

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

DISSERTATION

**Theoretische und experimentelle Arbeiten
zur präsynaptischen Modulation der
GABAergen Übertragung**

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Sven Nikolai Axmacher
aus Osnabrück

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Draguhn
2. Prof. Dr. Heinz Beck
3. PD Dr. Ralf Schneggenburger

Datum der Promotion: 18. April 2005

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	3
Einleitung.....	4
Zielstellung.....	4
Methodik.....	5
Ergebnisse.....	6
Diskussion.....	10

Abstract

Zentralnervöse Lernvorgänge hängen wesentlich von der Plastizität der synaptischen Übertragung ab. Synapsen verändern ihre Effizienz sowohl durch Änderungen in der Freisetzungswahrscheinlichkeit von Neurotransmittern als auch durch Variabilität der postsynaptischen Rezeptorausstattung. Darüberhinaus gibt es seit einiger Zeit Hinweise, dass auch die Konzentration des Neurotransmitters in synaptischen Terminalen variieren kann und dadurch die Freisetzungswahrscheinlichkeit von Vesikeln verändert wird. Um den Zusammenhang zwischen der Füllung synaptischer Vesikel und ihrer Dynamik im Vesikelzyklus besser zu verstehen, habe ich zunächst ein Computermodell entwickelt. Ich habe gefunden, dass nur eine Modifikation des Nachschubs von Vesikeln aus der Reservepopulation in die Population unmittelbar freisetzbarer Vesikel die experimentell gemessene Abhängigkeit der Freisetzungswahrscheinlichkeit von der präsynaptischen Transmitterkonzentration reproduzieren kann, nicht jedoch ein direkter Effekt auf die Freisetzungsrates.

Einer der im Modell simulierten Mechanismen für den beobachteten Effekt des vesikulären Füllungsstatus auf die Vesikelfreisetzung besteht in einer Rückwirkung des freigesetzten Transmitters auf ionotrope Autorezeptoren. Diesen Mechanismus habe ich anschliessend an GABAergen Synapsen in der CA3-Region des Hippocampus untersucht. Tatsächlich habe ich durch patch-clamp Messungen herausgefunden, dass sowohl die Antwortwahrscheinlichkeit auf extrazelluläre Stimulation als auch die Frequenz von spontanen Vesikelfreisetzung nach Applikation des GABA_A Rezeptor-Agonisten Muscimol signifikant verringert ist. Diese Befunde weisen darauf hin, dass GABA seine eigene Freisetzung über ionotrope Autorezeptoren hemmt.

Direkte Messungen der Vesikelfreisetzung sind an GABAergen Synapsen nur durch bildgebende Verfahren möglich. Mit Hilfe von Zwei-Photonen Mikroskopie ist es mir erstmalig gelungen, im Hirnschnitt die spontane Fusion von Vesikeln zu untersuchen. Diese Methode könnte für eine Reihe von Fragestellungen relevant sein. Dabei hat sich gezeigt, dass nach Applikation von Muscimol die spontane Abnahme der Fluoreszenz vorher angefarbter synaptischer Vesikel ausschliesslich in perisomatischen (überwiegend GABAergen) synaptischen Boutons signifikant verringert ist.

Zusammenfassend habe ich bei der experimentellen Prüfung von Vorhersagen eines Computermodells durch patch-clamp Untersuchungen und durch eine neue Methode mit funktioneller Bildgebung Hinweise auf funktionelle präsynaptische GABA_A Rezeptoren an GABAergen Terminalen der CA3-Region des Hippocampus gefunden, die eine negative Rückwirkung auf die Freisetzung von Vesikeln ausüben.

Am Ende der Diskussion werde ich kurz auf Ergebnisse einer weiteren Publikation zur Kontrolle der zellulären Erregbarkeit durch intrinsische Leitfähigkeiten eingehen, die ich in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Richard Miles, Paris, erarbeitet habe.

Einleitung

Das zentrale Nervensystem reagiert auf Erfahrungen durch Änderungen der synaptischen Übertragung. Diese Änderungen können auf verschiedenen Zeitskalen stattfinden. Damit wird entweder die Kurzzeitdynamik synaptischer Übertragung oder die dauerhafte Speicherung neuer Gedächtnisinhalte beeinflusst. Die Mechanismen der synaptischen Plastizität beinhalten sowohl prä- als auch postsynaptische Änderungen. Kürzlich wurden in verschiedenen Systemen Hinweise auf einen neuen Mechanismus der präsynaptischen Plastizität gefunden: Die Konzentration von Neurotransmittern in synaptischen Terminalen scheint unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen variabel zu sein ((21). Im Falle des inhibitorischen Neurotransmitters GABA ist gezeigt worden, dass nach der Induktion epileptischer Ereignisse kompensatorisch die GABA-Produktion verstärkt wird ((7,(9). Dieser Effekt ist auch pharmakologisch relevant, weil antiepileptische Medikamente wie Vigabatrin oder auch Valproat (neben anderen Effekten) den GABA-Abbau verringern.

