiologische Messdaten wurden mit einer Aquisitionsrate von 10 und mehr kHz aufgenommen. Dabei fand ein 16bit AD-Wandler (ITC-16) mit entsprechender Software (WinTida 4.11, HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) mit Bessel-Filter bei 3 kHz Verwendung. Sämtliche gewonnenen Daten wurden wie in Abschnitt 2.3 beschrieben ausgewertet. Die Paarpuls-Ratio wurde als der Quotient aus Amplitude der zweiten Antwort und Amplitude der ersten definiert ( $e\text{IPSC}_2/e\text{IPSC}_1$ ). Fiel die zweite Antwort in die abfallende Flanke der ersten, so wurde die zweite Amplitude relativ zum Fußpunkt bestimmt.

Numerische Daten sind als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler angegeben. Für die Anzahl der in eine Statistik eingehenden Neurone wurde die Variable  $n$  verwendet. In Diagrammen ist sie in der Form ( $n$ ) dargestellt. Auf Ausnahmen wird im Text explizit hingewiesen. Für statistische Vergleiche wurde je nach Art der zugrundeliegenden Daten der Mann-Whitney U-Test, der Wilcoxon-Signed-Rank-Test oder der Spearman-Test verwendet. Signifikanzniveaus sind in Diagrammen mit \* für  $P < 0.05$ , \*\* für  $P < 0.01$  und \*\*\* für  $P < 0.001$  gekennzeichnet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Einfluss von BDNF auf die Dichte und die passiven Eigenschaften colliculärer Neurone

Neurotrophine, unter ihnen BDNF, sind trophische Faktoren, deren Fehlen im peripheren Nervensystem (PNS) zum Verlust von Neuronen führt (Huang und Reichardt, 2001). Im ZNS hingegen führt die Abwesenheit von BDNF nicht notwendigerweise zu einem Untergang von Neuronen. Allerdings entstehen nach Infusion von BDNF in die Seitenventrikel der Ratte neue MAP-2 positive Neurone (Pencea et al., 2001). BDNF kann demnach die Neuronzahl sowohl im PNS als auch ZNS regulieren. Darüber hinaus zeigten Rothe et al. (1999), dass das Fehlen von BDNF eine Veränderung des Membranwiderstandes retinaler Ganglienzellen nach sich zieht.

Damit entsteht die Frage, ob die hier verglichenen Schnitte von *bdnf*<sup>+/+</sup> und *bdnf*<sup>-/-</sup> Mäusen hinsichtlich ihrer Neurondichte vergleichbar sind und ob sich Unterschiede in den passiven Zellparametern wie Membranwiderstand und Ganzzellkapazität ergeben.

	<i>bdnf</i> <sup>+/+</sup>	<i>bdnf</i> <sup>-/-</sup>
Membranwiderstand (MΩ)	521 ± 101 (22)	503 ± 91 (22)
Ganzzellkapazität (pF)	16 ± 2 (22)	16 ± 4 (22)
Neurondichte (pro 40x40 μm <sup>2</sup> )	2.65 ± 0.22 (18)	2.57 ± 0.13 (18)
Neurondurchmesser (μm)	14.0 ± 0.4 (99)	13.7 ± 0.3 (96)

Tabelle 3.1: Hinsichtlich der grundlegenden Eigenschaften des verwendeten Präparats zeigen sich zwischen *bdnf*<sup>+/+</sup> und *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten zum Zeitpunkt P15 keine signifikanten Unterschiede. Neurondichte und -durchmesser wurden anhand der MAP-2 Färbung bestimmt. Die Anzahl der Untersuchungen bezieht sich bei der Neurondichte auf die Menge der ausgewerteten Schnitte.

Die Neurondichte und der Somadurchmesser wurden anhand einer MAP-2 Färbung – einem spezifischen und sensitiven neuronalen Marker (Zhou et al., 1995) – bestimmt. In Anbetracht der oben zitierten Arbeiten zeigten sich interessanterweise zum Zeitpunkt P15 keine signifikanten Veränderungen infolge der chronischen Abwesenheit von BDNF (siehe Tab. 3.1).

In der Ganzzellkonfiguration wurden durch de- und hyperpolarisierende Spannungsschritte (jeweils 8 mal +10 mV, +20 mV, -10 mV und -20 mV) ausgehend von einem Haltepotential

von -70 mV die Ganzzellkapazität als auch der Membranwiderstand bestimmt (Abb. 2.3). Wie aus Tabelle 3.1 zu ersehen ist, führt das Fehlen von BDNF im CS nicht zu einer signifikanten Änderung dieser passiven neuronalen Parameter.

## 3.2 BDNF-abhängige Modulation der Entladungsrate colliculärer Neurone

Neuronale Aktivität – hier als spontane Entladungsrate eines Neurons definiert – ist das Ergebnis eines Gleichgewichts zwischen Exzitation und Inhibition. Sie kann unter weitgehender Vermeidung von Manipulationen des studierten Neurons in der *cell attached*-Konfiguration bestimmt werden. Nach Lynch und Barry (1989) korreliert der so gemessene Strom mit der 1. Ableitung des Membranpotentials nach der Zeit. Ein AP stellt sich in der *cell attached*-Konfiguration bei einem Haltepotential von 0 mV aufgrund der schnellen Folge von De- und Repolarisation als ein scharf begrenztes, biphasisches Ereignis dar (Abb. 3.1A). Diese Messanordnung eignet sich sowohl für die kontinuierliche Aufzeichnung spontaner neuronaler Entladungen als auch für die Charakterisierung der Reaktion auf pharmakologische Manipulationen (McLarnon, 1991).

### 3.2.1 Pharmakologische Charakterisierung spontaner Aktionspotentiale

Die pharmakologische Charakterisierung der in der *cell attached*-Konfiguration gemessenen spontan generierten AP wurde zum Zeitpunkt P15 an Schnitten von *bdnf*<sup>+/+</sup> Mäusen durchgeführt.

Die Applikation des Na<sup>+</sup>-Kanal-Blockers TTX (1  $\mu$ M) führte innerhalb einer Minute zum Sistieren spontaner Entladungen. Diese Unterdrückung der AP-Generation war nach Beendigung der TTX-Applikation und zehnminütigem Auswaschen vollständig reversibel (Abb. 3.1B).

Durch Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission durch den AMPA-Blocker DNQX (200  $\mu$ M) und den NMDA-Blocker APV (200  $\mu$ M) sowie der cholinergen synaptischen Transmission durch Tubocurarin (20  $\mu$ M) lassen sich spontane Entladungen colliculärer Neurone unterbinden. Dieser Prozess ist nach zehnminütigem Auswaschen der verwendeten Blocker wahrscheinlich aufgrund der Persistenz von DNQX im Schnitt nicht vollständig reversibel. Interessanterweise ist die alleinige AMPA- und NMDA-Rezeptorblockade nicht ausreichend zur Suppression spontaner AP. Es verbleiben ca. 20% Prozent Restaktivität, die durch Zusetzen von Tubocurarin unterbunden werden kann. Dies könnte auf cholinerge Eingänge vom kontralateralen *Nucleus paraventricularis* zurückzuführen sein, von denen angenommen wird, dass ihre Aktivierung zur Erhöhung der Entladungsrate (z.B. durch Erhöhung der präsynaptischen

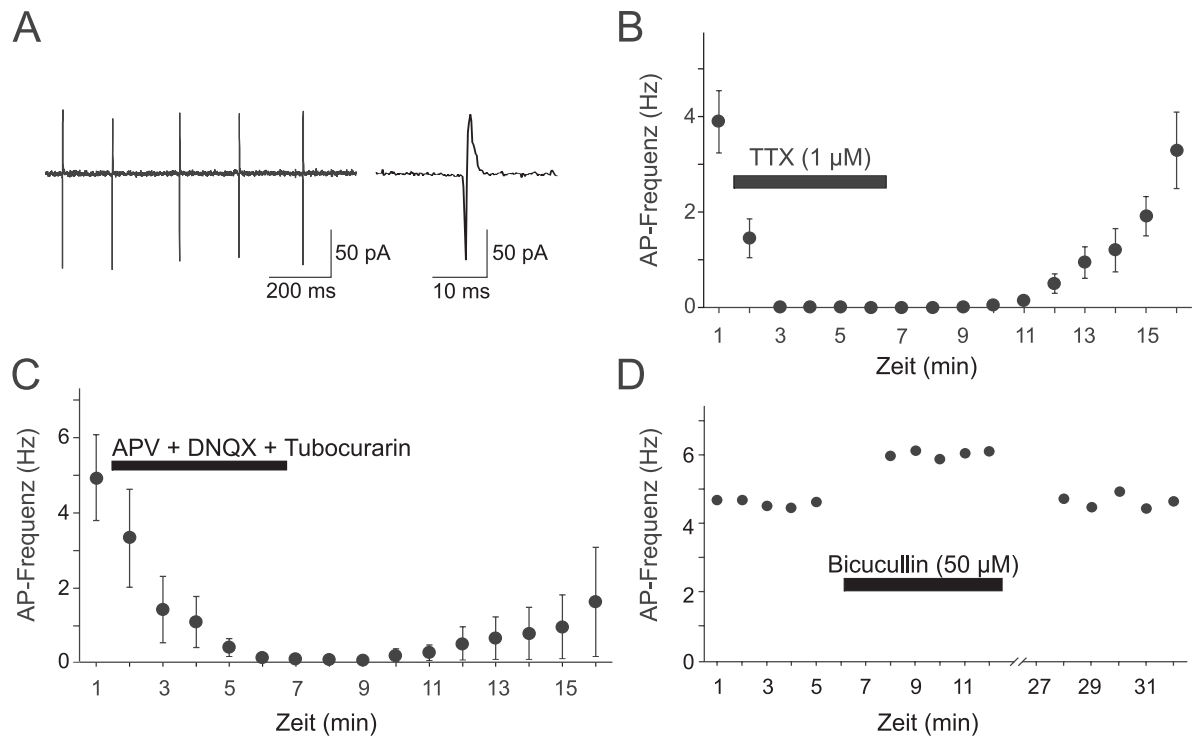


Abbildung 3.1: Charakterisierung spontaner AP in *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten zum Zeitpunkt P15. Die Größe und Form der AP wurde nicht analysiert. A: Beispiel der Registrierung von AP in der *cell attached*-Konfiguration. B: Applikation von 1  $\mu$ M TTX unterdrückt die Generierung von AP vollständig und reversibel (n=5). C: Die Blockade der glutamatergen (200  $\mu$ M APV und 200  $\mu$ M DNQX) und cholinergen (20  $\mu$ M Tubocurarin) synaptischen Transmission unterbindet das Entstehen spontaner AP (n=5). D: Durch Unterdrückung der GABAergen Inhibition mit Hilfe von Bicucullin kann die Entladungsrate reversibel gesteigert werden (n=5).

Glutamatfreisetzung) führt (Binns, 1999).

Blockade der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelten Inhibition durch 50  $\mu$ M Bicucullin erhöhte die Entladungsrate signifikant (Kontrolle:  $4.87 \pm 1.73$  Hz [n=5]; Bicucullin:  $5.54 \pm 1.78$  Hz [n=5];  $P < 0.05$ ) (Abb. 3.1D). Dieser Anstieg ist nach 15 minütigem Auswaschen von Bicucullin reversibel ( $4.64 \pm 1.87$  Hz [n=5]). Daraus lässt sich ableiten, dass die Rate spontaner AP im visuellen CS von der Stärke der GABAergen Inhibition abhängig ist.

Darüber hinaus ist das gezeigte Phänomen der pharmakologischen Disinhibition ein geeignetes Mittel zur Identifikation von Modulatoren der GABAergen synaptischen Transmission.



### 3.2.2 Postnatale Entwicklung des Entladungsverhaltens von *bdnf*<sup>+/+</sup> Mäusen

Zum Zeitpunkt P2/3 beträgt die spontane Entladungsrate colliculärer Neurone in *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten bereits  $0.93 \pm 0.35$  Hz ( $n=14$ ) und steigt bis zum Zeitpunkt P11/12 – kurz vor der Augenöffnung – auf  $3.73 \pm 0.68$  ( $n=11$ ) signifikant ( $P < 0.01$ ) an. Die Augenöffnung selbst zieht keine drastische Erhöhung der Netzwerkaktivität nach sich; die Frequenz spontaner Entladungen steigt bis P15 auf  $5.30 \pm 0.64$  ( $n=32$ ). Im Anschluss an die Augenöffnung erhöht sich die Entladungsrate bis P20/21 signifikant ( $P < 0.05$ ) auf  $9.11 \pm 1.53$  Hz ( $n=18$ ). Es ist keine weitere signifikante Änderung des Entladungsverhaltens bis zum Zeitpunkt P30/31 zu verzeichnen ( $8.44 \pm 1.86$  Hz [ $n=10$ ], *n.s.*) (Abb. 3.2).

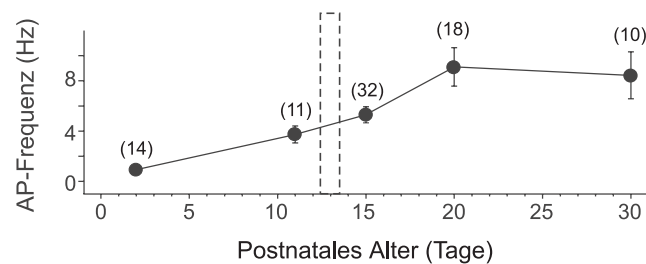


Abbildung 3.2: Die Rate, mit der Neurone spontan AP generieren, steigt mit zunehmendem Alter an, um am 20. postnatalen Tag ein Plateau zu erreichen. Der Zeitpunkt der Augenöffnung ist im Diagramm als gestrichelter Kasten illustriert.

Hinsichtlich der Entwicklung der Netzwerkaktivität ist interessant, dass schon kurz nach Geburt (P2/3) spontane AP beobachtet wurden. Applikation des GABA<sub>A</sub>-Rezeptorblockers Bicucullin ( $50 \mu\text{M}$ ) führte zu einem signifikanten Anstieg der Entladungsrate (Kontrolle:  $0.61 \pm 0.11$  Hz [ $n=5$ ]; Bicucullin  $1.15 \pm 0.43$  Hz [ $n=5$ ];  $P < 0.05$ ). Da sich mit Hilfe des Ca<sup>2+</sup>-Imaging nachweisen ließ, dass zu diesem Zeitpunkt GABA seine Funktion als exzitatorischer Neurotransmitter bereits verloren hat (J. Akyeli, persönliche Mitteilung), zeigt dieser Befund, dass die GABAerge Inhibition schon kurz nach der Geburt voll funktionstüchtig und in der Lage ist, die Netzwerkaktivität zu kontrollieren.

### 3.2.3 BDNF erhöht die Entladungsrate colliculärer Neurone

Der Vergleich der spontanen Entladungsrate in *bdnf*<sup>+/+</sup> und *-/-* Schnitten zum Zeitpunkt P15 zeigt, dass die Inaktivierung des BDNF-Gens zu einer signifikanten Verringerung der AP-Frequenz führt (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $5.30 \pm 0.64$  Hz [ $n=32$ ]; *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $2.52 \pm 0.34$  Hz [ $n=21$ ];  $P < 0.01$ ).

K-252a ist ein potenter Inhibitor des BDNF-Rezeptors TrkB (Knüsel und Hefti, 1992). Um zu überprüfen, ob es sich bei der Erhöhung der Entladungsrate um einen über TrkB-vermittelten Effekt handelt, wurden Schnitte beider Genotypen zunächst mit K-252a (200 nM)

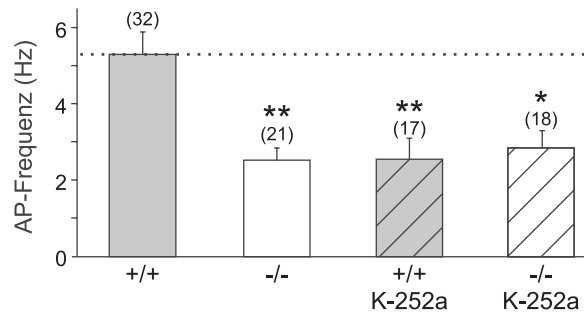


Abbildung 3.3: Die spontane Entladungsrates colliculärer Neurone ist in Abwesenheit von BDNF signifikant geringer. TrkB-Blockade in *bdnf*+/+ Schnitten imitiert das chronische Fehlen von BDNF, während in *bdnf*-/- Schnitten keine weitere Veränderung durch K252a zu beobachten ist. Signifikanzniveaus sind in Bezug auf *bdnf*+/+ Schnitte ohne K-252a angegeben.

für anderthalb Stunden inkubiert. Anschließend wurde in Anwesenheit von 200 nM K-252a die spontane Entladungsrates bestimmt (Abb. 3.3).

Es zeigte sich, dass TrkB-Blockade in *bdnf*+/+ Schnitten eine signifikante Verminderung der Entladungsrates nach sich zieht ( $2.56 \pm 0.55$  Hz [n=17],  $P < 0.01$ ). Bei Blockade von TrkB in *bdnf*-/- Schnitten ergab sich im Vergleich zu unbehandelten *bdnf*-/- Schnitten keine signifikante Veränderung ( $2.86 \pm 0.45$  Hz [n=18]).

Diese Ergebnisse zeigen, dass allein die anderthalbstündige Blockade von TrkB-Rezeptoren ausreicht, um in *bdnf*+/+ Schnitten das Entladungsverhalten von *bdnf*-/- Schnitten herzustellen. Die fehlende Modulation des Entladungsverhaltens durch K-252a in *bdnf*-/- Schnitten gibt weiterhin Anlass zu der Vermutung, dass die in *bdnf*-/- Schnitten beobachtete Reduktion der Entladungsrates durch die fehlende Aktivierung von TrkB-Rezeptoren zustande kommt, und es sich demzufolge um eine spezifische Folge des akuten Fehlens von BDNF handelt. Weiterhin ist hiermit eine kompensatorisch verstärkte Ausschüttung anderer TrkB-Liganden (z.B. NT3, NT4) als unwahrscheinlich zu betrachten.

Für *bdnf*+/+ Mäuse kann geschlussfolgert werden, dass Neurotrophine im CS vorhanden sind, sezerniert werden und TrkB aktivieren.

### 3.2.4 Das intrinsische Entladungsverhalten colliculärer Neurone wird von BDNF nicht beeinflusst

Die durch das funktionelle Fehlen von BDNF – durch Inaktivierung des Gens im *bdnf*-/- Tier oder Blockade des BDNF-Rezeptors TrkB – verringerte spontane Entladungsrates kann durch mehrere Mechanismen erklärt werden. So könnte BDNF die exzitatorische synaptische Trans-

mission positiv oder die inhibitorische negativ modulieren. Weiterhin ist eine Verringerung der Erregbarkeit in Betracht zu ziehen. So konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung des Entladungsverhaltens von RGZ in *bdnf*<sup>-/-</sup> Tieren verzögert abläuft (Rothe et al., 1999). Diese Möglichkeit wurde durch die Messung depolarisationsinduzierter Aktionspotentiale in der *current-clamp*-Konfiguration genauer untersucht.

Es sind drei Formen der AP-Generierung colliculärer Neurone – erstmals von Lo und Mize (1999) nach Stimulation des *Tractus opticus* beschrieben - zu unterscheiden: Neurone, die auf Depolarisation mit einem einzelnen AP reagieren, die eine Reihe von AP generieren und die über die gesamte Dauer der Depolarisation AP erzeugen (letzteres ist in Abb. 3.4A illustriert).

Hinsichtlich der Zuordnung zu den drei Gruppen unterscheiden sich die beiden Genotypen nicht signifikant (einzelnes AP: *bdnf*<sup>+/+</sup> 7%, *bdnf*<sup>-/-</sup> 9%; eine Reihe von AP: *bdnf*<sup>+/+</sup> 21%, *bdnf*<sup>-/-</sup> 21%; Dauerentladung: *bdnf*<sup>+/+</sup> 72%, *bdnf*<sup>-/-</sup> 70%). Auch hinsichtlich der minimalen und mittleren AP-Intervalle ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Minimum: *bdnf*<sup>+/+</sup> 16.4 ± 2.2 ms [n=8], *bdnf*<sup>-/-</sup> 17.0 ± 1.9 ms [n=9]; Mittelwert: *bdnf*<sup>+/+</sup> 30.8 ± 3.5 ms [n=8], *bdnf*<sup>-/-</sup> 30.7 ± 3.1 ms [n=9]) (Abb. 3.4B). Daraus lassen sich maximale Entladungsraten von 61.0 Hz für *bdnf*<sup>+/+</sup> bzw. 58.8 Hz für *bdnf*<sup>-/-</sup> Neurone ableiten.

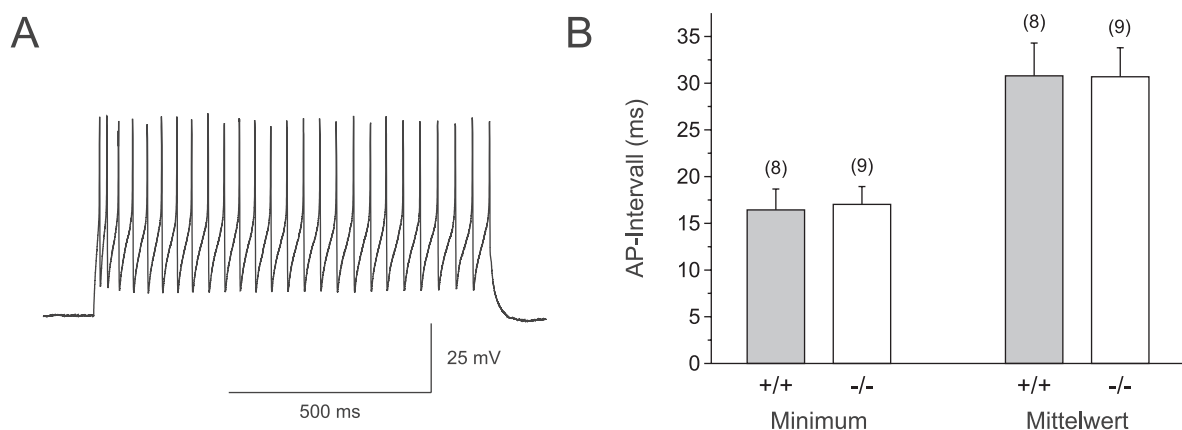


Abbildung 3.4: Das Entladungsverhalten colliculärer Neurone in der *current-clamp*-Konfiguration zeigt keine Unterschiede zwischen *bdnf*<sup>+/+</sup> und *-/-* Schnitten zum Zeitpunkt P15. A: Beispiel einer Messung von einem *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitt. B: Weder das minimale noch das durchschnittliche AP-Intervall wird durch die An- bzw. Abwesenheit von BDNF verändert.

Damit ist es unwahrscheinlich, dass die in Abb. 3.3 gezeigte Veränderung des spontanen Entladungsverhaltens durch die Modulation der depolarisationsinduzierten AP-Generierung zu erklären ist.