Um den Mechanismus dieser klinisch wichtigen Beobachtung auf zellulärer Ebene zu verstehen, haben verschiedene Arbeitsgruppen einschliesslich meiner eigenen die Wirkung einer Erhöhung der präsynaptischen Konzentration von GABA durch Applikation von Vigabatrin *in vitro* untersucht. Es hat sich gezeigt, dass nicht nur der Füllungszustand der synaptischen Vesikel erhöht war („Amplitudeneffekt“), sondern auch ein Einfluss auf die Freisetzung synaptischer Vesikel besteht („Frequenzeffekt“). Diese Experimente wurden in Hirnschnitten des Hippocampus der Ratte durchgeführt, da diese Struktur sowohl physiologisch eine hohe Plastizität aufweist als auch für die Pathogenese von Temporallappen-Epilepsien relevant ist, der häufigsten Form fokaler Epilepsien. Je nach Präparation wurde nach Applikation von Vigabatrin eine verstärkte ((6) oder eine verminderte ((16,(3) Freisetzung GABAerger Vesikel beobachtet.

Zielstellung

Ausgangspunkt für meine Arbeiten war die überraschende Beobachtung, dass eine erhöhte Konzentration von GABA nicht nur zu stärker gefüllten Vesikeln führt, sondern auch die Dynamik innerhalb des Vesikelzyklus beeinflusst. Welcher präsynaptische Mechanismus könnte diese Verbindung der Vesikeldynamik mit dem GABA-Metabolismus erklären? Kann ein Computermodell spezifische Vorhersagen für einen Einfluss der vesikulären GABA-Konzentration auf verschiedene Schritte der vesikulären Dynamik machen?

Im Modell habe ich die Möglichkeit geprüft, dass freigesetztes GABA den Nachschub weiterer GABAerger Vesikel über präsynaptische GABA-Rezeptoren modifiziert. Für das Vorliegen von ionotropen präsynaptischen GABA_A Rezeptoren im Hippocampus gab es bisher nur einzelne Hinweise. Deshalb habe ich anschliessend die Frage gestellt, ob im Hippocampus durch patch-clamp Messungen eine Rückkopplung von GABA auf seine eigene Freisetzung über präsynaptische GABA_A Rezeptoren nachweisbar ist.

Die Untersuchung der Freisetzung von Vesikeln aus präsynaptischen GABAergen Terminalen durch patch-clamp Messungen ist nur indirekt möglich. Deshalb habe ich in einer weiteren Arbeit die Frage gestellt, ob spontane (Aktionspotential-unabhängige) Vesikelfreisetzung auch im Hirnschnitt direkt durch funktionale Bildgebung mit Fluoreszenzfarbstoffen zu untersucht werden kann.

Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurden drei wesentliche Methoden angewandt: Zunächst wurden Computersimulationen benutzt, um hypothetische Zusammenhänge zwischen der Füllung und der Dynamik synaptischer Vesikel zu modellieren und experimentell prüfbare Vorhersagen zur Unterscheidung verschiedener Fälle zu machen. Anschliessend wurden einige dieser Vorhersagen durch patch-clamp Untersuchungen am akuten Hirnschnitt junger Ratten geprüft. Und schliesslich wurde eine neue Methode entwickelt, um spontane Vesikelfreisetzen (und deren Modulation über Autorezeptoren) direkt durch funktionelle Bildgebung mittels Zwei-Photonen Mikroskopie zu untersuchen.

Im Computermodell wird vereinfachend angenommen, dass synaptische Vesikel sich in drei grosse Gruppen unterscheiden lassen: Zunächst eine Population von an der präsynaptischen Membran „gedockten“ Vesikeln, von denen eines oder mehrere nach Eintreffen eines Aktionspotentials (und mit einer sehr geringen Rate auch spontan) mit der Membran verschmilzt und seinen Inhalt freisetzt. Diese Population wird auch als „RRP“ („readily releasable pool“) bezeichnet ((19)). Die Freisetzungshäufigkeit von Vesikeln hängt von der Größe des RRP ab. Der RRP erhält Nachschub aus einer zweiten, deutlich größeren Population von Reserve-Vesikeln. Diese Reservepopulation wiederum speist sich aus einer Population von leeren Vesikeln, die zuvor fusioniert haben und mit einer bestimmten Rate „recycelt“ werden. In diesem Kreislauf können sowohl die Reserve-Vesikel als auch Vesikel im RRP mit Transmitter gefüllt werden; diese Füllung hängt ab von der synaptischen Transmitterkonzentration.

Ein Zusammenhang zwischen Transmitterkonzentration und vesikulärer Freisetzungsratesetzt nun voraus, dass entweder die Freisetzungsrateselbst oder der Nachschub aus der Reservepopulation in den RRP von der Transmitterkonzentration abhängt. Das Modell besteht aus einem System von drei gekoppelten partiellen Differentialgleichungen (eine für jede Population), die soweit möglich analytisch gelöst und ansonsten numerisch durch Monte-Carlo Simulationen mit MATLAB berechnet wurden. Abbildung 1 (modifiziert nach Abb. 8 in ((1))) zeigt schematisch das Modell des präsynaptischen Vesikelzyklus sowie die Rückwirkung von GABA auf präsynaptische Autorezeptoren.

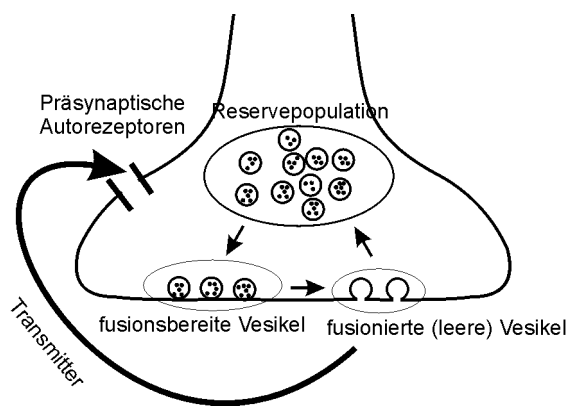


Abbildung 1: (modifiziert nach Abb. 8 in ((1)): Vesikelzyklus und Rückwirkung von GABA auf präsynaptische Autorezeptoren.

In den Patch-Clamp Messungen wurden horizontale Schnitte (200 μm) des Gehirns junger (9-14 Tage) Ratten angefertigt. Diese wurden für 30 min. in eiskalter Sucroslösung und anschliessend in Ringerlösung aufbewahrt. Messungen wurden mit einem EPC-7 Verstärker unter visueller Kontrolle mit einem aufrechten Mikroskop unter Verwendung von DIC durchgeführt. Durch die Öffnung von GABA-Rezeptoren ausgelöste Chloridströme (IPSCs, inhibitory postsynaptic currents) wurden in der whole-cell Konfiguration am Soma von Pyramidenzellen in der CA3-

Region des Hippocampus gemessen. Eingangs- und Serienwiderstand wurden regelmässig kontrolliert. Zur Auslösung von aktionspotentialabhängigen IPSCs wurde zusätzlich eine extrazelluläre Stimulationselektrode in der Nähe des Soma der gemessenen Zelle platziert. In Experimenten zur Messung einer möglichen Desensibilisierung postsynaptischer Rezeptoren wurde GABA durch hohen Druck lokal in der Nähe des Soma der gemessenen Zelle appliziert. Während der Messung von spontanen (miniature) mIPSCs wurden Aktionspotentiale durch 1 μmol Tetrodotoxin blockiert. mIPSCs wurden durch eine automatische Schwellendetektion mit Hilfe der Strathclyde Software (J. Dempster, Universität von Glasgow, Schottland) ausgewertet und anschliessend visuell nachkontrolliert. In allen Experimenten wurden glutamaterge Synapsen durch 30 μmol CNQX und 30 μmol $\pm\text{APV}$ und GABA_B Rezeptoren durch 2 μmol CGP 55845A blockiert. Für statistische Tests wurde SPSS verwendet.

Für Fluoreszenzuntersuchungen wurde durch eine hochosmolare (800 mosmol) Sucroslösung eine Fusion aller Vesikel des RRP bewirkt. Dadurch sind die Vesikelmembranen zugänglich zum Extrazellulärraum und binden an FM 1-43, das über eine Dauer von 7 min. eingewaschen wird. Anschliessend werden die Vesikel spontan re-endozytiert, so dass der Farbstoff in den vesikulären Membranen erhalten bleibt, da diese keinen Kontakt zum Extrazellulärraum mehr haben; aus allen anderen Membranen wird er anschliessend über eine Dauer von 35 min. ausgewaschen (ein Schema des Protokolls ist in Abb. 1 in ((2) gegeben). Danach habe ich während einer Dauer von 40 min. die spontane Fluoreszenzabnahme in synaptischen Terminalen gemessen. Diese Fluoreszenzabnahme kommt durch die spontane Fusion von Vesikeln mit der synaptischen Membran und nachfolgende Diffusion des Fluoreszenzfarbstoffs in den Extrazellulärraum zustande. Diese Fluoreszenzabnahme in den „regions of interest“, den synaptischen Boutons, wurde in bezug auf das allgemeine Ausbleichen der Fluoreszenz in Kontrollregionen (durchschnittlich 0.2% / min.) normiert.

Ergebnisse

Zunächst habe ich durch Computersimulationen ein Modell der Füllung und Dynamik synaptischer Vesikel aufgestellt und nach Bedingungen gesucht, unter denen die experimentell gemessenen Beziehungen zwischen präsynaptischer Transmitterkonzentration und Transmitterfreisetzung („Amplitudeneffekt“ und „Frequenzeffekt“, s.o.) reproduziert werden können.