### 3.2.5 BDNF erhöht die Entladungsrates durch Modulation der GABAergen Hemmung

Eine Erklärung für die zuvor beobachtete Erhöhung der Entladungsrates in Anwesenheit von BDNF könnte in der Suppression der GABAergen Hemmung bestehen. Im Abschnitt 3.2.1 konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von AP in der *cell attached*-Konfiguration und GABA<sub>A</sub>-Rezeptorblockade mit 50  $\mu$ M Bicucullin ein geeignetes Mittel ist, die Wirkung der GABAergen Inhibition auf die Entladungsrates colliculärer Neurone zu bestimmen. Quantifiziert werden kann diese als das Verhältnis der Entladungsrates unter Bicucullin zu der unter Kontrollbedingungen ( $f_{Bicucullin}/f_{Kontrolle}$ ).

Wie in Abb. 3.5 dargestellt, erhöhte sich in *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten durch Bicucullin-Applikation die Entladungsrates um 31% ( $f_{Bicucullin}/f_{Kontrolle}$ :  $1.31 \pm 0.17$  [n=14]). Blockade der GABAergen synaptischen Transmission in *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten ergab einen signifikant höheren Anstieg der Entladungsrates ( $f_{Bicucullin}/f_{Kontrolle}$ :  $1.99 \pm 0.32$  [n=11],  $P < 0.05$ ). In Abwesenheit von BDNF nimmt der Einfluss der GABAergen Hemmung auf die Entladungsrates also zu, was die beobachtete verringerte spontane Aktivität (Abschnitt 3.2.3) erklärt. Dies ist als ein erster Hinweis darauf zu werten, dass BDNF die GABAerge Inhibition negativ moduliert.

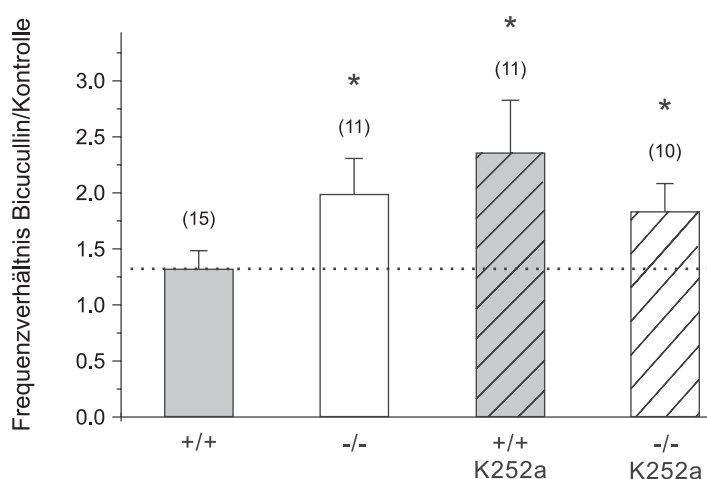


Abbildung 3.5: Der relative Anstieg der Entladungsrates durch Blockade der GABAergen Hemmung ( $f_{Bicucullin}/f_{Kontrolle}$ ) in Abhängigkeit von der Anwesenheit von BDNF und TrkB-Rezeptor-Blockade (K-252a). Signifikanzniveaus sind in Bezug auf *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitte ohne K-252a angegeben.

TrkB-Blockade mittels K-252a in *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten, wie in Abschnitt 3.2.3 bereits beschrieben, erhöhte den relativen Zuwachs der Entladungsrates durch GABA<sub>A</sub>-Rezeptorblockade signifikant ( $f_{Bicucullin}/f_{Kontrolle}$ :  $2.34 \pm 0.46$  [n=11],  $P < 0.05$ ).

In *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten führte die TrkB-Blockade zu keiner signifikanten Änderung von  $f_{Bicucullin}/f_{Kontrolle}$  im Vergleich zu unbehandelten *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten ( $f_{Bicucullin}/f_{Kontrolle}$ : 1.84

$\pm 0.25$  [n=10]).

Wie schon bei der Veränderung der Entladungsrate durch Abwesenheit von BDNF gezeigt, imitieren *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitte nach TrkB-Blockade das Verhalten von *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten, während eine TrkB-Blockade in *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten zu keiner weiteren signifikanten Änderung von  $f_{Bicucullin}/f_{Kontrolle}$  führt. Dies unterstreicht die Annahme, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen um BDNF-abhängige, TrkB-vermittelte Effekte handelt.

### 3.3 Postsynaptische Suppression der GABAergen Transmission durch BDNF

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt, erhöht BDNF die Entladungsrate colliculärer Neurone durch die Suppression der GABAergen Inhibition. Im folgenden sollte dies anhand von Messungen in der Ganzzellkonfiguration verifiziert werden. Darüber hinaus war zu klären, ob es sich um eine prä- oder postsynaptische Modulation handelt.

Für die folgenden Messungen wurden GABAerge IPSC pharmakologisch durch Blockade der glutamatergen (DNQX und APV) und glycinergen (Strychnin) synaptischen Transmission isoliert.

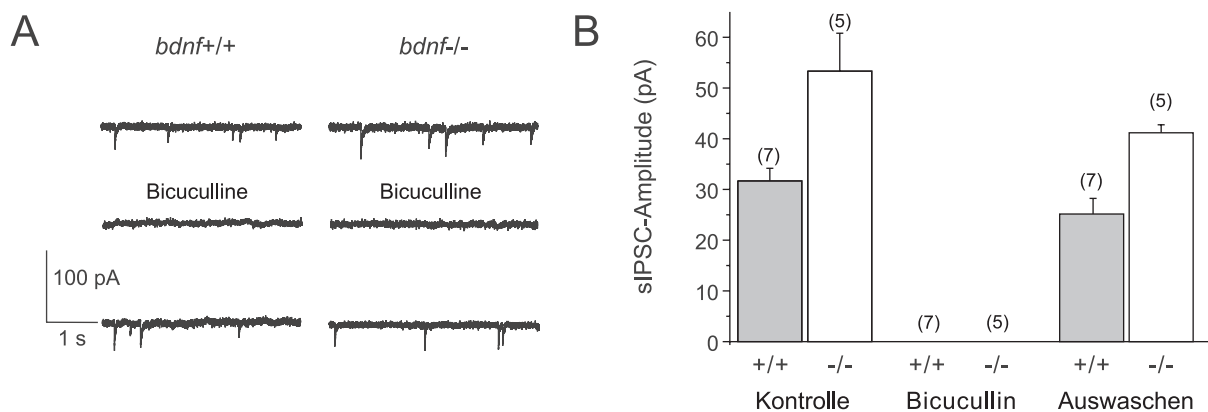


Abbildung 3.6: Vollständige und reversible Blockade der isolierten sIPSC in beiden Genotypen durch 50  $\mu$ M Bicucullin. A: Beispielspuren mit sIPSC in Kontrolle, unter Bicucullin und nach dem Auswaschen. B: Sowohl in *bdnf*<sup>+/+</sup> und *-/-* Schnitten führt die Blockade von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren zur vollständigen, reversiblen Unterdrückung der sIPSC.

Um sicherzustellen, dass die verbleibenden IPSC über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vermittelt werden, wurden ohne Suppression von Netzwerkaktivität spontane IPSC (sIPSC) nach folgendem Protokoll aufgezeichnet: Aufnahme der Kontrolle über 5 Minuten, Aufzeichnen von sIPSC und

Applikation von Bicucullin ( $50 \mu\text{M}$ ) über die Badlösung für weitere 5 Minuten, Auswaschen von Bicucullin über 15 Minuten und Aufnahme einer weiteren Kontrolle.

Sowohl in *bdnf*<sup>+/+</sup> als auch *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten führt die Blockade von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren zur vollständigen Unterdrückung von sIPSC. Damit ist sichergestellt, dass die isolierten IPSC ausschließlich von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren herrühren. Weiterhin zeigt dies, dass die für pharmakologische Manipulationen der Entladungsrate (Abschnitt 3.2.5) gewählte Bicucullin-Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  ausreicht, die GABAerge Inhibition vollständig zu unterdrücken.

### 3.3.1 BDNF senkt die Amplitude spontaner und evozierter GABAerger IPSC

Nachdem sichergestellt wurde, dass die pharmakologisch isolierte Aktivität ausschließlich durch GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vermittelt wird, sollte die in Abschnitt 3.2.5 formulierte Annahme bestätigt werden, dass BDNF die GABAerge synaptische Transmission inhibiert.

Hierzu wurden sowohl sIPSC als auch evozierte IPSC (eIPSC), die als die postsynaptische Antwort auf die Stimulation eines einzelnen Axons aufzufassen sind, aufgezeichnet. In Abb. 3.7 sind die erhobenen Befunde dargestellt.

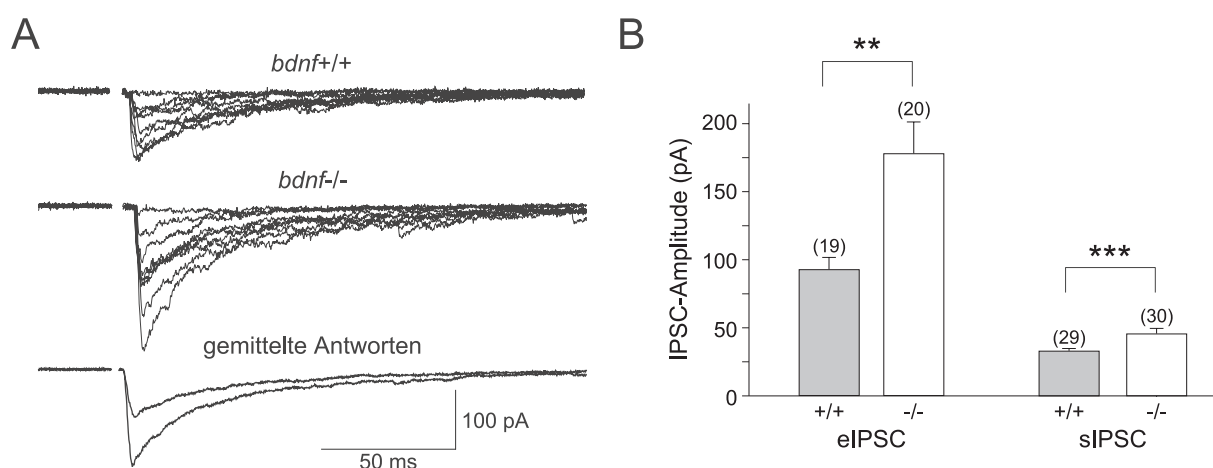


Abbildung 3.7: BDNF vermindert die Amplitude GABAerger sIPSC und eIPSC. A: Von oben nach unten sind beispielhaft eIPSC von *bdnf*<sup>+/+</sup> und *bdnf*<sup>-/-</sup> Mäusen und deren gemittelte Antworten dargestellt. Stimulationsartefakte wurden entfernt. B: Das Fehlen von BDNF führt zu einer signifikanten Erhöhung der Amplituden GABAerger eIPSC und sIPSC.

Der Vergleich der mittleren Amplituden der eIPSC ergibt, dass diese in Anwesenheit von BDNF signifikant geringer ausfallen (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $93.5 \pm 8.0 \text{ pA}$  [n=19], *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $178.4 \pm 20.2 \text{ pA}$  [n=20],  $P < 0.01$ ), während die Analyse der Kinetik der eIPSC weder eine Änderung der mittleren Abfallskinetik ( $\tau$ ) (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $14.3 \pm 1.1 \text{ ms}$  [n=19], *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $15.8 \pm 1.2 \text{ ms}$  [n=20],

*n.s.*) noch der Anstiegszeit von 20 auf 80% der erreichten Amplitude (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $0.68 \pm 0.10$  ms [*n*=5], *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $0.68 \pm 0.24$  ms [*n*=5], *n.s.*) zu Tage brachte.

Der Variationskoeffizient (CV) der Amplituden unterschied sich in Abwesenheit von BDNF nicht signifikant vom Kontrollwert (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $0.34 \pm 0.05$  [*n*=5], *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $0.33 \pm 0.03$  [*n*=5], *n.s.*). Ohne Berücksichtigung einer möglichen Sättigung postsynaptischer Rezeptoren gilt nach Bennett und Kearns (2000):

$$CV = \sqrt{\frac{1-p}{np}}$$

Hierbei beschreibt *p* die präsynaptische Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit und *n* die Anzahl der Freisetzungsorte. Da aus keinem der bisher aufgeführten Ergebnisse diese Parameter abzulesen sind, benötigt man weitere Experimente, um eine Modulation dieser präsynaptischen Parameter zu bestätigen oder auszuschließen (siehe Abschnitte 3.3.3 und 3.3.4).

Der Vergleich der GABAergen sIPSC ergab ebenso eine signifikante Suppression der Amplitude in Anwesenheit von BDNF (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $32.23 \pm 2.19$  pA [*n*=29], *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $42.15 \pm 2.70$  pA [*n*=30], *P* < 0.001). Wiederum bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen hinsichtlich der mittleren Kinetik der aufgezeichneten sIPSC (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $20.31 \pm 1.74$  ms [*n*=29], *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $22.07 \pm 1.68$  ms [*n*=30], *n.s.*). Auch führte das Fehlen von BDNF zu keiner signifikanten Modulation der Frequenz der sIPSC (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $0.82 \pm 0.27$  Hz [*n*=29], *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $0.75 \pm 0.20$  Hz [*n*=30], *n.s.*).

Dies zeigt, dass BDNF in den visuellen Schichten des CS die GABAerge synaptische Transmission durch eine signifikante Suppression der Amplitude der IPSC beeinflusst, ohne deren mittlere Kinetik zu verändern.

### 3.3.2 Die Amplitude GABAerger mIPSC, nicht jedoch deren Frequenz wird durch BDNF moduliert

Offen blieb bisher, wo die Modulation von BDNF an der GABAergen Synapse stattfindet. Prinzipiell kommen hier die prä- und die postsynaptische Seite in Frage.

Ein oft verwendeter experimenteller Ansatz besteht in der Registrierung von Miniatur-IPSC (mIPSC). Hierbei wird die Generierung von AP durch Applikation von TTX (1  $\mu$ M) unterbunden. Ausgewertet werden sowohl die Frequenz als auch die Amplitude der aufgetretenen mIPSC. Es ist anzunehmen, dass eine isolierte Veränderung der Frequenz einem präsynaptischen bzw. eine alleinige Regulation der Amplitude einem postsynaptischen Mechanismus zuzuschreiben ist.

Beispiele aufgezeichneter mIPSC beider Genotypen sind in Abb. 3.8 dargestellt. Die Analyse

der mIPSC-Amplituden zeigt die bereits beschriebene Suppression der GABAergen Transmission durch BDNF. In Abwesenheit von BDNF verschiebt sich die Amplitudenverteilung zugunsten höherer Ströme (Abb. 3.8C), was sich in signifikant höheren mittleren Amplituden niederschlägt (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $21.3 \pm 1.9$  pA [n=13], *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $33.7 \pm 4.3$  pA [n=13],  $P < 0.05$ ).

Die Blockade des Signalwegs von TrkB mit K252a führte in *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten zu einer signifikanten Aufregulation der Amplitude im Vergleich zu unbehandelten Schnitten ( $30.8 \pm 3.3$  pA [n=12]). Das Ausbleiben eines Effekts der K252a-Behandlung auf die Amplitude bei *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten ( $29.5 \pm 2.7$  pA [n=11]) im Vergleich zu unbehandelten *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten zeigt, dass es sich bei dem Einfluss von BDNF auf die synaptische GABAerge Transmission um einen TrkB-vermittelten Effekt handelt.

Deletion des BDNF-Gens oder TrkB-Blockade zeigten keinen Einfluss auf die mittlere Kinetik GABAerger mIPSC (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $20.4 \pm 1.5$  ms [n=13]; *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $22.7 \pm 2.1$  ms [n=13]; *bdnf*<sup>+/+</sup> K252a:  $20.6 \pm 2.8$  ms [n=12]; *bdnf*<sup>-/-</sup> K252a:  $23.5 \pm 1.8$  ms [n=11]).

Hinsichtlich der Frequenz der GABAergen mIPSC ist zu beobachten, dass weder An- oder Abwesenheit von BDNF noch TrkB-Blockade zu einer signifikanten Modulation dieses Parameters führte (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $0.11 \pm 0.03$  Hz [n=13]; *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $0.13 \pm 0.04$  Hz [n=13]; *bdnf*<sup>+/+</sup> K252a:  $0.14 \pm 0.03$  Hz [n=12]; *bdnf*<sup>-/-</sup> K252a:  $0.14 \pm 0.03$  Hz [n=11]).

Auffällig ist die angedeutete (Abb. 3.8) aber nichtsignifikante Erhöhung der mIPSC Frequenz in allen untersuchten Konditionen im Vergleich zu *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten. Da in *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten jedoch die mIPSC Amplituden deutlich geringer sind, kann der – bei Amplituden der Größenordnung von einigen pA – abnehmende Abstand zwischen Signal und Rauschen und die daraus resultierende abfallende Detektierbarkeit von mIPSC als Erklärung herangezogen werden.

Aufgrund dieser Beobachtungen kann man vermuten, dass BDNF die GABAerge Transmission durch einen postsynaptischen Mechanismus supprimiert. Auf der anderen Seite könnte eine Verringerung von  $p$  bei gleichzeitiger Erhöhung der Anzahl synaptischer Kontakte die erhobenen Messdaten ebenso erklären. Da sowohl für eine BDNF-abhängige Modulation von  $p$  (Li et al., 1998) als auch für eine Veränderung der Anzahl inhibitorischer Kontakte (Huang et al., 1999) Hinweise existieren, waren detailliertere Untersuchungen nötig.



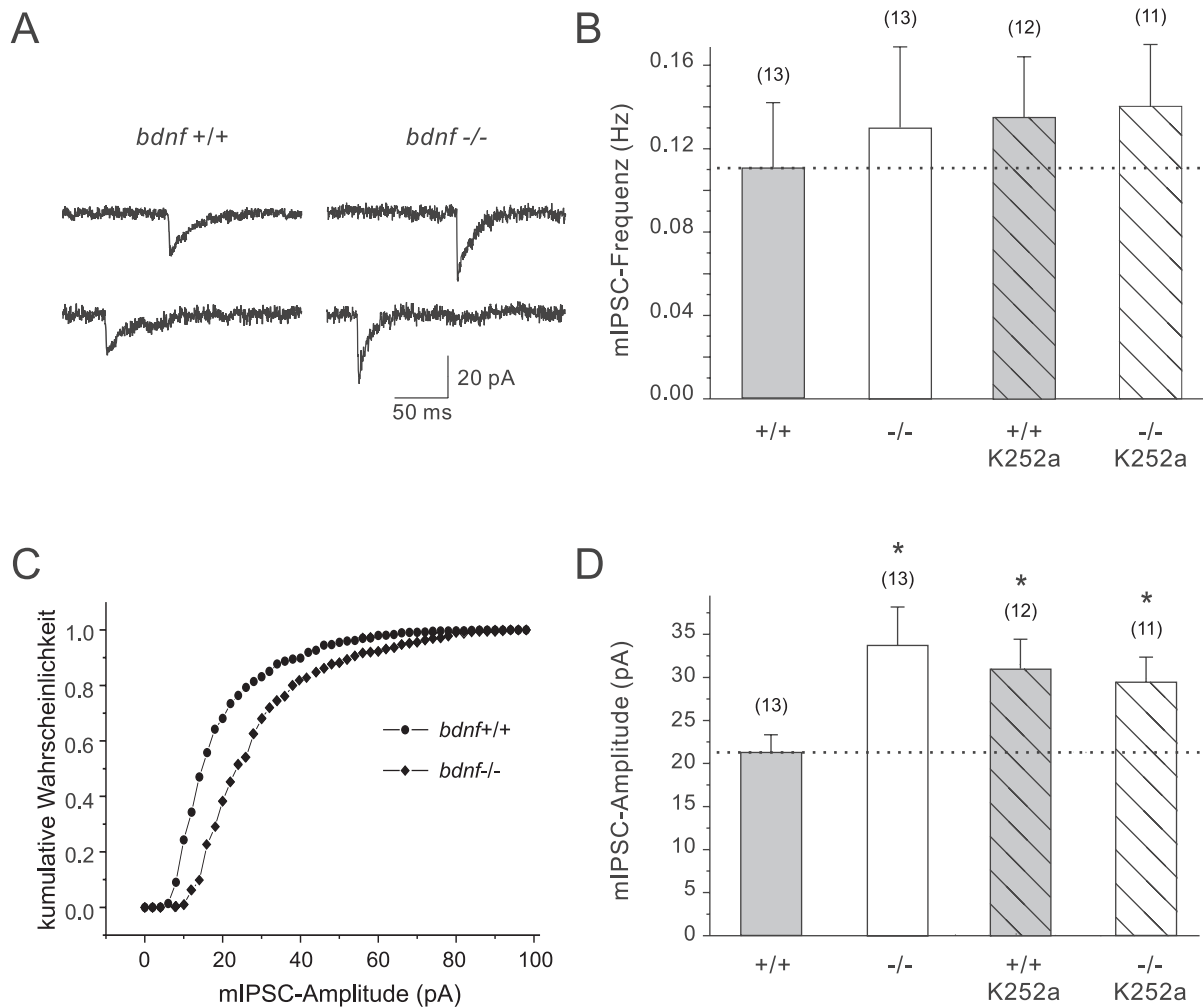


Abbildung 3.8: GABAerge mIPSC. A: Beispiel abgeleiteter mIPSC aus je einem *bdnf*<sup>+/+</sup> und *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitt. B: Es findet sich kein signifikanter Frequenzunterschied der mIPSC zwischen *bdnf*<sup>+/+</sup> und *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten mit oder ohne K252a. C: Kumulative Wahrscheinlichkeit von mIPSC Amplituden von *bdnf*<sup>+/+</sup> und *bdnf*<sup>-/-</sup> Tieren. D: *bdnf*<sup>-/-</sup> zeigen im Vergleich zu *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten eine signifikant höhere mIPSC-Amplitude, welche durch K252a nicht beeinflusst wird. TrkB-Blockade in *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten führt zu einer signifikanten Anhebung der mIPSC Amplituden auf *bdnf*<sup>-/-</sup> Niveau.

### 3.3.3 BDNF führt nicht zu einer Änderung des Paarpulsverhaltens

Eine Möglichkeit  $p$  indirekt zu erfassen, stellt die Aufzeichnung des Paarpulsverhaltens GABA-erger eIPSC dar. Eine Erhöhung von  $p$  ist für gewöhnlich von einer Verminderung des Grades der Paarpulsfazilitierung (PPF) begleitet (Jiang et al., 2000). Nach der Augenöffnung ist PPF die vorwiegende Antwort GABAerger Synapsen im visuellen CS auf Paarpulsaktivierung mit kurzen Intervallen (Jüttner et al., 2001b).