Eine erhöhte präsynaptische Transmitterkonzentration erhöht (sofern der vesikuläre Transporter nicht gesättigt ist) die vesikuläre Transmitterkonzentration. Um einen Frequenzeffekt zu reproduzieren, ist es prinzipiell nötig anzunehmen, dass ein Schritt innerhalb des Vesikelkreislaufs vom vesikulären Füllungszustand abhängt. Dabei kann man zwei Fälle unterscheiden: (1) Die Freisetzungsrates aus der Population freisetzbarer Vesikel („RRP“ für „readily releasable pool“) hängt vom Füllungszustand der Vesikel ab; (2) der Nachschub aus dem Reservepool in den RRP hängt vom Füllungszustand der Vesikel ab. (Die Endozytose von mit der Membran fusionierten Vesikeln kann natürlich nicht von deren Füllungszustand abhängen, da sie leer sind.) Für beide Fälle habe ich numerische Simulationen unter der Annahme realistischer Parameter für die Anzahl der Vesikel, die Übergangsrates, die präsynaptische Transmitterkonzentration und deren Füllungsgeschwindigkeit in die Vesikel durchgeführt (siehe Abb. 4 in ((1)).

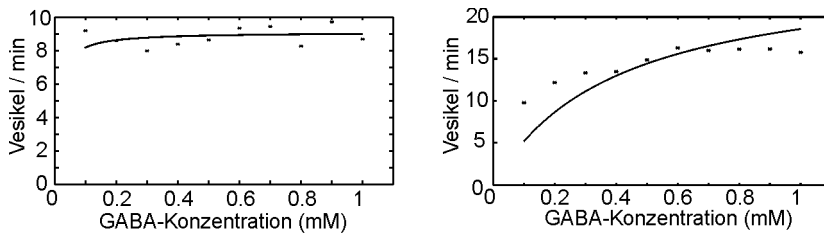


Abbildung 2: (modifiziert nach Abb. 5 in ((1)): Eine Abhängigkeit der Freisetzungsrates von der vesikulären Transmitterkonzentration (links) führt zu einer deutlich geringeren Erhöhung der Vesikelfreisetzung, wenn die GABA-Konzentration erhöht wird, als eine Abhängigkeit der Nachschubrates von der vesikulären Transmitterkonzentration (rechts).

Diese Simulationen haben ergeben, dass eine 10-fache Erhöhung der präsynaptischen Transmitterkonzentration (vermutlich mehr, als experimentell erreichbar ist) einen Frequenzeffekt von 20% für den Fall einer Abhängigkeit der Freisetzungsrates vom vesikulären Füllungszustand hat (Fall 1; s. Abb. 2 (links) in der Zusammenfassung und Abb. 5b in ((1)), jedoch einen Frequenzeffekt von 100%, falls der Nachschub in den RRP vom vesikulären Füllungszustand abhängt (Fall 2; s. Abb. 2 (rechts) in der Zusammenfassung und Abb. 5d in ((1)). Diese Ergebnisse konnten durch analytische Näherungen bestätigt werden. Sie erklären sich daraus, dass im Vesikelzyklus im Gleichgewicht (d.h. wenn die Größe der einzelnen Populationen über die Zeit konstant bleibt) der Fluss (Populationsgröße multipliziert mit Abflussrate aus der betreffenden Population) von jeder Population in die nächste gleich ist. Da die Reservepopulation sehr viel größer ist als die beiden anderen Populationen, ist die Abflussrate aus ihr entsprechend kleiner. Daher hat eine Erhöhung dieser Rate einen stärkeren Einfluss als eine Erhöhung der ohnehin höheren Abflussrate aus dem RRP. Da in Vorarbeiten (in kultivierten Hirnschnitten) ein Frequenzeffekt von ungefähr 100% gemessen worden war ((6), schliesse ich, dass vermutlich der Vesikelnachschub, und nicht nur die Vesikelfreisetzung selbst, durch den vesikulären Füllungszustand beeinflusst wird.

Wie kann diese Hypothese geprüft werden? Weder die Rate des Vesikelnachschubs noch die Freisetzungsrates können direkt gemessen werden, sondern nur der Fluss von einer Population in die nächste. Eine Erhöhung des Vesikelnachschubs führt zu einem größeren RRP, eine Erhöhung der Vesikelfreisetzung zu einem kleineren (siehe Abb. 5a und c in ((1)). Die Größe des RRP wiederum bestimmt das Maß der Kurzzeit-Depression einer Synapse: Je größer der RRP ist, desto resistenter ist die Synapse gegenüber hochfrequenter Stimulation. Ein Vergleich der Kurzzeit-Depression vor und nach Erhöhung der präsynaptischen Transmitterkonzentration kann also zeigen, ob es zu einer Erhöhung des Vesikelnachschubs oder der Freisetzungsrates gekommen ist (siehe Tafel 1 in ((1)).

Auch wenn die Simulationen im wesentlichen den Fall einer positiven Beziehung zwischen präsynaptischer Transmitterkonzentration und Vesikelfreisetzung betreffen, ist das Modell auch für den entgegengesetzten Fall anwendbar, d.h. für eine verringerte Freisetzung von volleren Vesikeln. Dies ist auch tatsächlich gemessen worden, wenn die GABA-Konzentration nicht in kultivierten, sondern in frischen Hirnschnitten erhöht wurde ((16, Abb. 5 in ((3)). Simulationen zu diesem Fall zeigen, dass weiterhin ein Effekt auf den Vesikelnachschub deutlich stärker ausgeprägt ist als auf die Freisetzungsrates, allerdings ist der Unterschied geringer.

Die zweite zentrale Fragestellung an das Modell betraf nicht den Ort, sondern den Mechanismus eines Effekts des vesikulären Füllungszustandes auf die Dynamik des Vesikelzyklus. Auch hier sind wiederum zwei Möglichkeiten denkbar: Entweder beeinflusst eine erhöhte Füllung eines Vesikels direkt den Transport dieses Vesikels (etwa durch veränderte pH-Gradienten über der Vesikelmembran oder durch eine vergrößerte Oberfläche des Vesikels), oder aber der vesikuläre Transmittergehalt wird erst freigesetzt und modifiziert dann (z.B. durch Stimulation präsynaptischer Autorezeptoren) die Dynamik nachfolgender Vesikel (siehe Abb. 8 in ((1)).

Numerische Simulationen dieser beiden Fälle führten auch hier zu unterschiedlichen, experimentell prüfbareren Vorhersagen: Da ein Effekt über präsynaptische Autorezeptoren von der vorhergehenden Freisetzung von Vesikeln abhängt, sollte er deutlich vermindert sein, wenn diese Freisetzung z.B. durch vorhergehende hochfrequente Stimulation ausfällt. Ein „direkter“ Mechanismus dagegen ist unabhängig von einer vorhergehenden Freisetzung, da er nicht von der Stimulation von Rezeptoren abhängt (siehe Tafel 1 in ((1))).

Die Aktivierung präsynaptischer GABA-Rezeptoren durch freigesetztes GABA kann experimentell dadurch nachgeahmt werden, dass man diese Rezeptoren pharmakologisch stimuliert. Da der Frequenzeffekt unter Bedingungen gemessen worden war, bei denen metabotrope GABA_B Rezeptoren blockiert waren, kommen nur ionotrope (GABA_A) Rezeptoren in Frage.

Um Veränderungen der Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel durch Aktivierung von GABA_A Rezeptoren zu messen, habe ich zunächst durch extrazelluläre Stimulation Vesikelfusionen hervorgerufen und den Effekt des freigesetzten GABA durch whole-cell patch-clamp Messungen der Somata von CA3 Pyramidenzellen gemessen. Unter Kontrollbedingungen habe ich nach Stimulation eine Antwortwahrscheinlichkeit von ca. 75% gemessen (n = 9 Zellen). Nach Aktivierung von GABA_A Rezeptoren durch Applikation von Muscimol (1 µmol, 1 min) kam es zu einer signifikanten (p < 0.01) Verringerung der Antworthäufigkeit (siehe Abb. 1 in ((3))). Dieser Effekt kann prinzipiell durch mehrere Mechanismen erklärt werden: (1) Verringerung der Freisetzungswahrscheinlichkeit an synaptischen Terminalen, (2) Shunt der axonalen Weiterleitung von Aktionspotentialen, (3) Desensibilisierung postsynaptischer GABA_A Rezeptoren.

Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, habe ich Aktionspotentiale durch TTX blockiert und unter diesen Bedingungen die Frequenz spontaner Transmitterfreisetzungen durch Messung von mIPSCs vor und nach Applikation von Muscimol bestimmt. Es zeigte sich, dass die Applikation von Muscimol zu einer deutlichen Abnahme der Frequenz der mIPSCs von $70.9 \pm 14.1/\text{min}$ auf $30.7 \pm 5.2/\text{min}$ führt (n = 12; p < 0.01; siehe Abb. 3 in der Zusammenfassung und Abb. 2a, b und d in ((3))). Dadurch ist ausgeschlossen, dass der Effekt von Muscimol auf die Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel ausschliesslich durch eine Blockade der axonalen Fortleitung von Aktionspotentialen zustande kommt.

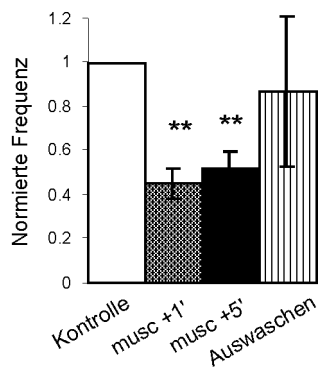


Abbildung 3: (modifiziert nach Abb. 2d aus ((3))): Verringerung der mIPSC Frequenz nach Applikation von Muscimol (1 µmol, 1 min).