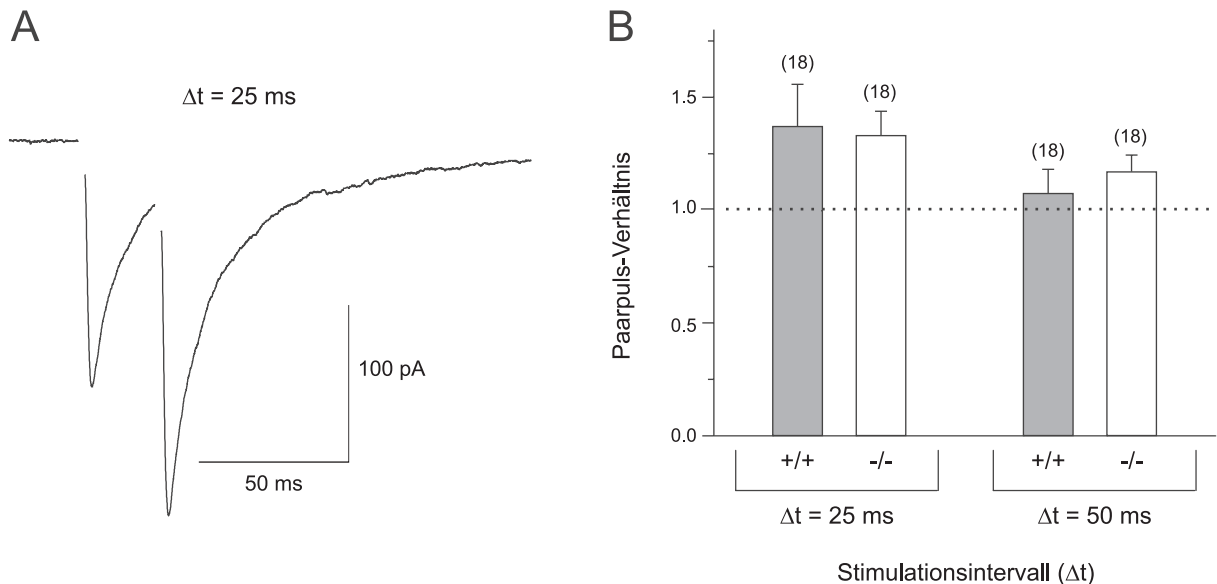


Abbildung 3.9: Paarpulsverhalten GABAerger eIPSC. A: Beispiel einer Paarpulsableitung mit einem Stimulationsintervall ( $\Delta t$ ) von 25 ms. Die Stimulationsartefakte wurden entfernt. B: Weder bei  $\Delta t = 25$  ms noch bei  $\Delta t = 50$  ms unterscheiden sich  $bdnf^{+/+}$  und  $bdnf^{-/-}$  Schnitte im Paarpulsverhalten.

Wie in Abb. 3.9 illustriert, zeigen sowohl  $bdnf^{+/+}$  als auch  $bdnf^{-/-}$  Schnitte bei einem Stimulationsintervall  $\Delta t$  von 25 ms PPF, ohne sich dabei signifikant voneinander zu unterscheiden ( $bdnf^{+/+}$ :  $1.37 \pm 0.19$  [n=18];  $bdnf^{-/-}$ :  $1.33 \pm 0.11$  [n=18]; *n.s.*). Bei einem  $\Delta t$  von 50 ms ist ein Rückgang in der PPF bei beiden Genotypen zu verzeichnen ( $bdnf^{+/+}$ :  $1.08 \pm 0.11$  [n=18];  $bdnf^{-/-}$ :  $1.17 \pm 0.07$  [n=18]; *n.s.*).

Die hierbei verwendeten  $\Delta t$  sind nicht zu klein gewählt, da – wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben – colliculäre Neurone diesen Alters unabhängig vom Genotyp mit maximal 60 Hz (entsprechend einem  $\Delta t$  von 16.7 ms) AP generieren können.

Ausgehend von diesen Beobachtungen erscheint eine Modulation von  $p$  durch BDNF im CS unwahrscheinlich. Aufgrund des Auftretens von PPF ist vom einer niedrigen  $p$  der GABAergen Synapsen im CS auszugehen. Diese Schlussfolgerung wird durch den hohen CV der Amplituden

GABAerger eIPSC gestützt (Abschnitt 3.3.1).

### 3.3.4 Die Anzahl inhibitorischer Boutons wird durch BDNF nicht verändert

Ein weiterer Parameter, dessen Modulation die Suppression der GABAergen synaptischen Transmission durch BDNF erklären könnte, ist die Anzahl der GABAergen Synapsen. Der vesikuläre, inhibitorische Aminosäuretransporter (VIAAT) (Dumoulin et al., 2000) ist ein zuverlässiger Marker inhibitorischer Kontakte und eignet sich daher aufgrund der Abwesenheit glycinergere synaptischer Transmission in diesem Alter (Dr. J. Meier, persönliche Mitteilung) zur Bestimmung der Dichte GABAerger Synapsen.

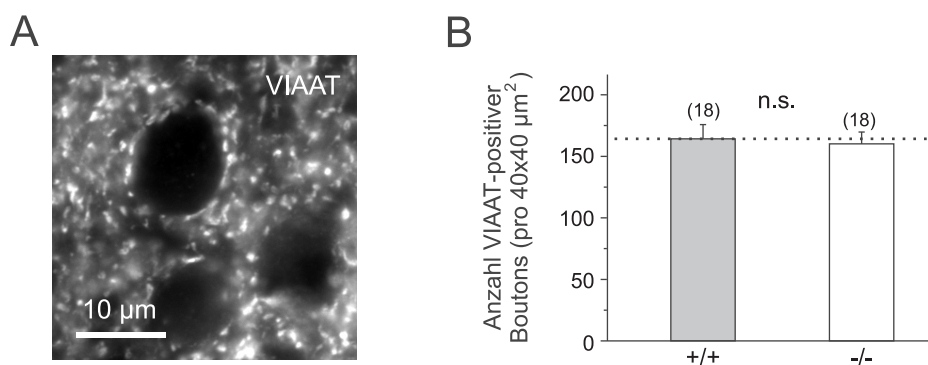


Abbildung 3.10: VIAAT-positive Boutons. A: Bild einer immunhistochemischen Aufarbeitung eines 10  $\mu\text{m}$  dicken Gefrierschnittes von einer *bdnf*<sup>+/+</sup> Maus mittels eines gegen VIAAT gerichteten Primärantikörpers. B: Der Vergleich der Dichten GABAerger Synapsen in *bdnf*<sup>+/+</sup> und *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten erbringt keinen signifikanten Unterschied.

Ein immunohistochemischer Vergleich (Abb. 3.10) von *bdnf*<sup>+/+</sup> und *-/-* Gefrierschnitten zeigt, dass die Anzahl inhibitorischer Kontakte pro  $40 \times 40 \mu\text{m}^2$  (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $163.0 \pm 11.3$  [n=20]; *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $159.9 \pm 9.7$  [n=20]; *n.s.*) durch das Fehlen bzw. die Anwesenheit von BDNF nicht beeinflusst wird. Die Anzahl der GABAergen Kontakte gibt nur indirekt Auskunft darüber, wie viele Freisetzungsorte vorhanden sind und ob beide Genotypen über die gleiche Menge bzw. Dichte verfügen. Da *p* in *bdnf*<sup>+/+</sup> und *-/-* Schnitten jedoch gleich ist und darüber hinaus die mIPSC-Frequenzen nicht verschieden sind, ist davon auszugehen, dass auch die Anzahl der Freisetzungsorte durch BDNF nicht wesentlich verändert wird.

## 3.4 Mechanismen der BDNF-Wirkung an der GABAergen Synapse

Die bisher gezeigten Experimente deuten darauf hin, dass BDNF die Amplitude GABAerger IPSC durch einen postsynaptischen Mechanismus vermindert, da keine Veränderungen präsyn-

aptischer Parameter, wohl aber eine Amplitudenreduktion GABAerger IPSC durch BDNF zu beobachten war. Mögliche Ansatzpunkte hierfür sind die Verminderung der Anzahl postsynaptischer Rezeptoren, eine Veränderung ihrer Zusammensetzung, Öffnungswahrscheinlichkeit oder ihres Desensitisierungsverhaltens und die Verringerung der Leitfähigkeit des einzelnen Kanals.

### 3.4.1 Abwesenheit von BDNF führt zur Sättigung postsynaptischer Rezeptoren

#### Korrelation von Kinetik und Amplitude GABAerger Ströme

Die Rezeptoranzahl beeinflusst sowohl die Amplitude der postsynaptischen Ströme als auch deren Kinetik. Steht während der synaptischen Übertragung mehr Neurotransmitter als postsynaptische Rezeptoren zur Verfügung, kommt es zur Sättigung (Auger und Marty, 2000). Hier wird die Amplitude der PSC nur noch durch die Anzahl der Rezeptoren bestimmt. Weiterhin kommt es zu einer Veränderung der Kinetik, die Zeitkonstante  $\tau$  nimmt zu.

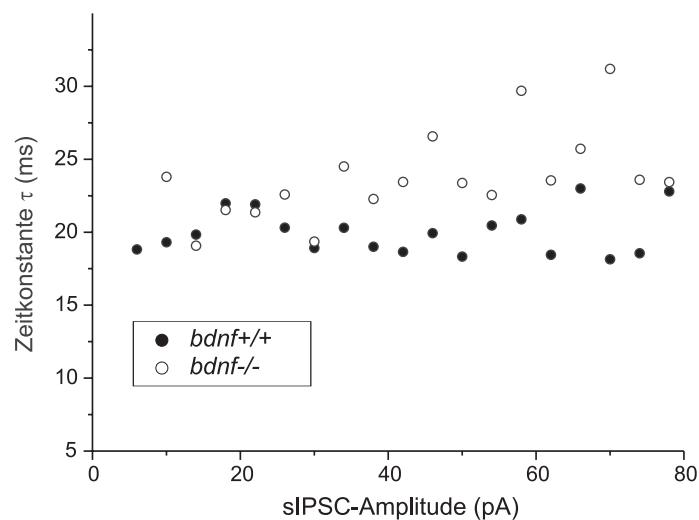


Abbildung 3.11: Korrelation zwischen der Amplitude und der Zeitkonstanten  $\tau$  GABAerger sIPSC in *bdnf+/+* und *-/-* Schnitten. In Abwesenheit von BDNF nimmt die mittlere Dauer eines sIPSC mit steigender Amplitude zu – ein Effekt, der bei *bdnf+/+* Schnitten nicht beobachtet werden kann.

Unter diesem Gesichtspunkt wurde der Zusammenhang zwischen der Amplitude und  $\tau$  GABAerger sIPSC beider Genotypen untersucht (Abb. 3.11). Es zeigt sich, dass in *bdnf-/-* Schnitten eine Korrelation vorhanden ist (Spearman-Test:  $P < 0.01$ ), die sich in *bdnf+/+* Schnitten nicht findet ( $P = 0.79$ ). Applikation von exogenem BDNF auf *bdnf-/-* Schnitte (detailliert in Abschnitt 3.4.3 beschrieben) beseitigt den in *bdnf-/-* Schnitten beobachteten Zusammenhang innerhalb von 10 Minuten ( $P = 0.38$ ).

Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass die postsynaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in Abwesenheit von BDNF eher gesättigt sind. Als mögliche Ursachen kommen hierfür eine Verminderung der Rezeptoranzahl, veränderte Rezeptoreigenschaften, eine herabgesetzte Wiederaufnahme von GABA oder auch eine Erhöhung des Neurotransmittergehalts präsynaptischer Vesikel in Frage. Aufgrund der Tatsache, dass es sich hierbei um ein innerhalb von 10 Minuten umkehrbares Phänomen handelt, kann es sich nicht um ein entwicklungsbedingtes Defizit und nicht um einen über *de-novo* Proteinsynthese vermittelten Prozess handeln.

### Applikation von Zolpidem

Ein weiterer Ansatz, den Zustand der Rezeptorsättigung zu überprüfen und damit Rückschlüsse auf deren Anzahl ziehen zu können, ist die Applikation von Benzodiazepinen und insbesondere Zolpidem (Perrais und Ropert, 1999; Hájos et al., 2000). Diese erhöhen die Affinität von GABA zu seinem Rezeptor. Sind die Rezeptoren vollständig besetzt, wird unter Applikation dieser Substanzen keine Erhöhung der IPSC-Amplitude zu beobachten sein. Kommt es jedoch zu einem Anstieg der Amplitude, ist die Sättigung der Rezeptoren unwahrscheinlich.

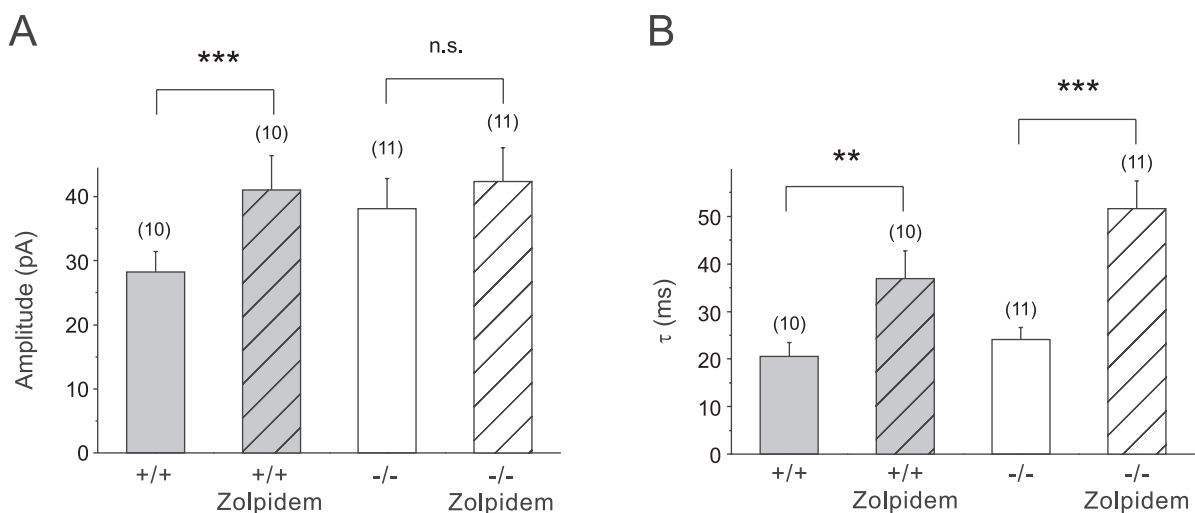


Abbildung 3.12: Messung GABAerger sIPSC und Applikation von Zolpidem. A: Applikation von 10  $\mu$ M Zolpidem erhöht signifikant die mittlere Amplitude GABAerger sIPSC in *bdnf*+/+ Schnitten auf das Niveau von *bdnf*-/- Schnitten. In letzteren führt Zolpidem nicht zu einer Amplitudenzunahme. B: In beiden Genotypen ist die Applikation von Zolpidem von einem signifikanten Anstieg von  $\tau$  begleitet.

Die Modulation der sIPSC-Kinetik durch Zolpidem wurde experimentell folgendermaßen bestimmt: Aufnahme der Kontrollwerte über 5 Minuten, Badapplikation von Zolpidem (10  $\mu$ M) über 7 Minuten und Registrierung der sIPSC in den letzten 5 Minuten, Auswaschen von Zolpidem für weitere 15 Minuten und Aufnahme einer weiteren Kontrolle über 5 Minuten.

Unter Applikation von Zolpidem steigt die Zeitkonstante  $\tau$  der sIPSC sowohl in *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten (Kontrolle:  $20.6 \pm 2.9$  ms [n=10]; Zolpidem:  $36.9 \pm 5.9$  ms [n=10];  $P < 0.01$ ) als auch in *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten (Kontrolle:  $24.1 \pm 2.5$  ms [n=11]; Zolpidem:  $51.7 \pm 5.7$  ms [n=11];  $P < 0.001$ ) signifikant an (Abb. 3.12B). Dieser Anstieg war in allen 21 untersuchten Zellen zu verzeichnen. Damit ist gesichert, dass die hier untersuchten GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren Zolpidem-sensibel sind.

Im Gegensatz zu  $\tau$  unterscheidet sich der Einfluss von Zolpidem auf die sIPSC Amplitude deutlich zwischen den Genotypen (Abb. 3.12A). Während in den *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten ein signifikanter Zuwachs der Amplituden beobachtet wurde (Kontrolle:  $28.3 \pm 3.2$  pA [n=10]; Zolpidem:  $41.0 \pm 5.4$  pA [n=10];  $P < 0.001$ ) fehlt dieser in *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten (Kontrolle:  $38.1 \pm 4.7$  pA [n=11]; Zolpidem:  $42.4 \pm 5.3$  pA [n=11]; *n.s.*). Der Unterschied der Amplituden in der Kontrolle zwischen den beiden Genotypen entspricht dem in Abschnitt 3.3.1 gezeigten. Interessant ist, dass die Zolpidemapplikation in *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten die IPSC-Amplitude auf das Niveau von *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten anhebt.

Hinsichtlich der 20-80% Anstiegszeit der sIPSC ergab sich keine signifikante Veränderung durch Anwendung von Zolpidem in *bdnf*<sup>+/+</sup> (Kontrolle:  $0.73 \pm 0.08$  ms [n=10]; Zolpidem:  $0.80 \pm 0.13$  ms [n=10]; *n.s.*) oder *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten (Kontrolle:  $0.78 \pm 0.12$  ms [n=11]; Zolpidem:  $0.80 \pm 0.09$  ms [n=11]; *n.s.*).

Nach 15-minütigem Auswaschen von Zolpidem waren alle beschriebenen Effekte vollständig reversibel.

Ähnlich den in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen Effekten lassen auch die Ergebnisse der Zolpidem-Applikation vermuten, dass es in Abwesenheit von BDNF zu einer stärkeren Besetzung postsynaptischer Rezeptoren durch GABA kommt. Da es sich hierbei um spontane IPSC – also sowohl AP-abhängige als auch Miniaturströme – handelt und die Kinetik in Kontrolle zwischen *bdnf*<sup>+/+</sup> und <sup>-/-</sup> Schnitten vergleichbar ist, liegt der Gedanke nahe, dass in *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten GABAerge Synapsen nahe der Sättigung operieren, was unter Zolpidem-Applikation bzw. gesteigerter synaptischer Transmission und damit höherer Amplituden besonders deutlich wird.

### 3.4.2 Die Expression von GABA-Rezeptor-Untereinheiten wird durch BDNF gesteuert

BDNF erhöht die Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_6$  und  $\gamma_2$  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<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha_6$  und  $\beta_3$  führt (Thompson et al., 1998).

BDNF könnte die Transkription von GABA-Rezeptor-Untereinheiten mRNA im CS beein-

flussen und somit über die Menge der verfügbaren mRNA die Rezeptorzahl steuern. *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).

Die in Abschnitt 3.4.1 gezeigte Sensibilität GABAerger sIPSC gegenüber Zolpidem bestätigt, dass im CS keine  $\alpha_4$ - und  $\alpha_6$ -Untereinheiten am Aufbau des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors beteiligt sind, da Rezeptoren, die entweder die  $\alpha_4$ - oder  $\alpha_6$ -Untereinheit enthalten, nicht Zolpidem-sensibel sind (Khan et al., 1996; Crestani et al., 2000). Weitere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass die Untereinheit  $\alpha_5$  die Affinität von Zolpidem zum Rezeptor aufhebt bzw. extrem vermindert (Barnard et al., 1998).

Die Expression der Untereinheiten  $\alpha_{1-3}$  ist entwicklungsbedingten Modifikationen unterworfen, welche von Veränderungen der PSC-Kinetik begleitet werden (Okada et al., 2000; Jüttner et al., 2001b; Vicini et al., 2001). Die Untereinheit  $\gamma_2$  wird dagegen eher für die Verankerung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors in der Membran verantwortlich gemacht (Cherubini und Conti, 2001).

Durch semiquantitative RT-PCR von *bdnf*<sup>+/+</sup> und <sup>-/-</sup> Schnitten in Verbindung mit TrkB-Blockade in einem Teil der *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitte durch Inkubation mit 200 mM K252a wurde die Modulation der mRNA-Expression untersucht.

Wie in Abbildung 3.13 dargestellt, kommt es in Abwesenheit von BDNF zu einer Verminderung der Expression von  $\alpha_1$ -mRNA (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $1.22 \pm 0.18$  [n=10]; *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $0.37 \pm 0.09$  [n=11];  $P < 0.001$ ). Präinkubation von *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten in K252a über 6 Stunden führt zu einer nicht-signifikanten Reduktion der relativen Expression (*bdnf*<sup>+/+</sup> K252a:  $0.80 \pm 0.08$  [n=7], *n.s.*). Betrachtet man die Expression der  $\alpha_2$  Untereinheit, so findet sich ein ähnliches Ergebnis (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $0.33 \pm 0.07$  [n=10]; *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $0.14 \pm 0.06$  [n=11];  $P < 0.05$ ). Wieder verschob die sechsstündige Blockade von TrkB in *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten die Expression in Richtung *bdnf*<sup>-/-</sup> (*bdnf*<sup>+/+</sup> K252a:  $0.18 \pm 0.06$  [n=9], *n.s.*). Die  $\alpha_3$ -Untereinheit zeigt mit reduzierter Expression bei Fehlen von BDNF (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $0.31 \pm 0.06$  [n=10]; *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $0.12 \pm 0.04$  [n=10];  $P < 0.05$ ) und nicht-signifikanter Reduktion der relativen Expression bei TrkB-Blockade (*bdnf*<sup>+/+</sup> K252a:  $0.14 \pm 0.03$  [n=4], *n.s.*) ein ähnliches Verhalten.

Eine Modulation der GABA-Rezeptor-Untereinheit  $\gamma_2$  auf mRNA-Ebene durch BDNF war – im Gegensatz zu den von Bulleit und Hsieh (2000) im Kleinhirn beschriebenen Expressionsänderungen – im CS nicht zu beobachten (*bdnf*<sup>+/+</sup>:  $1.02 \pm 0.22$  [n=11]; *bdnf*<sup>-/-</sup>:  $0.97 \pm 0.20$  [n=11]; *n.s.*). Die beiden Splice-Varianten  $\gamma_{2L}$  und  $\gamma_{2S}$  konnten in *bdnf*<sup>+/+</sup> und *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten nachgewiesen werden; auf eine Quantifizierung wurde verzichtet.