Allerdings bewirkt die Applikation von Muscimol auch eine tonische Aktivierung von postsynaptischen GABA_A Rezeptoren. Diese Aktivierung führt unmittelbar nach Applikation zu einem um $47 \pm 15\%$ erhöhten Rauschen, das sensitiv auf den GABA_A Rezeptor-Antagonisten Bicucullin reagiert und nach 5 min. wieder auf Kontrollwerte zurückgekehrt ist (siehe Abb. 2f in ((3))). Zu diesem Zeitpunkt ist die Frequenz der mIPSCs jedoch weiterhin reduziert, so dass die Frequenzabnahme nicht durch eine erschwerte Detektion der mIPSCs bei erhöhtem Rauschen

erklärt werden kann (siehe Abb. 3 in der Zusammenfassung und Abb. 2d in ((3)). Tonische Aktivierung von GABA_A Rezeptoren kann prinzipiell zu Desensibilisierung führen; auch dies kann eine scheinbar verringerte Freisetzung vortäuschen. Desensibilisierung der postsynaptischen Rezeptoren würde zu einer Verringerung der mIPSC-Amplituden führen; diese waren unter meinen experimentellen Bedingungen jedoch stabil ($n = 12$, $p > 0.2$; siehe Abb. 2e, g in ((3)). Ein weiterer Test bezüglich einer möglichen Desensibilisierung sind Experimente, bei denen eine definierte Konzentration von GABA (100 μmol) lokal durch Druckluft appliziert wird; eine konstante Amplitude der Antwort spricht für eine gleichbleibende Anzahl an aktivierbaren (nicht desensibilisierten) GABA-Rezeptoren. Tatsächlich habe ich festgestellt, dass vor und nach der Applikation von Muscimol die Amplitude der Antwort auf Applikationen von GABA konstant ist ($n = 5$, $p > 0.05$; siehe Abb. 3 in ((3)).

In einer abschliessenden Reihe von Experimenten habe ich substanzspezifische Effekte von Muscimol durch Applikation eines anderen GABA_A Rezeptor-Agonisten, Isoguvacine, ausgeschlossen. Applikation von 10 μmol Isoguvacine für 10 min bewirkt ebenfalls eine signifikante Verringerung der mIPSC-Frequenz um 69% ($n = 5$, $p < 0.05$; siehe Abbildung 4 in ((3)).

Damit habe ich deutliche Hinweise darauf, dass freigesetztes GABA durch Aktivierung von präsynaptischen GABA_A Rezeptoren eine negative Rückkopplung auf die weitere Freisetzung GABAerger Vesikel ausübt. Ein prinzipielles Problem der bisherigen Messungen ist jedoch, dass die Freisetzung von Vesikeln nie direkt, sondern stets nur über den Effekt des vesikulären Transmitters auf postsynaptische Zellen gemessen werden konnte. Darüberhinaus ist sogar derselbe Rezeptortyp, nämlich GABA_A Rezeptoren, nicht nur für die vermutete negative Rückkopplung an der Präsynapse verantwortlich, sondern dient auch an der postsynaptischen Seite zur Detektion der Transmitter-Freisetzungen (als mIPSCs). Jede Beeinflussung der präsynaptischen GABA_A Rezeptoren modifiziert damit zugleich die postsynaptischen GABA_A Rezeptoren. Daher habe ich nach einer Methode zur direkten Messung von präsynaptischen Vesikelfusionen gesucht. Es ist bekannt, dass Fluoreszenzfarbstoffe wie FM 1-43 in Verbindung mit konfokaler oder Zwei-Photonen Mikroskopie benutzt werden können, um in Hirnschnitten Vesikelfusionen während extrazellulärer Stimulation zu messen ((13),(18),(22)). Bisher wurde jedoch noch nie der Versuch unternommen, spontane Vesikelfreisetzungen in Hirnschnitten zu messen. Unter Verwendung des Protokolls von Stanton et al. 2001 ((22)) gelang dies ((2)). Zuerst habe ich gezeigt, dass der Effekt von Muscimol auf die vesikuläre GABA-Freisetzung auch unter Bedingungen einer erhöhten extrazellulären K⁺-Konzentration besteht, was tatsächlich der Fall war (siehe Abb. 2 in ((2)). Eine erhöhte K⁺-Konzentration bewirkt (bei Blockade von Natriumkanälen durch 1 μmol TTX) eine erhöhte vesikuläre Freisetzung, welche es erleichtert, Effekte auf diese Freisetzung zu detektieren. Unter dieser Bedingung habe ich die Fluoreszenzabnahme von FM 1-43 gemessen, was spontanen Vesikelfreisetzungen entspricht. In ACSF mit einer K⁺-Konzentration von 3 mM (Kontrolle) betrug die Fluoreszenzabnahme (normiert für unspezifisches Ausbleichen) $2.55 \pm 1.8\%/10$ min, während sie in ACSF mit einer erhöhten K⁺-Konzentration von 15 mM auf $4.64 \pm 1.0\%/10$ min erhöht war. Über eine Versuchsdauer von 40 min. kam es im ACSF mit erhöhter K⁺-Konzentration von 15 mM zu einer nahezu linearen Abnahme der Fluoreszenz um insgesamt ca. 20%. Applikation von 1 μmol Muscimol über 10 min. verringerte diese Abnahme signifikant um 58% (jeweils $n = 6$ Hirnschnitte unter Kontrollbedingungen und in Experimenten mit Muscimol-Applikation, pro Hirnschnitt ca. 13 regions of interest, $p < 0.05$; siehe Abb. 4 und Abb. 3 in ((2)).