Die Aufregulation der GABAergen Hemmung in Abwesenheit von BDNF kann somit nicht durch eine vermehrte Transkription der GABA-Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha_{1-3}$  oder  $\gamma_2$  erklärt werden. Die im Abschnitt 3.4.1 beobachtete Sättigung postsynaptischer Rezeptoren könnte jedoch sehr wohl ihre Ursache in der verminderten Expression von GABA-Rezeptor-Untereinheiten

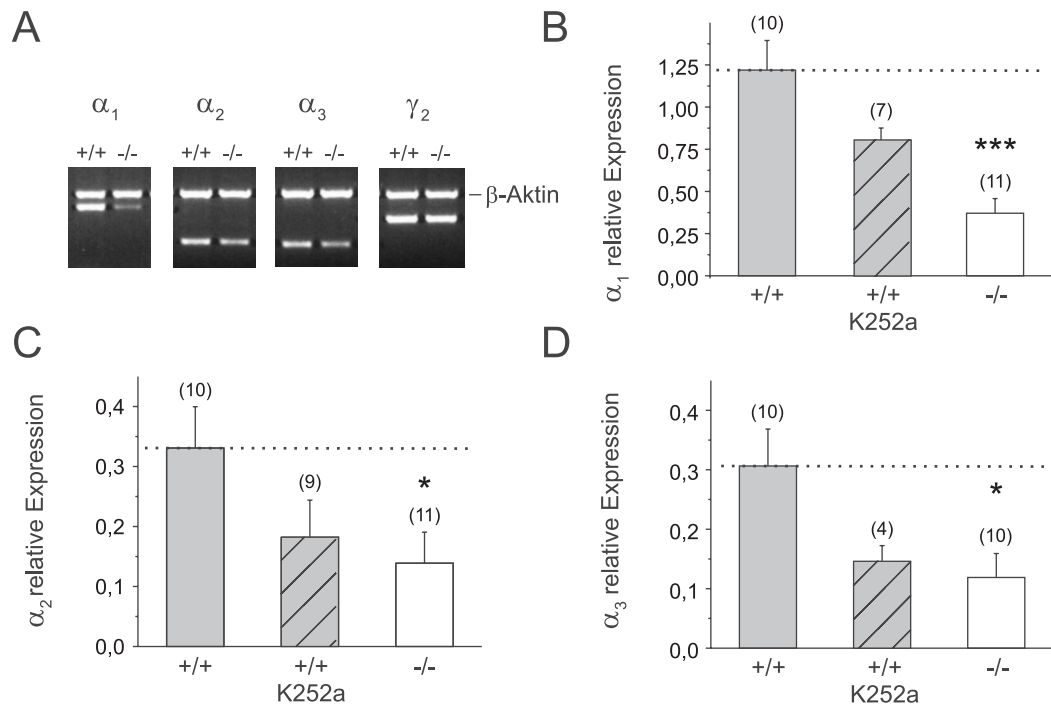


Abbildung 3.13: Einfluss von BDNF auf die Expression von GABA-Rezeptor-Untereinheiten. A: Beispiel des Nachweises der GABA<sub>A</sub>-Untereinheiten  $\alpha_{1-3}$  und  $\gamma_2$  in *bdnf*<sup>+/+</sup> und <sup>-/-</sup> Schnitten. Die Expression wurde relativ zur Expression von  $\beta$ -Aktin berechnet und angegeben. B-D: In Abwesenheit von BDNF kommt es zu einer verminderten Expression der Untereinheiten  $\alpha_{1-3}$ . Vorangehende Inkubation der *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitte mit K252a imitiert diesen Effekt.

haben. Dies wirft die Frage auf, wie die postsynaptische Zelle mit weniger GABA-Rezeptor-mRNA größere Ströme generiert.

### 3.4.3 Exogenes BDNF wirkt PKC-abhängig

Sowohl die Zeitskala, auf der BDNF die GABAerge Hemmung moduliert, als auch die Umkehrbarkeit der Gen-Inaktivierung durch akute Applikation von BDNF blieben bisher unberücksichtigt. Daher wurde BDNF (100 ng/ml) mittels lokaler Superfusion auf Schnitte von *bdnf*<sup>-/-</sup> Mäusen nach folgendem Protokoll appliziert: Aufzeichnung von sIPSC für 5 Minuten, Gabe von BDNF für 10 Minuten in die unmittelbare Nähe des studierten Neurons und Aufzeichnung der sIPSC während der letzten 2 Minuten der Superfusion, Auswaschen von BDNF für weitere 10 Minuten und erneute Erfassung von sIPSC in den letzten 2 Minuten.

Exogenes BDNF hatte weder signifikanten Einfluss auf die mittlere Kinetik (Kontrolle:  $27.7 \pm 4.4$  ms [n=8]; BDNF:  $24.3 \pm 2.9$  ms [n=8]) noch auf die Frequenz (Kontrolle:  $1.6 \pm 0.6$  Hz [n=8]; BDNF:  $1.6 \pm 0.6$  Hz [n=8]) der aufgezeichneten sIPSC. Wie in Abbildung 3.14A zu



sehen, trat jedoch eine signifikante Reduktion der Amplituden auf (Kontrolle:  $37.8 \pm 2.8$  pA [ $n=8$ ]; BDNF:  $29.6 \pm 2.4$  pA [ $n=8$ ];  $P < 0.01$ ). Die Umkehr des Effekts der Gen-Inaktivierung auf die GABAerge synaptische Transmission ist also innerhalb von 10 Minuten möglich, sodass davon auszugehen ist, dass die bisher beobachteten Phänomene nicht die Folgen der chronischen Abwesenheit in der Entwicklung sondern das akute Fehlen von BDNF widerspiegeln.

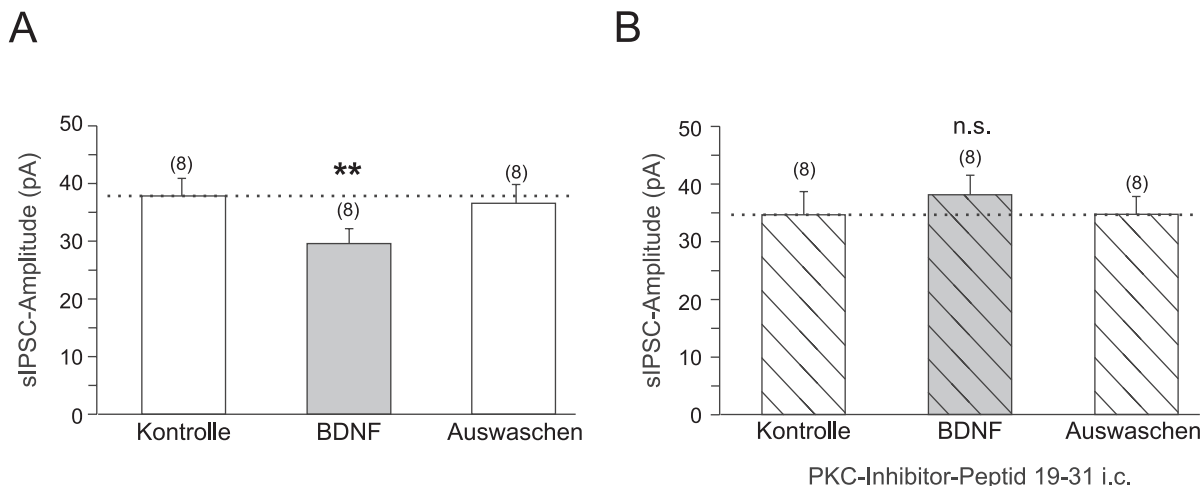


Abbildung 3.14: PKC-abhängige Suppression GABAerger sIPSC durch exogenes BDNF. A: Lokale Superfusion von BDNF (100 ng/ml) reduziert die Amplitude GABAerger sIPSC innerhalb von 10 Minuten signifikant. B: Durch intrazelluläre Applikation eines PKC-Inhibitors kann die Wirkung von exogenem BDNF auf die GABAerge Hemmung aufgehoben werden.

Die Aktivierung von TrkB durch BDNF kann zur Aktivierung der PLC $\gamma$  führen (Gunn-Moore und Tavaré, 1998), welche ihrerseits zum Anstieg der intrazellulären Spiegel von DAG und Ca $^{2+}$  führt – die Voraussetzung zur Aktivierung der PKC. Weiterhin wurde gezeigt, dass sowohl Inaktivierung der PLC $\gamma$  als auch die Verwendung des hochaffinen Ca $^{2+}$ -Puffers BAPTA in der Intrazellulärlösung die Wirkung von exogenem BDNF auf die GABAerge synaptische Inhibition unterbindet (Tanaka et al., 1997). Zur Überprüfung der These, dass die hier beobachtete Suppression der GABAergen IPSC durch BDNF durch PKC vermittelt wird, ist das oben beschriebene Experiment dahin gehend modifiziert worden, dass die Intrazellulärlösung zusätzlich PKC inhibitor peptide 19-31 (600 nM) enthielt.

Wie Abbildung 3.14B zu entnehmen ist, verhinderte die PKC-Blockade vollständig die Suppression der Amplitude durch BDNF (Kontrolle:  $34.7 \pm 3.7$  pA [ $n=8$ ]; BDNF:  $38.1 \pm 3.2$  pA [ $n=8$ ]; *n.s.*). Dieses Ergebnis ist in zweierlei Hinsicht von Bedeutung: Es bestätigt die bisherige Vermutung, dass die Aktivierung der PKC einen bedeutenden Schritt im Signalweg der BDNF-vermittelten Hemmung der GABAergen Inhibition darstellt. Zum anderen zeigt es, dass sich

der Angriffsort des applizierten BDNFs am postsynaptischen Neuron befindet, da aufgrund der Peptideigenschaften des PKC-Inhibitors davon auszugehen ist, dass der PKC-Block auf die postsynaptische Zelle beschränkt ist.

## 3.5 Der Einfluss von BDNF auf die Reifung GABAerger Synapsen

Ein wesentlicher Schritt in der postnatalen Entwicklung des CS stellt die Augenöffnung zum Zeitpunkt P13/14 dar. Mit ihr setzt die Phase des Mustersehens ein. Gleichzeitig stellt dieses Ereignis einen wichtigen Schritt in der Entwicklung der GABAergen synaptischen Transmission dar (Clark et al., 2001; Schmidt et al., 2002). Hierbei kommt es zu einer Verringerung der Zeitkonstanten  $\tau$  GABAerger IPSC, welche von einer Aufregulation von  $\alpha_1$  mRNA begleitet ist (Schmidt et al., 2002). Es sollte im folgenden geklärt werden, ob BDNF diese kritische Periode in der postnatalen Entwicklung des visuellen CS beeinflusst.

### 3.5.1 BDNF moduliert die Entwicklung der GABAergen synaptischen Transmission

Die hier verwendeten Mäuse öffnen die Augen am 13. postnatalen Tag. Zur Charakterisierung der Entwicklung der GABAergen Transmission wurden GABAerge eIPSC am 11. und 12. (im folgenden als P12 zusammengefasst) herangezogen. Weiterhin ist die relative Expression der GABA-Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha_{1-3}$  und  $\gamma_2$  bestimmt worden. Die erhobenen Daten wurden mit den bereits bekannten Werten nach der Augenöffnung zum Zeitpunkt P15 aus den Abschnitten 3.3.1 und 3.4.2 verglichen.

Wie Tabelle 3.2 zu entnehmen ist, lässt sich erstaunlicherweise zum Zeitpunkt P12 kein Unterschied zwischen *bdnf*<sup>+/+</sup> und *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten finden. Dies ist umso bemerkenswerter, da sich nur 3 Tage später eine – in den vorangegangenen Abschnitten beschriebene – deutliche Modulation der GABAergen synaptischen Transmission durch BDNF demonstrieren ließ.

In Schnitten von *bdnf*<sup>+/+</sup> Mäusen besitzen eIPSC zum Zeitpunkt P12 eine deutlich langsamere Kinetik als bei P15. Dies lässt sich auch für *bdnf*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen. Während jedoch in Schnitten von *bdnf*<sup>+/+</sup> Mäusen die Amplitude der eIPSC über die Augenöffnung hinweg konstant bleibt, steigt diese in *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten signifikant an. Die relative Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha_{2/3}$  und  $\gamma_2$  zeigt weder in *bdnf*<sup>+/+</sup> noch *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten eine signifikante Modulation im Vergleich P12 versus P15. Die Ausnahme stellt die  $\alpha_1$ -Untereinheit dar: in *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten kommt es im Gegensatz zu *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten parallel zur Augenöffnung zu einer signifikanten Aufregulation der Expression dieser GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit. Eine zusammenfassende, graphische Darstellung der wichtigsten Parameter ist in Abb. 3.15 zu finden.

	<i>bdnf</i> +/+	<i>bdnf</i> -/-	P12 +/+ vs. -/-	<i>bdnf</i> +/+ P12 vs. P15	<i>bdnf</i> -/ P12 vs. P15
eIPSC $y$ (pA)	93.7 ± 19.6 (15)	104.2 ± 20.2 (15)	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$P < 0.01$
eIPSC $\tau$ (ms)	27.9 ± 3.9 (15)	28.1 ± 2.9 (15)	<i>n.s.</i>	$P < 0.001$	$P < 0.001$
GABA <sub>A</sub> $\alpha_1$	0.37 ± 0.10 (10)	0.43 ± 0.13 (10)	<i>n.s.</i>	$P < 0.001$	<i>n.s.</i>
GABA <sub>A</sub> $\alpha_2$	0.39 ± 0.09 (9)	0.39 ± 0.12 (9)	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
GABA <sub>A</sub> $\alpha_3$	0.30 ± 0.05 (9)	0.34 ± 0.11 (9)	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
GABA <sub>A</sub> $\gamma_2$	1.07 ± 0.18 (10)	1.02 ± 0.22 (10)	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabelle 3.2: Vergleich der Amplituden ( $y$ ) und Zeitkonstanten ( $\tau$ ) GABAerger eIPSC sowie der mRNA-Expression von GABA-Untereinheiten bei P12. Es wurde überprüft, ob sich bei P12 zwischen *bdnf*+/+ und -/- Schnitten signifikante Unterschiede finden lassen. Weiterhin erfolgte ein Vergleich aller angegebenen Werte zwischen P12 und P15 jeweils für *bdnf*+/+ sowie *bdnf*-/- Schnitte.

Diese Ergebnisse sind in zweierlei Hinsicht interessant. Zum einen konnte u.a. im Thalamus (Okada et al., 2000) als auch im CS (Jüttner et al., 2001b) überzeugend demonstriert werden, dass eine Erhöhung der  $\alpha_1$ -Expression zu einer Verkürzung GABAerger IPSC führt. Die über die Augenöffnung in *bdnf*-/- Schnitten beobachtete Verkürzung GABAerger eIPSC ohne Erhöhung der  $\alpha_1$ -Expression stellt dazu einen scheinbaren Widerspruch dar. Zu vermuten ist, dass allein die Expression der  $\alpha_1$ -Einheit auf mRNA-Ebene nicht für die Veränderung der Kinetik verantwortlich ist, sondern dass für den Grad des  $\alpha_1$ -Gehalts von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren nachfolgende Schritte wie z.B. die Translation, der Rezeptorzusammenbau oder der Rezeptortransport zur Synapse und Membran entscheidend sind.

Das Ergebnis, dass es bei keiner der untersuchten GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten zu einem Anstieg der Expression in *bdnf*-/- Schnitten kam, parallel jedoch die Amplitude GABAerger eIPSC signifikant anstieg, unterstützt die im Abschnitt 3.4.2 geäußerte Vermutung, dass die Suppression der GABAergen Transmission nicht allein durch eine Regulation der Expression von GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten zustande kommt.

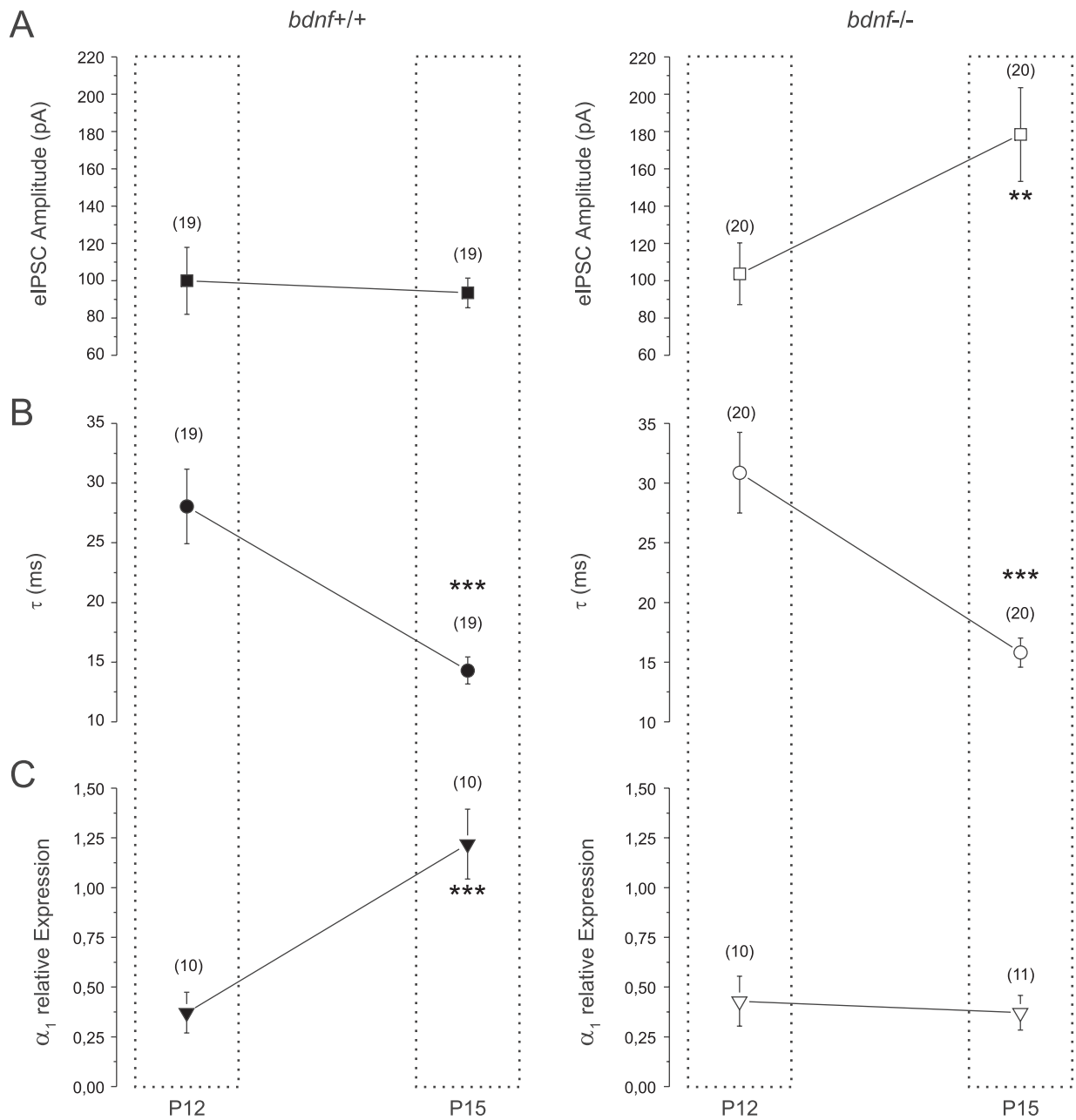


Abbildung 3.15: Einfluss der Augenöffnung auf die GABAerge synaptische Transmission in Abhängigkeit von BDNF. A: Die Amplitude GABAerger eIPSC bleibt in *bdnf+/+* Schnitten über die Augenöffnung unverändert, während es in *bdnf-/-* Schnitten zu einem signifikanten Anstieg kommt. B: Sowohl in *bdnf+/+* als auch in *bdnf-/-* Schnitten wird die Kinetik der eIPSC signifikant beschleunigt. C: In *bdnf+/+* Schnitten steigt die relative mRNA-Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit signifikant an, während sie in *bdnf-/-* Schnitten konstant bleibt.

### 3.5.2 BDNF- und TrkB-mRNA-Expression ändern sich durch die Augenöffnung nicht

Die Beobachtung, dass zum Zeitpunkt P12 kein Unterschied zwischen *bdnf*<sup>+/+</sup> und *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten zu finden ist, wirft die Frage auf, ob BDNF zu diesem Zeitpunkt im CS anzutreffen ist und ob TrkB-Rezeptoren vorhanden sind. Hinsichtlich des TrkB-Rezeptors sind verschiedene Splice-Varianten zu unterscheiden. Da TrkB.T1 aufgrund der fehlenden intrazellulären Domäne die Wirkung von endogenem BDNF abschwächen bzw. aufheben kann (Biffo et al., 1995; Haapasalo et al., 2001), kommt eine Verschiebung des Verhältnisses der Expression von TrkB.FL und TrkB.T1 als Erklärung in Betracht.

Daher wurde sowohl zum Zeitpunkt P12 als auch P15 durch semiquantitative RT-PCR die relative Expression von BDNF-, TrkB.FL- und TrkB.T1-mRNA in *bdnf*<sup>+/+</sup> und *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten bestimmt.

	P12		P15	
	<i>bdnf</i> <sup>+/+</sup>	<i>bdnf</i> <sup>-/-</sup>	<i>bdnf</i> <sup>+/+</sup>	<i>bdnf</i> <sup>-/-</sup>
BDNF	1.23 ± 0.25 (5)	0.00 ± 0.00 (5)	1.33 ± 0.10 (5)	0.00 ± 0.00 (5)
TrkB.FL	0.97 ± 0.09 (5)	0.94 ± 0.17 (5)	0.90 ± 0.06 (5)	0.97 ± 0.07 (5)
TrkB.T1	1.33 ± 0.23 (5)	1.65 ± 0.35 (5)	1.14 ± 0.08 (5)	1.23 ± 0.15 (5)

Tabelle 3.3: Die durch die semiquantitative RT-PCR bestimmte Expression von BDNF, TrkB.FL und TrkB.T1 wird durch das Öffnen der Augen nicht beeinflusst. In *bdnf*<sup>+/+</sup> und *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten wird sowohl bei P12 als auch P15 TrkB.T1 und TrkB.FL exprimiert. Deren Expression wird durch die An- oder Abwesenheit von BDNF nicht verändert.

Die relative Expression von BDNF-, TrkB.FL- und TrkB.T1-mRNA ist Tabelle 3.3 zu entnehmen. Es zeigt sich, dass sowohl TrkB.FL- als auch TrkB.T1-mRNA im CS exprimiert werden. Hierbei unterscheidet sich die Expression zwischen den Genotypen weder bei P12 noch P15 signifikant. Lediglich die Expression von TrkB.T1 fällt leicht ab. Die im Zusammenhang mit der Augenöffnung erwarteten Expressionsänderungen fanden sich weder in *bdnf*<sup>+/+</sup> noch in *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten.

Die relative Expression von BDNF-mRNA zeigt in *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten nach Augenöffnung keine Änderung im Vergleich zu P12. In *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten ließ sich BDNF-mRNA erwartungsgemäß nicht nachweisen.