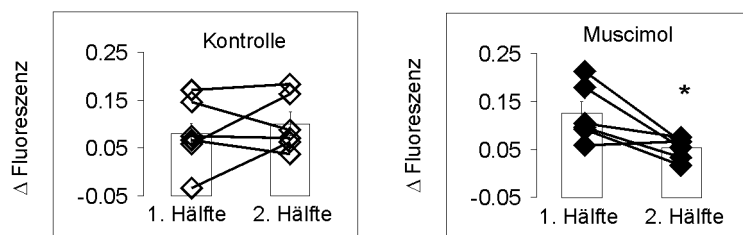


Abbildung 4: (modifiziert nach Abb. 3 in ((2)): Konstante Fluoreszenzabnahme unter Kontrollbedingungen (links), signifikant verringerte Fluoreszenzabnahme nach Applikation von Muscimol (rechts).

Ein Nachteil der Fluoreszenzmessungen besteht darin, dass FM 1-43 sowohl an GABAerge als auch an glutamaterge Vesikel bindet. Aus früheren Arbeiten ist jedoch bekannt, dass GABAerge Vesikel näher am Soma als glutamaterge Vesikel gelegen sind und dass GABAerge Vesikel mit einer höheren Rate spontan fusionieren ((21)). Die oben erwähnten Daten betreffen daher nur perisomatische synaptische Terminale bis zu einer Distanz von ca. 50 μm vom Soma in der Pyramidenzellschicht. Eine Analyse von distaleren synaptischen Terminalen ergab, dass diese eine signifikant geringere Fluoreszenzabnahme von lediglich ca. 10% in 40 min. zeigten ($n = 12$, $p < 0.05$; Abb. 4 in ((2)); darüberhinaus wurde ihre Fluoreszenzabnahme nicht durch Applikation von Muscimol beeinflusst ($n = 6$, $p > 0.5$). Diese Daten weisen darauf hin, dass präsynaptische GABA_A Rezeptoren tatsächlich spezifisch an GABAergen Synapsen lokalisiert sind.

Diskussion

Variationen der Konzentration von Transmittern stellen einen relativ neuen Mechanismus der Veränderung synaptischer Übertragung dar. Dieser könnte an einer Reihe von unterschiedlichen Synapsen sowohl unter pathologischen Bedingungen ((7),(9) als auch im Rahmen physiologischer synaptischer Plastizität ((11),(8) eine Rolle spielen. Der zelluläre Mechanismus dieses Effektes ist aber in vielen Systemen noch unbekannt. Im Rahmen meiner Dissertation habe ich diesen an GABAergen Synapsen der CA3-Region des Hippocampus untersucht.

Im Computermodell habe ich geprüft, unter welchen Bedingungen ein Zusammenhang zwischen präsynaptischer Transmitterkonzentration und Frequenz der Vesikelfreisetzung reproduziert werden kann. Dabei haben Simulationen gezeigt, dass ein solcher Effekt vermutlich nicht ausschliesslich auf die Freisetzungsrates aus dem RRP, sondern auch auf den Nachschub in diese Population wirkt. Dieses überraschende Ergebnis ergibt sich daraus, dass in jedem Gleichgewichtsmodell der Transmitterdynamik, in dem der Fluss zwischen den Populationen durch das Produkt aus der Anzahl von Vesikeln in der Population und der Übergangsrate in die nächste Population gegeben ist, Veränderungen der langsamsten Rate limitierend für den Gesamtzyklus sind.