Daraus geht hervor, dass eine durch das Einsetzen des Mustersehens nach der Augenöffnung ausgelöste Modulation der BDNF-mRNA-Expression nicht das Fehlen einer BDNF-abhängigen Modulation der GABAergen Transmission zum Zeitpunkt P12 erklären kann. Damit erhebt sich die Frage, ob sich die Mengen von BDNF-mRNA und -Protein proportional zueinander verhalten. Zum anderen könnte BDNF aus anderen Hirnarealen anterograd und aktivitätsabhängig

in den CS transportiert werden und so erst nach der Augenöffnung zu messbaren Unterschieden führen.

Aus den Experimenten mit dem TrkB-Blocker K252a war bereits zu schlussfolgern, dass funktionelle TrkB-Rezeptoren im CS vorhanden sind. Dies wird nun durch den Nachweis von TrkB.FL-mRNA untermauert. Es zeigt sich aber auch, dass die BDNF-TrkB-Interaktion auch im CS durch die Anwesenheit von TrkB.T1 moduliert werden kann. Jedoch kommt eine Modulation der TrkB.T1- bzw. TrkB.FL-Expression auf der mRNA-Ebene nicht in Betracht, wenn es darum geht, die Abwesenheit eines BDNF-Effekte bei P12 zu erklären. Es stellt sich also auch hier die Frage, inwiefern das Vorhandensein von mRNA mit der Anwesenheit von funktionellen Rezeptoren korreliert.

## 4. Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerung

Die hier beobachteten Wirkungen von BDNF auf die GABAerge synaptische Transmission in den visuellen Schichten des *Colliculus superior* nach der Augenöffnung können folgendermaßen zusammengefasst werden:

- BDNF hat keinen Einfluss auf die Dichte der Neuronen, deren Größe, Membranwiderstand oder Ganzzellkapazität.
- Die Rate der spontan generierten Aktionspotentiale wird durch BDNF erhöht. Dies ist nicht auf eine Modulation des intrinsischen Entladungsverhaltens zurückzuführen. Vielmehr unterdrückt BDNF die GABAerge Hemmung. Daher kommt es in Abwesenheit von BDNF oder bei Blockade des TrkB-Rezeptors durch Verstärkung der GABAergen Hemmung zur Reduktion der Spontanaktivität.
- Es ließ sich kein Hinweis auf eine präsynaptische Wirkung von BDNF finden, da weder die Anzahl inhibitorischer Boutons, noch die mIPSC-Frequenz, noch das Paarpulsverhalten durch BDNF beeinflusst werden. Bei gleichzeitiger, TrkB-abhängiger Reduktion der GABAergen IPSC durch BDNF muss ein postsynaptischer Effekt angenommen werden.
- Die Applikation von BDNF hob den Effekt seiner chronischen Abwesenheit in *bdnf*<sup>-/-</sup>-Tieren innerhalb von 10 Minuten auf. Durch postsynaptische Blockade der PKC konnte dies verhindert werden.
- In Abwesenheit von BDNF steigt die Dauer der IPSC mit ihrer Amplitude und Applikation von Zolpidem verlängert IPSC ohne eine Amplitudensteigerung. Dies sind deutliche Hinweise auf eine postsynaptische Rezeptorsättigung.
- Die mRNA-Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha_{1-3}$  ist in Abwesenheit von BDNF signifikant erniedrigt – nicht jedoch die der  $\gamma_2$ -Untereinheit.

Vor der Augenöffnung hat BDNF keinen Einfluss auf die untersuchten Parameter der GABAergen Inhibition:

- Unmittelbar vor der Augenöffnung besteht zwischen *bdnf*<sup>+/+</sup> und <sup>-/-</sup> Schnitten kein Unterschied hinsichtlich der evozierten GABAergen IPSC oder der Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha_{1-3}$  und  $\gamma_2$ .
- Sowohl BDNF- als auch TrkB.FL- und TrkB.T1-mRNA konnte vor und nach der Augenöffnung detektiert werden. Eine altersabhängige Expression konnte nicht nachgewiesen werden. Weiterhin hatte die Abwesenheit von BDNF keinen Einfluss auf die Expression von TrkB.FL und TrkB.T1.

Diese Ergebnisse sind mit folgendem Wirkungsmechanismus von BDNF kompatibel: BDNF aktiviert innerhalb weniger Minuten über TrkB-Rezeptoren die PKC, was die Aktivität der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren reduziert. Innerhalb von Stunden kommt es zu einer erhöhten mRNA-Expression von  $\alpha$ -Untereinheiten und zum Einbau einer größeren Zahl von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in die Postsynapse.

## 4.2 Einfluss von BDNF auf die spontane Entladungsrate

Durch Ableitung in der *cell attached*-Konfiguration wurde gezeigt, dass bereits kurz nach der Geburt (P2/3) in der hier verwendeten Schnittpräparation des visuellen CS spontane AP generiert werden. Die Rate, mit der colliculäre Neurone spontan AP erzeugen, steigt mit zunehmenden Alter an, um bei P20 ein Maximum zu erreichen. Sie hängt unter anderem von den Eigenschaften der exzitatorischen und inhibitorischen Eingänge ab. Während der postnatalen Entwicklung steigt sowohl die Frequenz der spontanen EPSC (Shi et al., 1997) als auch die der IPSC (Jüttner et al., 2001b) an. Zusätzlich kann auch ein verändertes intrinsisches Entladungsverhalten Einfluss auf die Entladungsrate haben (Lo et al., 1998; Isa und Saito, 2001). Es war jedoch nicht Ziel dieser Arbeit, die postnatale Entwicklung des Entladungsverhaltens zu charakterisieren. Dass die Entladungsrate vom Vorhandensein exzitatorischer und inhibitorischer Eingänge abhängt, wurde durch pharmakologische Blockade von NMDA-, AMPA- und ACh-Rezeptoren bzw. GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren gezeigt. Interessant ist, dass die alleinige Applikation von NMDA- und AMPA-Rezeptor-Blockern die Entladungsrate nur auf 20% des Kontrollwertes senkte. Zusätzliche Inhibierung von ACh-Rezeptoren durch Tubocurarin senkte die Entladungsrate auf nahezu Null. Im CS selbst existieren viele Neurone, die ACh produzieren und als Neurotransmitter verwenden. Außerdem erhält der CS cholinerge Afferenzen aus dem kontralateralen *Nucleus parabrachialis*. Cholinerge PSC wurden jedoch in den durchgeführten Ganzzellaufnahmen unter AMPA-, NMDA-, Glyzin- und GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade nicht beobachtet. Es ist denkbar, dass cholinerge Eingänge vorwiegend prä- oder extrasynaptische Rezeptoren aktivieren und die Entladungsrate auf diesem Wege beeinflussen.



Es wurde in einer Reihe von Präparaten gezeigt (z.B. [Rothe et al. \(1999\)](#) in retinalen Ganglienzellen oder [Bolton et al. \(2000\)](#) in hippocampalen Kulturen), dass BDNF die neuronale Entladungsrate erhöhen kann. Dies wird jetzt für den visuellen CS bestätigt. Die Erhöhung der spontanen Entladungsrate beruht weder auf einer Veränderung des intrinsischen Entladungsverhaltens noch der passiven neuronalen Parameter – beides in Übereinstimmung mit [Bolton et al. \(2000\)](#). Es gibt jedoch eine Vielzahl alternativer Erklärungen: BDNF könnte exzitatorische Eingänge stärken, inhibitorische abschwächen, die Anzahl der vorhandenen Neurone verändern oder das Verhältnis zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen verschieben.

Obwohl BDNF die Anzahl MAP2-positiver Zellen beeinflussen kann ([Pencea et al., 2001](#)) und damit prinzipiell auch im ZNS die Möglichkeit besteht, dass BDNF Einfluss auf das Überleben von Neuronen hat, ergab sich im CS kein Unterschied hinsichtlich der Neurondichte oder des Somadurchmessers in der MAP2-Färbung. *In vitro*-Untersuchungen ([Vicario-Abejón et al., 1998](#); [Bolton et al., 2000](#)) bestätigen dies. Bei konstanter Anzahl von Neuronen kann BDNF den Anteil GABAerger Neurone im visuellen Kortex der Ratte *in vitro* erhöhen ([Rutherford et al., 1997](#)). Dies wurde hier nicht untersucht, sodass unter BDNF-Einfluss möglicherweise mehr GABAerge Neurone im CS vorhanden sind, welche – wie durch VIAAT-Färbung gezeigt – die gleiche Anzahl inhibitorischer Kontakte ausbilden. Ob dies einen Einfluss auf die Entladungsrate colliculärer Neurone hat und welcher Art dieser Einfluss sein könnte, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. Weiterhin kommt eine Verstärkung der glutamatergen synaptischen Transmission durch BDNF in Frage ([Lessmann und Heumann, 1998](#); [Bolton et al., 2000](#)). Dies zu klären war jedoch nicht Anspruch dieser Arbeit.

Die intrazelluläre  $\text{Cl}^-$ -Konzentration wird unter anderem durch die Aktivität des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters (KCC2) beeinflusst. Dieser steuert somit, ob und in welchem Maße GABA-aktivierte  $\text{Cl}^-$ -Ströme hyperpolarisierend oder depolarisierend auf das Neuron wirken. Kürzlich wurde bekannt, dass BDNF die Expression von KCC2 verändern kann ([Soriano et al., 2002](#); [Rivera et al., 2002](#)). Da im CS mRNA von KCC2 exprimiert wird ([Kanaka et al., 2001](#)), muss die Liste der möglichen Wirkungen von BDNF auf die Entladungsrate um diesen Punkt erweitert werden.

Die Blockade von  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren durch Bicucullin erhöhte die Entladungsrate. Der Quotient aus Entladungsrate unter Bicucullin und in der Kontrolle wurde herangezogen, um den Einfluss der GABAergen Hemmung auf die neuronale Aktivität zu quantifizieren. Abwesenheit von BDNF erhöht diesen Quotienten. Die Schlussfolgerung, dass BDNF die Entladungsrate über die Steuerung der GABAergen Transmission beeinflusst, wurde durch Messung von GABAergen IPSC bestätigt.

### 4.3 Postsynaptische Mechanismen der BDNF-Wirkung

Eine postsynaptische Depression der GABAergen Synapse durch BDNF wurde sowohl in einer Schnittpräparation des Hippokampus (Tanaka et al., 1997) als auch in hippokampalen Kulturen (Brünig et al., 2001) beschrieben.

Hier konnte ausgehend von der Charakterisierung der spontanen Entladungsrates colliculärer Neurone nach der Augenöffnung gezeigt werden, dass BDNF zu diesem Zeitpunkt durch Aktivierung von TrkB-Rezeptoren eine postsynaptische PKC-abhängige Abregulation von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren bewirkt. Die Folge dieser Disinhibition ist eine Steigerung der Entladungsrate (Abb. 4.1).

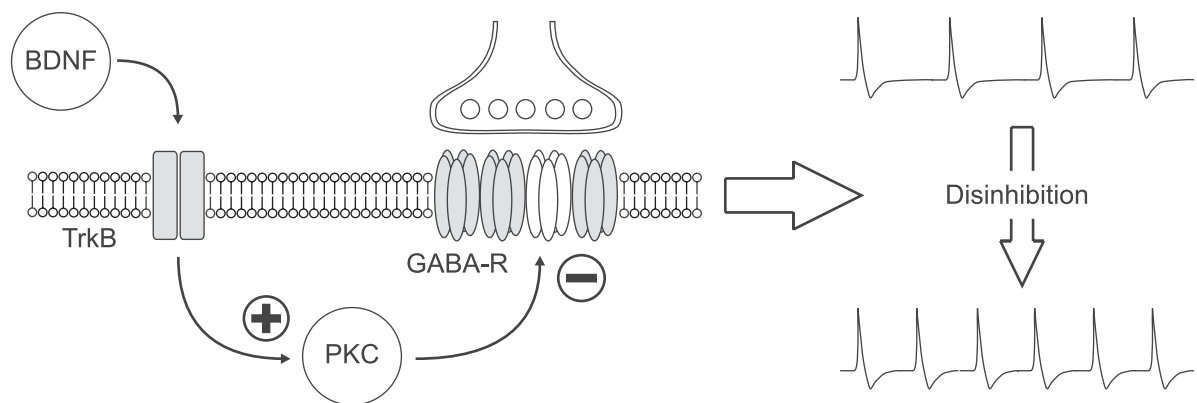


Abbildung 4.1: Ein möglicher Mechanismus der postsynaptischen Wirkung von BDNF auf die GABAerge synaptische Transmission im visuellen CS und seine Auswirkung auf die Netzwerkaktivität.

Auf welchem Weg führt nun BDNF und die nachfolgende PKC-Aktivierung unter Beibehaltung der Anzahl inhibitorischer Synapsen sowie der Freisetzungswahrscheinlichkeit zu einer Modulation der GABAergen Inhibition? Hier kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht (Abb. 4.2):

1. verstärkte Phosphorylierung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, was zu einem veränderten Desensitierungsverhalten, einer reduzierten Öffnungswahrscheinlichkeit, Einzelkanalleitfähigkeit oder Affinität zu GABA führt.
2. Verminderung der Anzahl postsynaptischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren durch Veränderung des Einbaus in die Membran, der Internalisierung oder der Diffusion in der Membran.
3. eine modifizierte Zusammensetzung der postsynaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren
4. Reduktion der lokalen Proteinsynthese und dadurch verringerter Einbau postsynaptischer Rezeptoren in die Membran

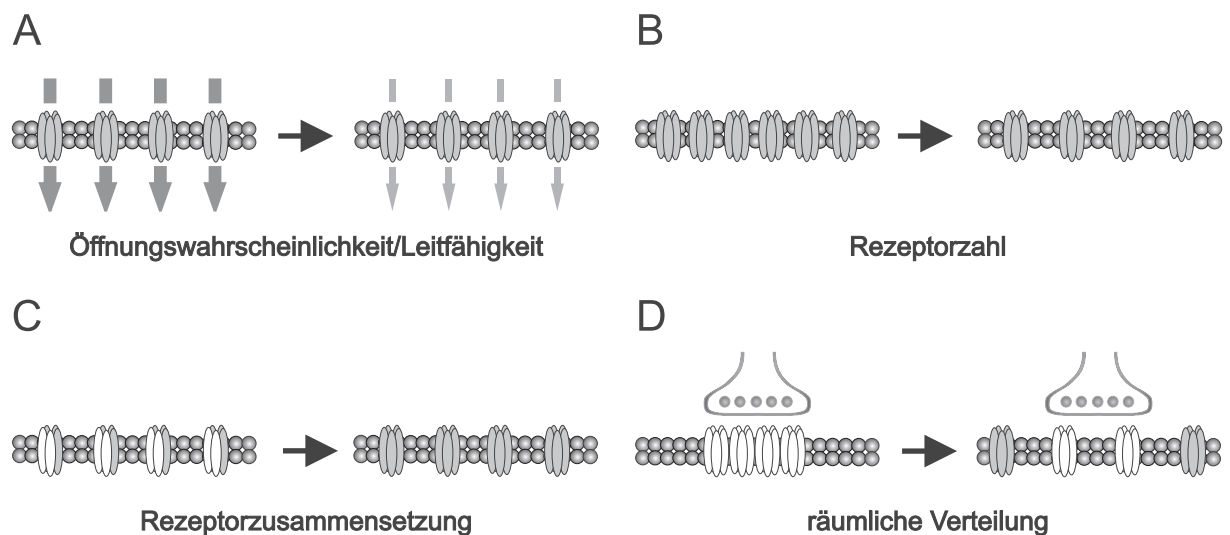


Abbildung 4.2: Möglichkeiten einer postsynaptischen BDNF-Wirkung an der GABAergen Synapse, die zu einer Suppression der GABAergen Transmission führen können. A: Verringerung der Leitfähigkeit, der Öffnungswahrscheinlichkeit, der Affinität oder Veränderung des Desensitisierungsverhaltens des Rezeptors durch direkte Phosphorylierung. B: Verringerung der Rezeptoranzahl. C: Veränderung der Rezeptorzusammensetzung. D: Modulation der Verteilung postsynaptischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren.

Die Analyse der Beziehung zwischen IPSC-Amplitude und -Dauer, die Ergebnisse der Zolpidem-Applikation sowie der RT-PCR von GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten deuten darauf hin, dass weder die Rezeptorexpression noch deren Einbau sondern vielmehr veränderte Rezeptoreigenschaften für die akute postsynaptische BDNF-Wirkung ausschlaggebend sind.

### 4.3.1 Expression von GABA-Rezeptor-Untereinheiten

An Zellkulturen zerebellärer Körnerzellen wurde demonstriert, dass eine 1-2-tägige BDNF-Inkubation die mRNA-Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_6$  und  $\gamma_2$  erhöhte, während die Expression der  $\delta$ -Untereinheit konstant blieb (Bulleit und Hsieh, 2000). In der Mausmutante *stargazer*, deren zerebelläre Körnerzellen keine BDNF-mRNA produzieren, ist die Expression von  $\alpha_6$ - und  $\beta_3$ -Protein reduziert bei konstanter Expression von  $\alpha_1$  und  $\beta_2$  (Thompson et al., 1998). Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass die Expression von  $\alpha_1$ -Protein entweder einer zelltypspezifischen Regulation unterworfen ist oder die Menge vorhandener mRNA nicht mit der des translatierten Proteins korreliert.

mRNA der GABA-Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha_{1-3}$ ,  $\alpha_5$ ,  $\beta_{1-3}$  und  $\gamma_2$  ist durch *in situ*-Hybridisierung im CS nachgewiesen worden (Wisden et al., 1992). Die mRNA-Expression der  $\gamma_2$ -

Untereinheit wird im CS im Gegensatz zum Kleinhirn nicht von BDNF reguliert. Eine fehlende Verankerung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors durch herabgesetzte  $\gamma_2$ -Expression (Cherubini und Conti, 2001) als postsynaptischer Mechanismus erscheint damit unwahrscheinlich.

Die BDNF-abhängige Aufregulation der Untereinheiten-mRNA  $\alpha_{1-3}$  kommt auch nicht als Erklärung der Suppression GABAerger IPSC durch BDNF in Frage. Da jedoch ein GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Kanal-Komplex in einem Großteil der inhibitorischen Synapsen im ZNS aus zwei  $\alpha$ -, zwei  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -,  $\delta$ - oder  $\epsilon$ -Untereinheit besteht, könnte die Expression anderer  $\alpha$ -Untereinheiten die Rezeptoranzahl steuern. Allerdings sind Rezeptoren, welche die  $\alpha_4$ - oder  $\alpha_6$ -Untereinheit enthalten, nicht Zolpidem-sensibel (Khan et al., 1996; Barnard et al., 1998). Auch der Einbau der  $\alpha_5$ -Untereinheit hebt die Affinität des Rezeptors zu Zolpidem auf bzw. vermindert sie hochgradig (Barnard et al., 1998). Damit ist die  $\alpha_5$ -Untereinheit wahrscheinlich nicht an der Bildung der hier untersuchten GABAergen Synapsen respektive der postsynaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren beteiligt, obwohl  $\alpha_5$ -mRNA im CS nachgewiesen wurde (Wisden et al., 1992). Da GABAerge sIPSC in *bdnf*+/+ und -/- Zolpidem-sensibel waren, scheinen die Untereinheiten  $\alpha_4$  und  $\alpha_6$  keine oder nur eine untergeordnete Rolle im CS zu spielen.

Wenn also das Fehlen von BDNF die mRNA-Expression von GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten herabsetzt, stellt sich die Frage, ob sich dies auf die Funktion GABAerger Synapsen auswirkt. Die in Abwesenheit von BDNF reduzierte Expression der  $\alpha$ -Untereinheiten könnte die Zahl der Rezeptoren an der Postsynapse verringern und bei gleicher präsynaptischer Transmitterfreisetzung zur Rezeptorsättigung führen. Einen klaren Hinweis auf Sättigung stellt eine linksschiefe Amplitudenverteilung dar. Diese wurde nicht beobachtet. Aufgrund der großen Anzahl GABAerger Synapsen pro Neuron, zwischen denen in der Messung nicht diskriminiert wird, ist dies jedoch verständlich.

Die Applikation von Zolpidem erhöht an ungesättigten Synapsen die Amplitude, während es an gesättigten zu keinem signifikanten Anstieg kommt (Perrais und Ropert, 1999; Hájos et al., 2000). Im Gegensatz zu *bdnf*+/+ war in *bdnf*-/- Schnitten kein Anstieg der Amplitude zu verzeichnen, obwohl in beiden Genotypen die Länge der IPSC signifikant zunahm und demzufolge Zolpidem wirksam war. Dies lässt vermuten, dass Abwesenheit von BDNF durch Abnahme der mRNA-Expression von GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten zu einer verminderten Anzahl von Rezeptoren und deren Sättigung führt. Eine Reduktion der Rezeptoranzahl hätte jedoch weitere Konsequenzen: Bei Erhöhung der Menge an freigesetztem Neurotransmitter und paralleler Zunahme der Amplitude würde die Postsynapse zunehmend gesättigt, was zu einer Verlängerung der IPSC und damit einem Zusammenhang zwischen Dauer und Amplitude des IPSC führen würde. Genau dies war in *bdnf*-/- Schnitten zu beobachten.

Mit Sicherheit ist also davon auszugehen, dass BDNF die Expression von GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten im CS beeinflusst und dass die veränderte Expression funktionelle Konsequenzen

zen für die GABAerge Inhibition hat. Allerdings handelt es sich bei der an BDNF-defizienten Mäusen festgestellten Abregulation der  $\alpha$ -Untereinheiten aller Wahrscheinlichkeit nach um einen längerfristigen, möglicherweise kompensatorischen Effekt, der nicht in Zusammenhang mit der akuten postsynaptischen Suppression der GABAergen Synapse durch BDNF zu sehen ist.

### 4.3.2 Phosphorylierung von GABA-Rezeptoren

Neurotrophine können nach Binden an ihre Rezeptoren eine Aktivierung der PKA (Cai et al., 1999) wie auch der PKC (Patapoutian und Reichardt, 2001) auslösen. Beide Proteinkinasen können eine Phosphorylierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors bewirken (Krishek et al., 1994; McDonald und Moss, 1997; Poisbeau et al., 1999). Phosphoryliert werden unter anderen 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).

Zu den möglichen Folgen der Phosphorylierung gehören unter anderem eine Veränderung des Desensitisierungsverhaltens, der Öffnungswahrscheinlichkeit, eine Modulation der Rezeptor-Ligand-Interaktion sowie der Leitfähigkeit. Zusätzlich deuten Untersuchungen darauf hin, dass durch Phosphorylierung die Verweilzeit des Rezeptors in der Synapse gesteuert wird (siehe Abschnitt 4.3.3).

Die Aktivierung der PKC über TrkB ist gut beschrieben (u. a. Patapoutian und Reichardt (2001)) und geschieht indirekt über die Aktivierung der PLC $\gamma$ , da sowohl PLC-Blockade als auch Ca<sup>2+</sup>-Chelatoren die Wirkung von BDNF aufheben können (Tanaka et al., 1997). Dies deckt sich mit dem vorgestellten Ergebnis, dass die postsynaptische Blockade der PKC den von exogenem BDNF angestoßenen Signalweg unterbricht.

Hinsichtlich der Folgen einer PKC-Aktivierung für die GABAerge Transmission ergibt sich ein gemischtes Bild. Je nach Präparat und Methodik wurde eine Verstärkung (Poisbeau et al., 1999) oder Suppression (Krishek et al., 1994; Brandon et al., 2000; Filippova et al., 2000; Ghansah und Weiss, 2001) GABAerger IPSC nach PKC-Aktivierung beobachtet. Dabei entscheidet die Zusammensetzung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors über das Vorhandensein möglicher Phosphorylierungsstellen (Krishek et al., 1994). Somit ist anzunehmen, dass der Effekt einer PKC-abhängigen Phosphorylierung von GABA-Rezeptor-Untereinheiten zum einen von dem Verteilungsmuster der verschiedenen PKC und zum anderen von der jeweiligen Zusammensetzung der GABA-Rezeptor-Population abhängig ist. Für den CS liegen allerdings diesbezüglich noch keine hinreichenden Untersuchungen vor.

Eine BDNF-induzierte, PKC-vermittelte Phosphorylierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors könnte – ohne akute Änderung der Rezeptorzahl – über ein verändertes Desensitisierungsverhalten, eine Verringerung der Einzelkanalleitfähigkeit, der Öffnungswahrscheinlichkeit oder der Affi-

nität zwischen Rezeptor und Ligand zu einer Reduktion GABAerger IPSC führen. Besonders attraktiv sind diese Mechanismen, da sie die Diskrepanz zwischen verminderter Rezeptoranzahl bei gleichzeitig erhöhten Amplituden GABAerger IPSC in *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten auflösen können. Eine Affinitätsminderung sollte die Dosis-Wirkungs-Kurve von GABA nach rechts verschieben und damit die  $EC_{50}$  erhöhen. Dieser Effekt wurde jedoch nach experimenteller Aktivierung der PKC nicht beobachtet (Krishek et al., 1994; Brandon et al., 2000; Ghansah und Weiss, 2001). Im Gegensatz hierzu deuten Ergebnisse von Leidenheimer et al. (1992) darauf hin, dass die Phosphorylierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors eine Modifikation des Desensitisierungsverhalten auslösen kann. Letzteres stellt damit einen plausiblen aber hypothetischen Mechanismus der BDNF-Wirkung am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor dar.

### 4.3.3 Internalisierung und Diffusion von postsynaptischen Rezeptoren

Die Anzahl von GABA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran ist nicht nur von ihrer Synthese und Degradation abhängig, sondern wird ebenso von der Diffusion innerhalb der Membran, dem Rezeptor-Cycling sowie der Cluster-Bildung beeinflusst (Barnes, 2000). Demzufolge könnte BDNF zu einer Verschiebung synaptischer Rezeptoren in extrasynaptische Bereiche oder aber zur Internalisierung von Rezeptoren führen.

Mit Hilfe immunhistochemischer und elektrophysiologischer Methoden wurde gezeigt, dass Inkubation hippokampaler Kulturen mit BDNF zu einer Reduktion der membrangebundenen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha_2$ ,  $\beta_{2,3}$  und  $\gamma_2$  parallel zur Reduktion GABAerger mIPSC führt (Brünig et al., 2001). Auf der anderen Seite löst die Applikation von Insulin die Translokation von in HEK-Zellen exprimierten GABA-Rezeptoren ( $\alpha_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_2$ ) aus dem intrazellulären Raum in die Membran aus (Wan et al., 1997), wodurch die Amplitude von GABAergen mIPSC erhöht wird.

Weiterhin ist bekannt, dass die Stabilität von GABA-Rezeptoren entscheidend durch die Rezeptorzusammensetzung beeinflusst wird (Connolly et al., 1999). Dabei spielt die  $\gamma_2$ -Untereinheit eine wesentliche Rolle bei der Endozytose und dem Recycling von GABA-Rezeptoren. Letzteres kann PKC-abhängig unterbrochen werden (Connolly et al., 1999). Wie hier gezeigt werden konnte, ist mRNA der  $\gamma_2$ -Untereinheit im CS in Schnitten beider Genotypen vorhanden. Dieser Mechanismus kommt also prinzipiell für eine PKC-abhängige Suppression der GABAergen Transmission durch BDNF in Betracht. Die PKC-abhängige Internalisierung von GABA-Rezeptoren in *Xenopus*-Oozyten scheint jedoch nicht auf einer direkten Phosphorylierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors zu basieren (Chapell et al., 1998; Filippova et al., 2000). Die Internalisierung des Rezeptors erfolgt eher auf indirektem Weg durch Phosphorylierung eines bisher unbekanntes Substrats.

Eine akute Reduktion der Anzahl postsynaptischer Rezeptoren durch BDNF hätte aller-

dings zur Folge, dass bei unveränderter GABA-Freisetzung aus der Präsynapse unter BDNF-Einfluss Zeichen der Rezeptorsättigung auftreten könnten. Dies steht im Widerspruch zu der hier gemachten Beobachtung, dass BDNF GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren aus dem gesättigten in den ungesättigten Zustand überführt. Es ist also davon auszugehen, dass eine alleinige Modulation der Rezeptorzahl durch Internalisierung nicht hinreichend die vorgestellten Ergebnisse erklären kann und auch nicht muss, da eine Aktivierung der PKC in kortikalen Neuronen zur Reduktion GABAerger Ströme führt ohne die Anzahl membranständiger Rezeptoren zu verändern (Brandon et al., 2000).

#### 4.3.4 BDNF als Modulator der lokalen Proteinsynthese

Zusätzlich zu der Möglichkeit, dass BDNF die Expression von GABA-Rezeptor-Untereinheiten auf mRNA-Ebene reguliert, muss auch eine Steuerung der lokalen Proteinsynthese durch Neurotrophine in Betracht gezogen werden. In kultivierten Körnerzellen des Cerebellums führt BDNF zu einer parallelen Erhöhung der Protein-Expression von Synaptophysin und *c-fos* innerhalb von 30 Minuten. Hieraus wurde geschlussfolgert, dass erhöhte Mengen von Synaptophysin nicht nur auf einer vermehrten Transkription und anschließender Translation beruhen könnten (Coffey et al., 1997). In einer weiteren *in vitro*-Untersuchung hippocampaler Neurone konnte die Induktion dendritischer Proteinsynthese durch BDNF sichtbar gemacht werden (Aakalu et al., 2001). Darüber hinaus beeinflusst sowohl die Aktivierung von TrkB-Rezeptoren als auch der PKC die lokale Proteinsynthese (Coffey et al., 1997).

Die vorgestellten Ergebnisse ließen sich also auch auf eine Modulation der lokalen Proteinsynthese zurückführen. Ob allerdings Synapsen des CS über die notwendigen Strukturen dafür verfügen, ist zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt. Des Weiteren ist unklar, welche Proteine und speziell Rezeptor-Untereinheiten von der lokalen Proteinsynthese betroffen sind.

### 4.4 Fehlen präsynaptischer Effekte von BDNF

Sowohl an glutamatergen als auch an GABAergen Synapsen ist eine präsynaptische Modulation durch BDNF beschrieben worden (Lessmann und Heumann, 1998; Frerking et al., 1998). In Schnittkulturen des Hippokampus induziert chronische Gabe von BDNF an exzitatorischen Synapsen eine Erhöhung der Fraktion angedockter, präsynaptischer Vesikel verbunden mit einem Anstieg der Expression von Synaptophysin, -brevin und -tagmin (Tartaglia et al., 2001). Eine BDNF-abhängige Modulation der Exozytose ist somit denkbar. An GABAergen Synapsen hippocampaler Kulturen führt die chronische Applikation von BDNF zu einer präsynaptischen Modulation der GABAergen Hemmung (Bolton et al., 2000; Baldelli et al., 2002), die durch eine Veränderung präsynaptischer Ca<sup>2+</sup>-Kanäle und nachfolgendem Ansteigen der Freisetzung-

wahrscheinlichkeit charakterisiert ist (Baldelli et al., 2002). Auch in Schnittpräparationen des Hippokampus wurde ein präsynaptischer Angriffspunkt von BDNF an der GABAergen Synapse ausgemacht (Frerking et al., 1998; Olofsson et al., 2000). Geschlussfolgert wurde dies aus einer Veränderung des Paarpulsverhaltens (Frerking et al., 1998; Olofsson et al., 2000; Baldelli et al., 2002), der mIPSC-Frequenz (Baldelli et al., 2002) oder des CV der Amplitude (Frerking et al., 1998). Keiner der drei Parameter unterlag in den hier durchgeführten Experimenten einer Veränderung durch BDNF.

Die Anzahl der GABAergen Kontakte ist ein weiterer präsynaptischer Parameter, der möglicherweise einer Steuerung durch BDNF unterliegt. BDNF fördert in hippocampalen Kulturen die Formation GABAerger Verbindungen (Vicario-Abejón et al., 1998), was im Einklang mit der Beobachtung steht, dass unter BDNF in hippocampalen Schnittkulturen GAD65-immunopositive Puncta zunehmen (Marty et al., 2000). Im Gegensatz dazu blieb unter BDNF-Einfluss in Kulturen des Hippokampus die Anzahl sowohl der Synapsin- als auch der GAD-Puncta konstant und stieg sogar durch TrkB-Blockade mit Hilfe von TrkB-IgG noch signifikant an (Bolton et al., 2000). In dem hier verwendeten Präparat ergibt die Analyse der Dichte VIAAT-positiver Puncta keinen Unterschied zwischen *bdnf*<sup>+/+</sup> und *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten. Unterstützt wird dies durch den Befund, dass die Dichte von GAD65- und Synapsin-Puncta im CS ebenfalls nicht durch BDNF kontrolliert wird (Akyeli et al., 2002).

Des Weiteren kommen als präsynaptische Mechanismen einer BDNF-Wirkung sowohl eine reduzierte Wiederaufnahme von GABA aus dem synaptischen Spalt als auch eine verminderte Menge an GABA pro präsynaptischen Vesikel in Betracht. Aktivierung von Tyrosinkinasen durch BDNF führt zu einer PKC-unabhängig erhöhten Aktivität des GABA-Transporters GAT1 (Law et al., 2000). In BDNF-defizienten Tieren könnte eine herabgesetzte Aktivität von GAT1 höhere Amplituden und Sättigung durch eine verlangsamte Wiederaufnahme von GABA aus dem synaptischen Spalt erklären – nicht jedoch die PKC-abhängige, postsynaptische Umkehr des Effekts. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass BDNF über Aktivierung der PKA (Cai et al., 1999; Micheau und Riedel, 1999), anschließende Inhibition der präsynaptischen, löslichen GAD (Hsu et al., 1999) die GABA-Konzentration in der präsynaptischen Terminalie reduziert und somit die Vesikelfüllung beeinträchtigt. Allerdings ist dieser Wirkungsmechanismus als rein hypothetisch zu betrachten und begründet auch nicht die Abhängigkeit der akuten BDNF-Effekte von der Aktivierung der postsynaptischen PKC.

Obwohl die bisherigen Ergebnisse einen präsynaptischen Angriffspunkt von BDNF im CS weitestgehend ausschließen, müssen weitere Untersuchungen in dieser Richtung unternommen werden, um zu einer sicheren Aussage zu gelangen.



## 4.5 Herkunft von BDNF und Lokalisation von TrkB

Es wurde hier gezeigt, dass BDNF-mRNA vor und nach der Augenöffnung im gleichen Maße im visuellen CS exprimiert wird. Dies deckt sich mit den Arbeiten von [Gorba et al. \(1999\)](#) und [Vizuite et al. \(2001\)](#). Es steht aber im Gegensatz zu der Beobachtung, dass eine BDNF-abhängige Modulation der GABAergen Hemmung nach, aber nicht vor der Augenöffnung zu beobachten war. Allerdings wurde durch Immunhistochemie und *in situ*-Hybridisierung im visuellen Kortex der Ratte offenbar, dass vor der Augenöffnung viele Neurone BDNF-mRNA, aber nicht -Protein exprimieren, während nach visueller Erfahrung in den meisten Neuronen sowohl BDNF-mRNA als auch -Protein vorhanden sind ([Tropea et al., 2001](#)). Somit ist die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass auch im visuellen CS erst nach der Augenöffnung relevante Mengen von BDNF-Protein vorhanden sind (Abb. 4.3C). Darüber hinaus könnte ein anterograder, axonaler und aktivitätsabhängiger Transport von BDNF ([Kohara et al., 2001](#)) aus anderen Hirnarealen in den visuellen CS dazu führen, dass nach Erhöhung der Aktivität im visuellen System BDNF retinalen oder kortikalen Ursprungs im visuellen CS TrkB aktiviert (Abb. 4.3A). Der Befund, dass von retinalen Ganglienzellen der Ratte produziertes BDNF in den kontralateralen CS transportiert wird ([Caleo et al., 2000](#)), stützt diese Hypothese weiter. Darüber hinaus liegt BDNF in Dendriten in unmittelbarer Nähe von Synapsen in Vesikeln vor ([Haubensak et al., 1998](#)) und kann nach einer präsynaptischen Glutamatfreisetzung über eine postsynaptische Depolarisation mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom sezerniert werden ([Hartmann et al., 2001](#)). Damit könnte ein Aktivitätsanstieg in retinalen Afferenzen zur Freisetzung von BDNF im CS beitragen (Abb. 4.3B).

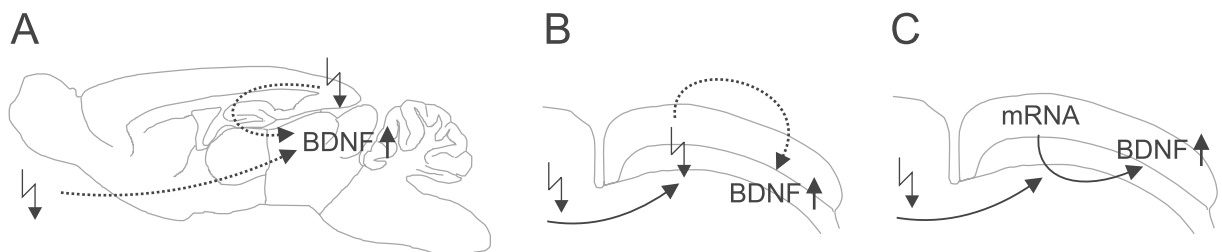


Abbildung 4.3: Mögliche Quellen von BDNF. A: Ein Aktivitätsanstieg im visuellen Kortex oder in der Retina löst den anterograden Transport von BDNF in den CS aus. B: Zunahme der Aktivität colliculärer Afferenzen steigert die Freisetzung von BDNF im CS. C: Die Zunahme neuronaler Aktivität erhöht die Translationsrate von BDNF-mRNA im CS.

Weiterhin kommt eine veränderte Expression des TrkB-Rezeptors in Frage. So könnte zum einen das Fehlen von TrkB vor der Augenöffnung die Abwesenheit eines BDNF-Effekts auf die GABAerge Hemmung erklären. Mittels *in situ*-Hybridisierung konnte TrkB-mRNA im CS

der Maus während der Entwicklung nachgewiesen werden (Klein et al., 1990). TrkB-mRNA wurde auch auf zellulärem Niveau in den meisten Zellen des CS detektiert (Merlio et al., 1992; Vizuete et al., 2001). Dies stimmt mit der hier festgestellten TrkB-mRNA-Expression überein. Eine Enukleation und damit das Fehlen eines visuellen Eingangs modifiziert nicht die Expression von TrkB im CS der Ratte (Vizuete et al., 2001). Analog dazu wurde hier beobachtet, dass die TrkB-mRNA-Expression nicht durch die Augenöffnung beeinflusst wird. Die Möglichkeit des alternativen Splicings von TrkB-RNA bietet weitere Erklärungsansätze.

Hier wurde die mRNA-Expression des vollständigen Rezeptors TrkB.FL und des verkürzten TrkB.T1 untersucht. Hinsichtlich der Funktion von TrkB.T1 bestehen zwei Theorien: Expression von TrkB.T1 könnte einen Mechanismus darstellen, im Extrazellulärraum befindliches BDNF abzufangen und somit die räumliche Ausdehnung des Signals zu begrenzen (Biffo et al., 1995). TrkB-Rezeptoren dimerisieren, wenn BDNF gebunden wird, was die Voraussetzung für die nachfolgende Phosphorylierung der intrazellulären, katalytischen Domänen ist. Dies stellt wiederum den Startpunkt des intrazellulären Signalwegs dar. TrkB.T1 könnte damit durch Dimerisation mit TrkB.FL zu inaktiven TrkB-Rezeptoren den Signalweg unterbrechen (Haapasalo et al., 2001). Die Abwesenheit eines BDNF-Effekts vor der Augenöffnung könnte durch ein Überwiegen von TrkB.T1 gegenüber TrkB.FL erklärt werden. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede in der TrkB.FL- und TrkB.T1-mRNA-Expression, die eine solche Modulation des BDNF-Signalwegs nahelegen – weder im Vergleich vor Augenöffnung versus danach noch zwischen den Genotypen. Da nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Menge von mRNA mit der Menge Protein oder der Anzahl funktioneller Rezeptoren korreliert, kann diese Möglichkeit jedoch nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus sind die Splice-Varianten TrkB.T2 und TrkB.T-Shc bekannt (Barbacid, 1994; Stoilov et al., 2002). Obwohl TrkB.T2 noch nicht als Protein nachgewiesen wurde (Barbacid, 1994) und über die Funktion des kürzlich entdeckten TrkB.T-Shc wenig bekannt ist (Stoilov et al., 2002), kann eine Beteiligung insbesondere der letzteren Splice-Variante nicht ausgeschlossen werden.

Möglicherweise handelt es sich bei der Beobachtung, dass die Auswirkungen der BDNF-Defizienz erst nach der Augenöffnung deutlich werden, um ein allgemeines Phänomen. Interessanterweise werden die Struktur von Dendriten, ihr Auswachsen sowie der Umbau von Spines durch BDNF moduliert (Horch et al., 1999). Im somatosensorischen Cortex fanden Knott et al. (2002) nach mechanischer Stimulation der Barthaare der Ratte eine erhöhte Anzahl von Spines mit deutlich mehr GABAergen Kontakten. In *bdnf*<sup>+/-</sup> Mäusen fehlt diese Form der aktivitätsinduzierten synaptischen Plastizität (Genoud et al., 2002). Die reduzierte bzw. fehlende Expression von BDNF hat im ZNS eventuell erst dann funktionelle Konsequenzen, wenn das untersuchte System beansprucht wird.

## 4.6 Einfluss von BDNF auf die Entwicklung GABAerger Synapsen

Die Expression der Untereinheiten  $\alpha_{1-3}$  ist einer entwicklungsbedingten Modulation unterworfen, welche von Veränderungen der IPSC-Kinetik begleitet wird. Vicini et al. (2001) demonstrierten dies anhand der Deletion der  $\alpha_1$ -Untereinheit, die eine entwicklungsbedingte Verkürzung GABAerger mIPSC im Kleinhirn verhinderte. Darüber hinaus nimmt im Thalamus die Zeitkonstante  $\tau$  GABAerger eIPSC mit zunehmender  $\alpha_1$ -Expression ab (Okada et al., 2000).

Im visuellen System unterliegt die Expression der  $\alpha$ -Untereinheiten ebenfalls entwicklungsbedingten Veränderungen. Im visuellen Cortex nimmt im Laufe der Entwicklung die Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit zu, während die der  $\alpha_3$ -Untereinheit kontinuierlich abfällt (Chen et al., 2001). An Schnitten des CS konnte bereits gezeigt werden, dass die zunehmende Expression von mRNA der  $\alpha_1$ -Untereinheit und die Verkürzung GABAerger IPSC parallel verlaufen (Jüttner et al., 2001b; Schmidt et al., 2002). Dies wurde mit einem vermehrten Ladungstransfer über NMDA-Rezeptoren zum Zeitpunkt der Augenöffnung in Zusammenhang gebracht.

Der Anstieg der  $\alpha_1$ -mRNA-Expression verbunden mit einer Abnahme der Zeitkonstanten  $\tau$  über die Augenöffnung in *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten bestätigt diesen Befund. Allerdings ist in *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten eine Abnahme der Zeitkonstanten ohne Änderung der Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit zu verzeichnen. Wahrscheinlich ist jedoch nicht die Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit allein für die Beschleunigung GABAerger IPSC verantwortlich, sondern ein Anstieg des Verhältnisses von  $\alpha_1 : \alpha_2$  im Thalamus (Okada et al., 2000) bzw.  $\alpha_1 : \alpha_3$  im CS (Jüttner et al., 2001b). Beides trifft auch für *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitte zu. Ein zweiter Erklärungsansatz besteht darin, dass  $\alpha$ -Untereinheiten und insbesondere  $\alpha_1$  im Überfluss exprimiert und nur zu ca. 20% zum Aufbau von Rezeptoren herangezogen werden (Barnes, 2000). Steigt der prozentuale Anteil rekrutierter  $\alpha_1$ -Untereinheiten in *bdnf*<sup>-/-</sup> Mäusen, so entsteht möglicherweise unabhängig von der Menge exprimierter  $\alpha_1$ -mRNA die gleiche Anzahl von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit schneller Kinetik.

Das Zusammenfallen dieser drastischen Veränderungen der GABAergen Hemmung – sowohl hinsichtlich Kinetik als auch mRNA-Expression – mit der Augenöffnung legt die Vermutung nahe, dass diese von der Augenöffnung und der damit verbundenen Aktivitätssteigerung visueller Eingänge ausgelöst wird. Chen et al. (2001) konnten aufzeigen, dass die Reifung GABAerger Synapsen ihren Ursprung in dem Wechselspiel von GABAerger Inhibition und glutamaterger Exzitation hat. Ob die Beschleunigung der Kinetik in Abwesenheit von BDNF auch von NMDA-Rezeptoren vermittelt stattfindet oder andere regulative Prozesse im Vordergrund stehen, muss zum jetzigen Zeitpunkt offen bleiben.

## 4.7 Zeitlicher Verlauf der BDNF-Wirkung an der GABAergen Synapse

Eine interessante und wichtige Frage betrifft die Zeitskala, auf welcher BDNF die beschriebenen Veränderungen an der GABAergen Synapse auslöst. Die Applikation von BDNF führte innerhalb von Minuten zu einer signifikanten, PKC-abhängigen Reduktion der Amplitude von sIPSC. Ebenso führte die anderthalbstündige Blockade des TrkB-Rezeptors mit K252a in *bdnf*<sup>+/+</sup> Schnitten zu Veränderungen, wie sie auch in *bdnf*<sup>-/-</sup> Schnitten zu beobachten waren. Nimmt man an, dass sich die BDNF-induzierte Aufregulation der mRNA-Expression von GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten langfristig in einer erhöhten Anzahl postsynaptischer Rezeptoren niederschlägt, könnte die Steuerung der GABAergen Synapse durch BDNF in zwei Phasen verlaufen:

Die verstärkte Aktivierung glutamaterger synaptischer Eingänge führt zur erhöhten Freisetzung von BDNF (Hartmann et al., 2001). Innerhalb kurzer Zeit bindet BDNF an TrkB-Rezeptoren benachbarter GABAerger Synapsen, aktiviert so die PKC, diese phosphoryliert ihrerseits GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und supprimiert auf diesem Weg die GABAerge Hemmung. Dies wirkt sich disinhibierend auf die neuronale Aktivität aus. Eine gleichzeitige Steigerung der Aktivität glutamaterger Synapsen durch BDNF (Lessmann und Heumann, 1998) verstärkt diesen Effekt weiter. Auf längere Sicht führt BDNF durch die vermehrte Expression von GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten zum Anstieg der Rezeptorzahl und zur Verstärkung der GABAergen Inhibition. Die Disinhibition wird wieder aufgehoben.

Die Konsequenz wäre zum einen das kurzzeitige Ansteigen der neuronalen Aktivität in Antwort auf einen starken Stimulus, der sowohl lokal als auch in Projektionsarealen aktivitätsabhängige Mechanismen anstoßen könnte. Zum anderen würde ein solcher Prozess die GABAerge Synapse in einen Zustand versetzen, in welchem sie über mehr Rezeptoren bei insgesamt gleicher Leitfähigkeit verfügt, ihr Auflösungsvermögen für die angebotene Menge GABA wäre besser, sie wäre weniger schnell gesättigt, kurz: sie wäre neu kalibriert.

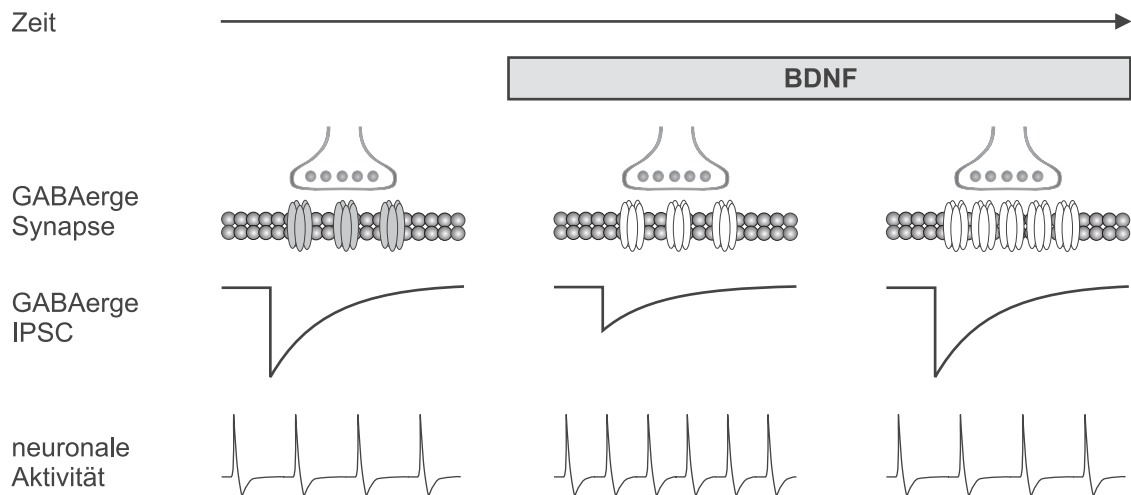


Abbildung 4.4: Zeitlicher Verlauf der BDNF-Wirkung an der GABAergen Synapse. Akut bewirkt BDNF über die PKC-abhängige Phosphorylierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors eine verminderte Aktivität von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. Dies hat die Reduktion GABAerger Ströme zur Folge und wirkt damit disinhibierend auf die Netzwerkaktivität. Langfristig kommt es über die erhöhte mRNA-Expression von GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten zum Anstieg der postsynaptischen Rezeptorzahl, somit zur Verstärkung GABAerger Ströme und zur Normalisierung der Netzwerkaktivität.

## 5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Modulation der GABAergen synaptischen Transmission in den visuellen Schichten des *Colliculus superior* der Maus durch das Neurotrophin BDNF zu charakterisieren. Hierzu wurden *bdnf*<sup>+/+</sup> und *-/-* Mäuse kurz vor und nach der Augenöffnung in einer die Morphologie erhaltenden Schnittpräparation elektrophysiologisch und molekularbiologisch untersucht.

Das Fehlen von BDNF veränderte das Präparat hinsichtlich Neurondichte und -größe nicht. Ebenso blieben der Membranwiderstand und die Ganzzellkapazität unbeeinflusst von der chronischen Abwesenheit von BDNF. Im Gegensatz dazu zeigten sich deutliche funktionelle Defizite im Entladungsverhalten und in der GABAergen Hemmung. Durch Registrierung von Aktionspotentialen wurde demonstriert, dass BDNF für die Aufrechterhaltung der Netzwerkaktivität erforderlich ist. Durch Applikation eines GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Inhibitors konnte die Suppression der GABAergen Hemmung durch BDNF als zugrunde liegender Mechanismus aufgedeckt werden. Daraufhin durchgeführte Ganzzelleableitungen bestätigten dies und legten einen postsynaptischen, TrkB-vermittelten Mechanismus der BDNF-Wirkung nahe. Es war möglich, den Einfluss der chronischen Abwesenheit von BDNF durch akute lokale Superfusion von BDNF vollständig aufzuheben. Die ausschließlich postsynaptische Blockade der PKC reichte aus, dies zu verhindern. Hierdurch wird unterstrichen, dass in diesem Präparat der Angriffspunkt von BDNF an der GABAergen Synapse auf der postsynaptischen Seite liegt.

Um den genauen Wirkungsmechanismus von BDNF an der GABAergen Synapse zu beleuchten, wurde die mRNA-Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\alpha_{1-3}$  untersucht. Diese ist in Anwesenheit von BDNF höher. Demzufolge sollte eine reduzierte Expression dieser Untereinheiten in *bdnf*<sup>-/-</sup> Tieren zu einer verringerten Rezeptoranzahl und somit zur Sättigung postsynaptischer Rezeptoren führen. Durch die Analyse von Amplitude und Kinetik GABAerger IPSC und die Applikation von Zolpidem wurde dies bestätigt. Demnach führt die Abwesenheit von BDNF zur Aufregulation der GABAergen Inhibition, obwohl die Rezeptorzahl in der Postsynapse wahrscheinlich niedriger ist. Als zentraler Mechanismus der akuten BDNF-Wirkung kommt deshalb am ehesten eine PKC-vermittelte Phosphorylierung und nachfolgende Veränderung des Desensitisierungsverhaltens in Betracht. Außerdem muss an eine Reduktion der Öffnungswahrscheinlichkeit oder der Leitfähigkeit des Rezeptors gedacht werden.

Unmittelbar vor der Augenöffnung hatte die BDNF-Defizienz keinerlei Einfluss auf die

GABAerge Hemmung. Es ist also davon auszugehen, dass BDNF im CS erst nach der Augenöffnung eine wesentliche Rolle in der Modulation der GABAergen Synapsen und damit in der Kontrolle der Netzwerkaktivität spielt. Dies steht in Einklang mit der Vorstellung, dass sowohl Translation und Freisetzung als auch Transport von BDNF durch neuronale Aktivität reguliert werden.

Der Ablauf der neurotrophinergen Regulation im *Colliculus superior* stellt sich wie folgt dar: Durch Aktivierung colliculärer Afferenzen wird BDNF vermehrt freigesetzt. BDNF reduziert nun zunächst über die Modulation von Rezeptoreigenschaften die GABAerge Hemmung und disinhibiert die Netzwerkaktivität. Längerfristig kommt es über eine vermehrte Expression von GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten zum Anstieg der Rezeptorzahl, damit zur Wiederherstellung der GABAergen Hemmung und letztlich zu einer Reduktion der Netzwerkaktivität.

BDNF ist also in der kritischen Zeitperiode der Augenöffnung, wenn das Mustersehen einsetzt, ein wichtiger Faktor in der Regulation neuronaler Aktivität.

## A. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Rosemarie Grantyn für die freundliche Überlassung des Themas. Erst ihre kontinuierliche Betreuung, die vielen hilfreichen Hinweise und fruchtbaren Diskussionen haben die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht. Dr. Thomas Rothe möchte ich für seine fortwährende Gesprächsbereitschaft und seine stete Unterstützung in jeglicher Hinsicht – vom Erlernen der Präparation bis zur korrekten Auswertung der Messdaten und deren Interpretation – danken.

Viele hilfreiche Impulse in Hinblick auf die *patch clamp*-Technik – ihrer Möglichkeiten bzw. Grenzen, ihrem praktischen Einsatz und der möglichen Aussagen – verdanke ich Dr. René Jüttner und Dr. Sergej Kirischuk.

Für die Einarbeitung in molekularbiologische Methoden und insbesondere für die Hilfe beim Erlernen immunhistochemischer Methoden bin ich Dr. Jochen Meier sehr dankbar.

Für ihre Hilfsbereitschaft, die vielen praktischen Hinweise und vor allem für die große Hilfe bei der Genotypisierung möchte ich mich bei Frau Karin Przewdziecki und Frau Ivonne Strömel bedanken.

Meiner Familie danke ich für die große Unterstützung, die sie mir über die gesamte Dauer meiner Promotion erwiesen hat.



## B. Literaturverzeichnis

- 1 G. Aakalu, W. B. Smith, N. Nguyen, C. G. Jiang und E. M. Schuman. Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron*, 30(2):489–502, 2001.
- 2 J. Akyeli, C. Henneberger, J. Meier, T. Rothe und R. Grantyn. Presynaptic effects of BDNF on GABAergic synaptic transmission in the postnatal mouse superior colliculus (SC). In *FENS Abstr. vol 1*, A206.01, 2002.
- 3 C. Auger und A. Marty. Quantal currents at single-site central synapses. *J.Physiol.*, 526:3–11, 2000.
- 4 P. Baldelli, M. Novara, V. Carabelli, J. M. Hernández-Guijo und E. Carbone. BDNF up-regulates evoked GABAergic transmission in developing hippocampus by potentiating pre-synaptic N- and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels signalling. *Eur.J.Neurosci.*, 16(12):2297–2310, 2002.
- 5 M. Barbacid. The trk family of neurotrophin receptors. *J.Neurobiol.*, 25(11):1386–1403, 1994.
- 6 E. A. Barnard, P. Skolnick, R. W. Olsen, H. Mohler, W. Sieghart, G. Biggio, C. Braestrup, A. N. Bateson und S. Z. Langer. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol.Rev.*, 50(2):291–313, 1998.
- 7 E. M. Jr. Barnes. Intracellular trafficking of GABA<sub>A</sub> receptors. *Life Sci.*, 66(12):1063–1070, 2000.
- 8 M. R. Bennett und J. L. Kearns. Statistics of transmitter release at nerve terminals. *Prog.Neurobiol.*, 60(6):545–606, 2000.
- 9 S. Biffo, N. Offenhäuser, B. D. Carter und Y. A. Barde. Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development*, 121:2461–2470, 1995.
- 10 D. K. Binder, S. D. Croll, C. M. Gall und H. E. Scharfman. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci.*, 24(1):47–53, 2001.

- 11 K. E. Binns. The synaptic pharmacology underlying sensory processing in the superior colliculus. *Prog.Neurobiol.*, 59(2):129–159, 1999.
- 12 T. Blümecke. Wunder der Evolution - Evolutionsstrategien und genetische Algorithmen. *c't Magazin für computertechnik*, 12:228, 1991.
- 13 R. Blum, K. W. Kafitz und A. Konnerth. Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na<sub>v</sub>1.9. *Nature*, 419:687–693, 2002.
- 14 M. M. Bolton, A. J. Pittman und D. C. Lo. Brain-derived neurotrophic factor differentially regulates excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal cultures. *J.Neurosci.*, 20(9):3221–3232, 2000.
- 15 N. J. Brandon, P. Delmas, J. T. Kittler, B. J. McDonald, W. Sieghart, D. A. Brown, T. G. Smart und S. J. Moss. GABA<sub>A</sub> receptor phosphorylation and functional modulation in cortical neurons by a protein kinase C-dependent pathway. *J.Biol.Chem.*, 275(49):38856–38862, 2000.
- 16 I. Brünig, S. Penschuck, B. Berninger, J. Benson und J. M. Fritschy. BDNF reduces miniature inhibitory postsynaptic currents by rapid downregulation of GABA<sub>A</sub> receptor surface expression. *Eur.J.Neurosci.*, 13(7):1320–1328, 2001.
- 17 R. F. Bulleit und T. Hsieh. MEK inhibitors block BDNF-dependent and -independent expression of GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in cultured mouse cerebellar granule neurons. *Dev.Brain Res.*, 119(1):1–10, 2000.
- 18 D. Cai, Y. Shen, M. De Bellard, S. Tang und M. T. Filbin. Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron*, 22(1):89–101, 1999.
- 19 M. Caleo, E. Menna, S. Chierzi, M. C. Cenni und L. Maffei. Brain-derived neurotrophic factor is an anterograde survival factor in the rat visual system. *Curr.Biol.*, 10(19):1155–1161, 2000.
- 20 A. Cellierino, P. Carroll, H. Thoenen und Y. A. Barde. Reduced size of retinal ganglion cell axons and hypomyelination in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Mol.Cell.Neurosci.*, 9(5):397–408, 1997.
- 21 R. Chapell, O. F. Bueno, X. Alvarez-Hernandez, L. C. Robinson und N. J. Leidenheimer. Activation of protein kinase C induces  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor internalization in *Xenopus* oocytes. *J.Biol.Chem.*, 273(49):32595–32601, 1998.

- 22 L. Chen, C. Yang und G. D. Mower. Developmental changes in the expression of GABA<sub>A</sub> receptor subunits ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ) in the cat visual cortex and the effects of dark rearing. *Mol. Brain Res.*, 88(1):135–143, 2001.
- 23 E. Cherubini und F. Conti. Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci.*, 24(3):155–162, 2001.
- 24 S. E. Clark, M. Garret und B. Platt. Postnatal alterations of GABA receptor profiles in the rat superior colliculus. *Neuroscience*, 104(2):441–454, 2001.
- 25 S. L. Cochran. Algorithms for detection and measurement of spontaneous events. *J. Neurosci. Methods*, 50(1):105–121, 1993.
- 26 E. T. Coffey, K. E. O. Åkerman und M. J. Courtney. Brain derived neurotrophic factor induces a rapid upregulation of synaptophysin and tau proteins via the neurotrophin receptor TrkB in rat cerebellar granule cells. *Neurosci. Lett.*, 227(3):177–180, 1997.
- 27 C. N. Connolly, J. T. Kittler, P. Thomas, J. M. Uren, N. J. Brandon, T. G. Smart und S. J. Moss. Cell surface stability of  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors. Dependence on protein kinase C activity and subunit composition. *J. Biol. Chem.*, 274(51):36565–36572, 1999.
- 28 F. Crestani, J. R. Martin, H. Mohler und U. Rudolph. Mechanism of action of the hypnotic zolpidem *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.*, 131(7):1251–1254, 2000.
- 29 A. Dumoulin, S. Lévi, B. Riveau, B. Gasnier und A. Triller. Formation of mixed glycine and GABAergic synapses in cultured spinal cord neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 12(11):3883–3892, 2000.
- 30 M. D. Edwards, A.-M. White und B. Platt. Characterisation of rat superficial superior colliculus neurones: firing properties and sensitivity to GABA. *Neuroscience*, 110(1):93–104, 2002.
- 31 P. Ernfors, K.-F. Lee und R. Jaenisch. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature*, 368:147–150, 1994.
- 32 N. Filippova, A. Sedelnikova, Y. Zong, H. Fortinberry und D. S. Weiss. Regulation of recombinant  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors by protein kinase C. *Mol. Pharmacol.*, 57(5):847–856, 2000.
- 33 M. Frerking, R. C. Malenka und R. A. Nicoll. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) modulates inhibitory, but not excitatory, transmission in the CA1 region of the hippocampus. *J. Neurophysiol.*, 80(6):3383–3386, 1998.

- 34 W. J. Friedman, L. Olson und H. Persson. Cells that express brain-derived neurotrophic factor mRNA in the developing postnatal rat brain. *Eur.J.Neurosci.*, 3:688–697, 1991.
- 35 D. O. Frost, Y. T. Ma, T. Hsieh, M. E. Forbes und J. E. Johnson. Developmental changes in BDNF protein levels in the hamster retina and superior colliculus. *J.Neurobiol.*, 49(3):173–187, 2001.
- 36 C. Gaiddon, J. P. Loeffler und Y. Larmet. Brain-derived neurotrophic factor stimulates AP-1 and cyclic AMP-responsive element dependent transcriptional activity in central nervous system neurons. *J.Neurochem.*, 66(6):2279–2286, 1996.
- 37 C. Genoud, G. W. Knott, B. Lu und E. Welker. Altered neuronal plasticity in the somatosensory cortex of BDNF heterozygote adult mice following whisker stimulation. In *FENS Abstr. vol 1*, A158.05, 2002.
- 38 E. Ghansah und D. S. Weiss. Modulation of GABA<sub>A</sub> receptors by benzodiazepines and barbiturates is autonomous of PKC activation. *Neuropharmacology*, 40(3):327–333, 2001.
- 39 J. Goggi, I. A. Pullar, S. L. Carney und H. F. Bradford. Modulation of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in rat brain striatal slices in vitro. *Brain Res.*, 941(1):34–42, 2002.
- 40 L. J. Goodman, J. Valverde, F. Lim, M. D. Geschwind, H. J. Federoff, A. I. Geller und F. Hefti. Regulated release and polarized localization of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *Mol.Cell.Neurosci.*, 7(3):222–238, 1996.
- 41 T. Gorba, O. Klostermann und P. Wahle. Development of neuronal activity and activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in organotypic cultures of rat visual cortex. *Cereb.Cortex*, 9(8):864–877, 1999.
- 42 R. Grantyn. Gaze control through superior colliculus: structure and function. *Rev.Oculomot.Res.*, 2:273–333, 1988.
- 43 O. Griesbeck, M. Canossa, G. Campana, A. Gärtner, M. C. Hoener, H. Nawa, R. Kolbeck und H. Thoenen. Are there differences between the secretion characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity. *Microsc.Res.Tech.*, 45(4):262–275, 1999.
- 44 F. J. Gunn-Moore und J. M. Tavaré. Progress toward understanding the molecular mechanisms of neurotrophic factor signalling. *Cell.Signal.*, 10(3):151–157, 1998.

- 45 A. Haapasalo, E. Koponen, E. Hoppe, G. Wong und E. Castren. Truncated trkB.T1 is dominant negative inhibitor of trkB.TK+-mediated cell survival. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 280(5):1352–1358, 2001.
- 46 M. Hartmann, R. Heumann und V. Lessmann. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J.*, 20(21):5887–5897, 2001.
- 47 W. Haubensak, F. Narz, R. Heumann und V. Lessmann. BDNF-GFP containing secretory granules are localized in the vicinity of synaptic junctions of cultured cortical neurons. *J.Cell Sci.*, 111:1483–1493, 1998.
- 48 C. Henneberger, R. Jüttner, T. Rothe und R. Grantyn. Postsynaptic action of BDNF on GABAergic synaptic transmission in the superficial layers of the mouse superior colliculus. *J.Neurophysiol.*, 88(2):595–603, 2002.
- 49 N. Hájos, Z. Nusser, E. A. Rancz, T. F. Freund und I. Mody. Cell type- and synapse-specific variability in synaptic GABA<sub>A</sub> receptor occupancy. *Eur.J.Neurosci.*, 12(3):810–818, 2000.
- 50 R. M. Holsinger, J. Schnarr, P. Henry, V. T. Castelo und M. Fahnstock. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. *Mol.Brain Res.*, 76(2):347–354, 2000.
- 51 H. W. Horch, A. Krüttgen, S. D. Portbury und L. C. Katz. Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. *Neuron*, 23(2):353–364, 1999.
- 52 C.-C. Hsu, C. Thomas, W. Chen, K. M. Davis, T. Foos, J. L. Chen, E. Wu, E. Floor, J. V. Schloss und J. Y. Wu. Role of synaptic vesicle proton gradient and protein phosphorylation on ATP-mediated activation of membrane-associated brain glutamate decarboxylase. *J.Biol.Chem.*, 274(34):24366–24371, 1999.
- 53 E. J. Huang und L. F. Reichardt. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu.Rev.Neurosci.*, 24:677–736, 2001.
- 54 Z. J. Huang, A. Kirkwood, T. Pizzorusso, V. Porciatti, B. Morales, M. F. Bear, L. Maffei und S. Tonegawa. BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell*, 98(6):739–755, 1999.
- 55 T. N. Hwang und D. R. Copenhagen. Automatic detection, characterization, and discrimination of kinetically distinct spontaneous synaptic events. *J.Neurosci.Methods*, 92(1):65–73, 1999.
- 56 T. Isa, T. Endo und Y. Saito. The visuo-motor pathway in the local circuit of the rat superior colliculus. *J.Neurosci.*, 18(20):8496–8504, 1998.

- 57 T. Isa und Y. Saito. The direct visuo-motor pathway in mammalian superior colliculus; novel perspective on the interlaminar connection. *Neurosci.Res.*, 41(2):107–113, 2001.
- 58 L. Jiang, S. Sun, M. Nedergaard und J. Kang. Paired-pulse modulation at individual GABAergic synapses in rat hippocampus. *J.Physiol.*, 523:425–439, 2000.
- 59 R. Jüttner, C. Henneberger, R. Grantyn und T. Rothe. Early onset of glutamatergic and GABAergic synaptic activity in the visual layers of the rodent superior colliculus. *Int.J.Devl.Neurosci.*, 19(3):255–261, 2001a.
- 60 R. Jüttner, J. Meier und R. Grantyn. Slow IPSC kinetics, low levels of  $\alpha 1$  subunit expression and paired-pulse depression are distinct properties of neonatal inhibitory GABAergic synaptic connections in the mouse superior colliculus. *Eur.J.Neurosci.*, 13(11):2088–2098, 2001b.
- 61 K. W. Kafitz, C. R. Rose, H. Thoenen und A. Konnerth. Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature*, 401:918–921, 1999.
- 62 C. Kanaka, K. Ohno, A. Okabe, K. Kuriyama, T. Itoh, A. Fukuda und K. Sato. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience*, 104(4):933–946, 2001.
- 63 Z. U. Khan, A. Gutiérrez, A. K. Mehta, C. P. Miralles und A. L. De Blas. The  $\alpha_4$  subunit of the GABA<sub>A</sub> receptors from rat brain and retina. *Neuropharmacology*, 35(9):1315–1322, 1996.
- 64 R. Klein. Role of neurotrophins in mouse neuronal development. *FASEB J.*, 8(10):738–744, 1994.
- 65 R. Klein, D. Martin-Zanca, M. Barbacid und L. F. Parada. Expression of the tyrosine kinase receptor gene *trkB* is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development*, 109(4):845–850, 1990.
- 66 M. Knipper, A. Beck, J. Rylett und H. Breer. Neurotrophin induced second messenger responses in rat brain synaptosomes. *Neuroreport*, 4(5):483–486, 1993.
- 67 G. W. Knott, C. Quairiaux, C. Genoud und E. Welker. Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron*, 34(2):265–273, 2002.
- 68 B. Knüsel und F. Hefti. K-252 compounds: modulators of neurotrophin signal transduction. *J.Neurochem.*, 59(6):1987–1996, 1992.
- 69 K. Kohara, A. Kitamura, M. Morishima und T. Tsumoto. Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science*, 291(5512):2419–2423, 2001.

- 70 M. Korte, P. Carroll, E. Wolf, G. Brem, H. Thoenen und T. Bonhoeffer. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 92:8856–8860, 1995.
- 71 Y. Kovalchuk, E. Hanse, K. W. Kafitz und A. Konnerth. Postsynaptic Induction of BDNF-Mediated Long-Term Potentiation. *Science*, 295(5560):1729–1734, 2002.
- 72 K. Kraszewski und R. Grantyn. Unitary, quantal and miniature GABA-activated synaptic chloride currents in cultured neurons from the rat superior colliculus. *Neuroscience*, 47(3):555–570, 1992.
- 73 B. J. Krishek, X. Xie, C. Blackstone, R. L. Huganir, S. J. Moss und T. G. Smart. Regulation of GABA<sub>A</sub> receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron*, 12(5):1081–1095, 1994.
- 74 P. W. Laird, A. Zijderveld, K. Linders, M. A. Rudnicki, R. Jaenisch und A. Berns. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.*, 19(15):4293–4293, 1991.
- 75 R. M. Law, A. Stafford und M. W. Quick. Functional regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters by direct tyrosine phosphorylation. *J.Biol.Chem.*, 275(31):23986–23991, 2000.
- 76 P. H. Lee, M. Schmidt und W. C. Hall. Excitatory and inhibitory circuitry in the superficial gray layer of the superior colliculus. *J.Neurosci.*, 21(20):8145–8153, 2001.
- 77 N. J. Leidenheimer, S. J. McQuilkin, L. D. Hahner, P. Whiting und R. A. Harris. Activation of protein kinase C selectively inhibits the gamma-aminobutyric acidA receptor: role of desensitization. *Mol.Pharmacol.*, 41(6):1116–1123, 1992.
- 78 V. Lessmann und R. Heumann. Modulation of unitary glutamatergic synapses by neurotrophin-4/5 or brain-derived neurotrophic factor in hippocampal microcultures: presynaptic enhancement depends on pre-established paired-pulse facilitation. *Neuroscience*, 86(2):399–413, 1998.
- 79 R. Levi-Montalcini, H. Meyer und V. Hamburger. *In vitro* experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Res.*, 14:49–57, 1954.
- 80 E. S. Levine, R. A. Crozier, I. B. Black und M. R. Plummer. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 95(17):10235–10239, 1998.

- 81 Y. X. Li, Y. O. Zhang, H. A. Lester, E. M. Schuman und N. Davidson. Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons. *J.Neurosci.*, 18(24):10231–10240, 1998.
- 82 F. S. Lo, R. J. Cork und R. R. Mize. Physiological properties of neurons in the optic layer of the rat's superior colliculus. *J.Neurophysiol.*, 80(1):331–343, 1998.
- 83 F. S. Lo und R. R. Mize. Retinal input induces three firing patterns in neurons of the superficial superior colliculus of neonatal rats. *J.Neurophysiol.*, 81(2):954–958, 1999.
- 84 B. Lom, J. Cogen, A. L. Sanchez, T. Vu und S. Cohen-Cory. Local and target-derived brain-derived neurotrophic factor exert opposing effects on the dendritic arborization of retinal ganglion cells *in vivo*. *J.Neurosci.*, 22(17):7639–7649, 2002.
- 85 R. D. Lund und J. S. Lund. Development of synaptic patterns in the superior colliculus of the rat. *Brain Res.*, 42:1–20, 1972.
- 86 J. W. Lynch und P. H. Barry. Action potentials initiated by single channels opening in a small neuron (rat olfactory receptor). *Biophys.J.*, 55(4):755–768, 1989.
- 87 S. Marty, R. Wehrle und C. Sotelo. Neuronal activity and brain-derived neurotrophic factor regulate the density of inhibitory synapses in organotypic slice cultures of postnatal hippocampus. *J.Neurosci.*, 20(21):8087–8095, 2000.
- 88 B. J. McDonald und S. J. Moss. Conserved phosphorylation of the intracellular domains of GABA<sub>A</sub> receptor  $\beta 2$  and  $\beta 3$  subunits by cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase protein kinase C and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin type II-dependent protein kinase. *Neuropharmacology*, 36(10):1377–1385, 1997.
- 89 J. G. McLarnon. The recording of action potential currents as an assessment for drug actions on excitable cells. *J.Pharmacol.Methods*, 26(2):105–111, 1991.
- 90 A. K. Mehta und M. K. Ticku. An update on GABA<sub>A</sub> receptors. *Brain Res.Rev.*, 29:196–217, 1999.
- 91 J. Meier, R. Jüttner, S. Kirischuk und R. Grantyn. Synaptic Anchoring of Glycine Receptors in Developing Collicular Neurons under Control of Metabotropic Glutamate Receptor Activity. *Mol.Cell.Neurosci.*, 21:324–340, 2002.
- 92 J. P. Merlio, P. Ernfors, M. Jaber und H. Persson. Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 51(3):513–532, 1992.



- 93 J. Micheau und G. Riedel. Protein kinases: which one is the memory molecule? *Cell.Mol.Life Sci.*, 55(4):534–548, 1999.
- 94 L. Minichiello, A. M. Calella, D. L. Medina, T. Bonhoeffer, R. Klein und M. Korte. Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 36(1):121–137, 2002.
- 95 R. R. Mize. The organization of GABAergic neurons in the mammalian superior colliculus. *Progress in Brain Research*, 90:219–248, 1992.
- 96 D. D. Murphy, N. B. Cole und M. Segal. Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 95(19):11412–11417, 1998.
- 97 M. Numberger und A. Draguhn. *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag, 1996.
- 98 K. Obrietan, X. B. Gao und A. N. Van Den Pol. Excitatory Actions of GABA Increase BDNF Expression via a MAPK-CREB-Dependent Mechanism-A Positive Feedback Circuit in Developing Neurons. *J.Neurophysiol.*, 88(2):1005–1015, 2002.
- 99 M. Okada, K. Onodera, C. Van Renterghem, W. Sieghart und T. Takahashi. Functional correlation of GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$  subunits expression with the properties of IPSCs in the developing thalamus. *J.Neurosci.*, 20(6):2202–2208, 2000.
- 100 K. Olofsdotter, O. Lindvall und F. Asztély. Increased synaptic inhibition in dentate gyrus of mice with reduced levels of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*, 101(3):531–539, 2000.
- 101 R. W. Olsen, T. M. DeLorey, M. Gordey und M.-H. Kang. GABA receptor function and epilepsy. *Adv.Neurol.*, 79:499–510, 1999.
- 102 K. Parain, M. G. Murer, Q. Yan, B. Faucheux, Y. Agid, E. Hirsch und R. Raisman-Vozari. Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson’s disease substantia nigra. *NeuroReport*, 10(3):557–561, 1999.
- 103 A. Patapoutian und L. F. Reichardt. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 11(3):272–280, 2001.
- 104 S. L. Patterson, T. Abel, T. A. S. Deuel, K. C. Martin, J. C. Rose und E. R. Kandel. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*, 16:1137–1145, 1996.
- 105 J. Paul, K. Gottmann und V. Lessmann. NT-3 regulates BDNF-induced modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *NeuroReport*, 12(12):2635–2639, 2001.

- 106 V. Pencea, K. D. Bingaman, S. J. Wiegand und M. B. Luskin. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J.Neurosci.*, 21(17):6706–6717, 2001.
- 107 D. Perrais und N. Ropert. Effect of zolpidem on miniature IPSCs and occupancy of postsynaptic GABA<sub>A</sub> receptors in central synapses. *J.Neurosci.*, 19(2):578–588, 1999.
- 108 P. Poisbeau, M. C. Cheney, M. D. Browning und I. Mody. Modulation of synaptic GABA<sub>A</sub> receptor function by PKA and PKC in adult hippocampal neurons. *J.Neurosci.*, 19(2):674–683, 1999.
- 109 L. J. Reece und C. H. Lim. Onset of optic nerve conduction and synaptic potentials in superior colliculus of fetal rats studied in vitro. *Dev.Brain Res.*, 106(1):25–38, 1998.
- 110 C. Rivera, H. Li, J. Thomas-Crusells, H. Lahtinen, T. Viitanen, A. Nanobashvili, Z. Kokaia, M. S. Airaksinen, J. Voipio, K. Kaila und M. Saarma. BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl<sup>-</sup> extrusion. *J.Cell Biol.*, 159(5):747–752, 2002.
- 111 T. Rothe, R. Bähring, P. Carroll und R. Grantyn. Repetitive firing deficits and reduced sodium current density in retinal ganglion cells developing in the absence of BDNF. *J.Neurobiol.*, 40(3):407–419, 1999.
- 112 L. C. Rutherford, A. DeWan, H. M. Lauer und G. G. Turrigiano. Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity- dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. *J.Neurosci.*, 17(12):4527–4535, 1997.
- 113 R. Sala, A. Viegi, F. M. Rossi, T. Pizzorusso, G. Bonanno, M. Raiteri und L. Maffei. Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor increase neurotransmitter release in the rat visual cortex. *Eur.J.Neurosci.*, 10(6):2185–2191, 1998.
- 114 A. F. Schinder, B. Berninger und M. Poo. Postsynaptic target specificity of neurotrophin-induced presynaptic potentiation. *Neuron*, 25(1):151–163, 2000.
- 115 S. A. Schmidt, R. Jüttner, J. Meier, T. Rothe und R. Grantyn. NMDA receptor activation accelerates the decay of GABAergic IPSCs and increases the expression of the GABA<sub>A</sub> receptor subunit  $\alpha 1$  in developing neurons of the rodent superior colliculus. In *FENS Abstr. vol 1*, A011.13, 2002.

- 116 J. Shi, S. M. Aamodt und M. Constantine-Paton. Temporal correlations between functional and molecular changes in NMDA receptors and GABA neurotransmission in the superior colliculus. *J.Neurosci.*, 17(16):6264–6276, 1997.
- 117 E. Soriano, F. Aguado, M. Carmona, R. Yuste und C. Ibanez. BDNF regulates spontaneous correlated activity in the hippocampus by increasing GABAergic synaptogenesis and expression of the  $K^+/Cl^-$  cotransporter KCC2. In *FENS Abstr.vol 1*, A165.01, 2002.
- 118 P. Stoilov, E. Castren und S. Stamm. Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 290(3):1054–1065, 2002.
- 119 T. Tanaka, H. Saito und N. Matsuki. Inhibition of GABA<sub>A</sub> synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. *J.Neurosci.*, 17(9):2959–2966, 1997.
- 120 X. Tao, A. E. West, W. G. Chen, G. Corfas und M. E. Greenberg. A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF. *Neuron*, 33(3):383–395, 2002.
- 121 N. Tartaglia, J. Du, W. J. Tyler, E. Neale, L. D. Pozzo-Miller und B. Lu. Protein synthesis-dependent and -independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor. *J.Biol.Chem.*, 276(40):37585–37593, 2001.
- 122 C. L. Thompson, M. H. J. Tehrani, E. M. Jr. Barnes und F. A. Stephenson. Decreased expression of GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 6$  and  $\beta 3$  subunits in stargazer mutant mice: a possible role for brain-derived neurotrophic factor in the regulation of cerebellar GABA<sub>A</sub> receptor expression? *Mol.Brain Res.*, 60(2):282–290, 1998.
- 123 I. G. Thong und B. Dreher. The development of the corticotectal pathway in the albino rat. *Brain Res.*, 390(2):227–238, 1986.
- 124 K. R. Tovar, K. Sprouffske und G. L. Westbrook. Fast NMDA receptor-mediated synaptic currents in neurons from mice lacking the  $\epsilon 2$  (NR2B) subunit. *J.Neurophysiol.*, 83(1):616–620, 2000.
- 125 D. Tropea, S. Capsoni, E. Tongiorgi, S. Giannotta, A. Cattaneo und L. Domenici. Mismatch between BDNF mRNA and protein expression in the developing visual cortex: the role of visual experience. *Eur.J.Neurosci.*, 13(4):709–721, 2001.
- 126 W. J. Tyler und L. D. Pozzo-Miller. BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J.Neurosci.*, 21(12):4249–4258, 2001.

- 127 C. Vicario-Abejón, C. Collin, R. D. G. McKay und M. Segal. Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons. *J.Neurosci.*, 18(18):7256–7271, 1998.
- 128 S. Vicini, C. Ferguson, K. Prybylowski, J. Kralic, A. L. Morrow und G. E. Homanics. GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ 1 subunit deletion prevents developmental changes of inhibitory synaptic currents in cerebellar neurons. *J.Neurosci.*, 21(9):3009–3016, 2001.
- 129 M. L. Vizuete, J. L. Venero, C. Vargas, M. Revuelta, A. Machado und J. Cano. Potential role of endogenous brain-derived neurotrophic factor in long-term neuronal reorganization of the superior colliculus after bilateral visual deprivation. *Neurobiol.Dis.*, 8(5):866–880, 2001.
- 130 Q. Wan, Z. G. Xiong, H. Y. Man, C. A. Ackerley, J. Braunton, W. Y. Lu, L. E. Becker, J. F. MacDonald und Y. T. Wang. Recruitment of functional GABA<sub>A</sub> receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature*, 388:686–690, 1997.
- 131 S. S. Warton, M. Perouansky und R. Grantyn. Development of GABAergic synaptic connections in vivo and in cultures from the rat superior colliculus. *Dev.Brain Res.*, 52(1):95–111, 1990.
- 132 W. Wisden, D. J. Laurie, H. Monyer und P. H. Seeburg. The distribution of 13 GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J.Neurosci.*, 12(3):1040–1062, 1992.
- 133 M. K. Yamada, K. Nakanishi, S. Ohba, T. Nakamura, Y. Ikegaya, N. Nishiyama und N. Matsuki. Brain-derived neurotrophic factor promotes the maturation of GABAergic mechanisms in cultured hippocampal neurons. *J.Neurosci.*, 22(17):7580–7585, 2002.
- 134 Q. Zhou, H. Abe und T. S. Jr. Nowak. Immunocytochemical and in situ hybridization approaches to the optimization of brain slice preparations. *J.Neurosci.Methods*, 59(1):85–92, 1995.

## C. Eigene Veröffentlichungen

### Beiträge in wissenschaftlichen Zeitschriften

- 1 C. Henneberger, R. Jüttner, T. Rothe und R. Grantyn. Postsynaptic action of BDNF on GABAergic synaptic transmission in the superficial layers of the mouse superior colliculus. *J.Neurophysiol.*, 88(2):595–603, 2002.
- 2 R. Jüttner, C. Henneberger, R. Grantyn und T. Rothe. Early onset of glutamatergic and GABAergic synaptic activity in the visual layers of the rodent superior colliculus. *Int.J.Dev.Neurosci.*, 19(3):255–261, 2001.
- 3 C. Henneberger, R. Grantyn und T. Rothe. Rapid genotyping of newborn gene mutant mice. *J.Neurosci.Methods*, 100(1):123–126, 2000.
- 4 C. Henneberger, J. Akyeli, J. Meier, T. Rothe und R. Grantyn. Neurotrophinergic regulation of GABAergic inhibition in the mouse superior colliculus. *Manuskript in Vorbereitung.*

### Abstrakta

- 1 C. Henneberger, R. Jüttner, T. Rothe und R. Grantyn. Postsynaptic and PKC-dependent action of BDNF on GABAergic synaptic transmission in the superficial layers of the mouse superior colliculus. In *FENS Abstr. vol 1*, A011.06, 2002.
- 2 J. Akyeli, C. Henneberger, J. Meier, T. Rothe und R. Grantyn. Presynaptic effects of BDNF on GABAergic synaptic transmission in the postnatal mouse superior colliculus (SC). In *FENS Abstr. vol 1*, A206.01, 2002.
- 3 C. Henneberger, R. Jüttner, T. Rothe und R. Grantyn. Spontaneous circuit activity and GABAergic synaptic transmission in the visual layers of mouse superior colliculus are controlled by BDNF. *Pflugers Arch.*, 441:263, 2001a.
- 4 C. Henneberger, R. Jüttner, T. Rothe und R. Grantyn. Spontaneous circuit activity and GABAergic synaptic transmission in the visual layers of mouse superior colliculus are controlled by BDNF. *Next Neuroscience Generation Meeting, Berlin*, 2001b.

- 5 T. Rothe, R. Jüttner, C. Henneberger und R. Grantyn. Early onset of GABAergic and glutamatergic synaptic activity in the visual layers of mouse and rat superior colliculus. *Pflugers Arch.*, 441:264, 2001.
- 6 T. Rothe, R. Jüttner, C. Henneberger und R. Grantyn. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) determines spontaneous activity levels in the superior colliculus by regulating the strength of inhibitory, but not excitatory synapses. *Eur.J.Neurosci.*, 12:272, 2000.
- 7 C. Henneberger, T. Rothe, R. Jüttner und R. Grantyn. Glutamatergic synaptic transmission in the visual layers of the mouse superior colliculus. *Berlin Neuroscience Forum, Bogensee*, 1999.

## Vorträge

- 1 Postsynaptic and PKC-dependent action of BDNF on GABAergic synaptic transmission in the superficial layers of the mouse superior colliculus. *13th European Students' Conference, Berlin*, 2002
- 2 BDNF as a modulator of GABAergic synaptic transmission in the visual layers of mouse superior colliculus. *GRK 238, Berlin*, 2001
- 3 BDNF as a modulator of GABAergic synaptic transmission. *Next Neuroscience Generation Meeting, Berlin*, 2001

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau des GABA-Rezeptors . . . . .	2
1.2	Neurotrophine und ihr Signalweg . . . . .	4
1.3	Die Schichtung des <i>Colliculus superior</i> . . . . .	9
2.1	Minimale Stimulation evozierter IPSC . . . . .	16
2.2	Auswertung postsynaptischer Ströme . . . . .	17
2.3	Bestimmung der Zellkapazität und des Membranwiderstands . . . . .	19
2.4	DNA Isolation und Einfrierzeit . . . . .	20
3.1	Pharmakologische Charakterisierung spontaner AP . . . . .	27
3.2	Entwicklung der AP-Generierung . . . . .	28
3.3	Vergleich spontaner AP von <i>bdnf</i> +/+ und -/- Schnitten mit/ohne TrkB-Blockade zum Zeitpunkt P15 . . . . .	29
3.4	Entladungsverhalten colliculärer Neurone im <i>current-clamp</i> zum Zeitpunkt P15 .	30
3.5	Einfluss der GABAergen Hemmung auf das spontane Entladungsverhalten in <i>bdnf</i> +/+ und -/- Schnitten . . . . .	31
3.6	Vollständige und reversible Blockade von sIPSC durch Bicucullin . . . . .	32
3.7	BDNF vermindert die Amplitude GABAerger sIPSC und eIPSC . . . . .	33
3.8	GABAerge mIPSC zum Zeitpunkt P15 . . . . .	36
3.9	Paarpulsverhalten GABAerger eIPSC . . . . .	37
3.10	VIAAT positive Boutons in <i>bdnf</i> +/+ und -/- Schnitten . . . . .	38
3.11	Korrelation zwischen Amplitude und Zeitkonstante GABAerger sIPSC . . . . .	39
3.12	Einfluss von Zolpidem auf sIPSC in <i>bdnf</i> +/+ und -/- Schnitten . . . . .	40
3.13	Einfluss von BDNF auf die Expression von GABA-Rezeptor-Untereinheiten . . .	43
3.14	PKC-abhängige Suppression GABAerger sIPSC durch exogenes BDNF . . . . .	44
3.15	Einfluss der Augenöffnung auf die GABAerge synaptische Transmission in Abhängigkeit von BDNF . . . . .	47
4.1	Modell der postsynaptischen BDNF-Wirkung an einer GABAergen Synapse . . .	53
4.2	Möglichkeiten einer postsynaptischen BDNF-Wirkung an der GABAergen Synapse	54
4.3	Mögliche Quellen von BDNF . . . . .	60

4.4	Zeitlicher Verlauf der BDNF-Wirkung an der GABAergen Synapses . . . . .	64
-----	---	----



# Tabellenverzeichnis

2.1	Für die PCR verwendete Primer . . . . .	22
2.2	Für die PCR und RT-PCR verwendete Protokolle . . . . .	22
3.1	Vergleich der Grundeigenschaften von <i>bdnf</i> <sup>+/+</sup> und <i>bdnf</i> <sup>-/-</sup> Schnitten zum Zeitpunkt P15 . . . . .	25
3.2	Vergleich GABAerger eIPSC und mRNA-Expression von GABA-Untereinheiten bei P11/12 . . . . .	46
3.3	Expression von BDNF, TrkB.FL, TrkB.T1 mRNA in der Entwicklung und im Genotypenvergleich . . . . .	48

## D. Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ACSF	künstlicher Liquor (artificial cerebrospinal fluid)
AP	Aktionspotential
APV	DL-2-Amino-5-Phosphonovalerinsäure
AMPA	(S)- $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolepropionsäure
BDNF	brain derived neurotrophic factor
CS	<i>Colliculus superior</i>
CV	Variationskoeffizient
DNQX	6,7-Dinitroquinoxalin-2,3(1H,4H)-dion
DAG	Diacylglycerol
eIPSC	evozierter inhibitorischer postsynaptischer Strom
EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IPSC	inhibitorischer postsynaptischer Strom
LTP	Langzeitpotenzierung
mIPSC	Miniatur-IPSC
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NT	Neurotrophin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C

PNS	peripheres Nervensystem
PPF	Paarpulsfazitierung
<i>p</i>	Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit
PSC	postsynaptischer Strom
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RGZ	retinale Ganglienzelle
SGS	<i>Stratum griseum superficiale</i>
sIPSC	spontaner inhibitorischer postsynaptischer Strom
SOp	<i>Stratum opticum</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TrkA,TrkB,TrkC	Tyrosinkinase-A,-B und -C
TTX	Tetrodotoxin
ZNS	zentrales Nervensystem

## E. Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsarbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter unter ausschließlicher Nutzung der aufgeführten Materialien, Methoden und Literaturquellen angefertigt zu haben.

Christian Henneberger

Berlin, den 10. Februar 2003