Im Modell ergibt sich nach Erhöhung der Freisetzungsrates um den Faktor 10 bereits eine deutliche Verringerung der Größe des RRP. Dies scheint Arbeiten zu widersprechen, die zeigen, dass insbesondere inhibitorische Synapsen relativ resistent gegenüber Kurzzeit-Depression sind ((10). Darüberhinaus können synaptische Vesikel unter Ruhebedingungen mit einer sehr geringen Frequenz, nach Stimulation dagegen mit einer um mehrere Größenordnungen höheren Frequenz freigesetzt werden; dies ist im Modell mit isolierten Änderungen der Freisetzungsrates nicht zu erreichen. Falls jedoch die Übergangsrates zwischen Vesikelpopulationen gekoppelt sind (und sich damit gleichsinnig verändern können), kann der Fluss von Vesikeln zwischen den Populationen stark variieren, ohne dass sich die Größen dieser Populationen deutlich ändern. Eine solche Kopplung ist mechanistisch z.B. dadurch erklärbar, dass sowohl die Freisetzungsrates als auch der Nachschub in den RRP von Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

abhängt ((24),(28). Im Modell lässt sich eine solche Kopplung auch dadurch erreichen, dass eine beschränkte Kapazität des RRP angenommen wird ((25); mechanistisch könnte z.B. die Anzahl möglicher „Andockstellen“ im RRP begrenzt sein.

Ein im Computermodell simulierter Mechanismus für den Zusammenhang zwischen Transmitterkonzentration und Vesikelfreisetzung ist, dass freigesetzter Transmitter auf ionotrope Autorezeptoren zurückwirkt. In einer Reihe von Systemen konnte gezeigt werden, dass präsynaptische ionotrope Rezeptoren die Transmitterfreisetzung beeinflussen (für einen review s. ((14)). Präsynaptische ionotrope GABA Rezeptoren sind bisher im Kleinhirn ((17) und in der Retina ((12),(15) nachgewiesen worden. Für ein Vorliegen an glutamatergen ((23) und GABAergen ((27) Synapsen im Hippocampus gab es bisher nur indirekte Hinweise. In patch-clamp Untersuchungen von CA3 Pyramidenzellen habe ich Hinweise darauf gefunden, dass präsynaptische GABA_A Rezeptoren an GABAergen Terminalen in der Region CA3 des Hippocampus exprimiert sind und eine negative Rückkopplung auf die Freisetzung von Transmitter ausüben.

Eine solche negative Rückkopplung wäre vereinbar mit einer Hyperpolarisation der präsynaptischen Membran nach Öffnung GABA_A Rezeptor-assoziiierter Chloridkanäle. Aktivierung präsynaptischer GABA_A Rezeptoren führt im Kleinhirn zu einer Depolarisierung der präsynaptischen Membran ((17), in der Retina zu einer Faszilitierung der Freisetzung GABAerger Vesikel ((12). Die Richtung der Rückwirkung scheint also in verschiedenen Systemen unterschiedlich zu sein. Mögliche Erklärungen dafür könnten ein variables Membranpotential ((5) und ein variabler Chloridgradient sein. Unterschiedliche Richtungen der präsynaptischen Rückkopplung könnten auch erklären, dass eine erhöhte präsynaptische GABA-Konzentration in kultivierten Hippocampusschnitten zu einer Erhöhung ((6), in akuten Hirnschnitten dagegen zu einer Verminderung ((16),(3) der mIPSC-Frequenz führt. Funktionell kann es sich also sowohl um eine positive als auch um eine negative Rückkopplung handeln.

Zur Überprüfung der elektrophysiologischen Ergebnisse habe ich Fluoreszenzmessungen mit FM 1-43 durchgeführt. Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass durch Verwendung von konfokaler ((13),(18) oder Zwei-Photonen Mikroskopie ((22) bildgebende Untersuchungen der aktionspotentialabhängigen Vesikelfreisetzung in akuten Hirnschnitten möglich ist. Die Messung von spontaner Freisetzung (während Blockade von Aktionspotentialen) erfordert relativ lange Messzeiten (deutlich > 1h), während derer horizontale und insbesondere vertikale Drift minimiert werden müssen. Ich konnte zeigen, dass diese Erfordernisse tatsächlich erfüllt werden können. Eine direkte Messung spontaner synaptischer Freisetzung stellt ein geeignetes Mass für die Stärke synaptischer Übertragung in einer Vielzahl von experimentellen Paradigmen dar; insbesondere auch für die Untersuchung humaner Resektate von Patienten mit Temporallappenepilepsie könnte diese neue Methode von Interesse sein. Durch Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration wurde dabei die Frequenz von Vesikelfusionen erhöht und damit die Detektierbarkeit von Vesikelfusionen verbessert. Eine solche Erhöhung der K⁺-Konzentration scheint dabei nicht nur die Freisetzungsrates zu erhöhen, sondern auch den Nachschub von Vesikeln aus der Reservepopulation, da nur in diesem Fall in den Computersimulationen ein persistierender Effekt auf die Frequenz von Vesikelfusionen besteht. Dies könnte mechanistisch dadurch erklärt werden, dass eine Erhöhung der K⁺-Konzentration zu einer Depolarisierung der präsynaptischen Membran und dadurch zu Ca²⁺-Einstrom führt, was sowohl die Freisetzungsrates als auch den Nachschub in den RRP erhöht (siehe die oben erwähnte Kopplung zwischen diesen Raten).

Die bildgebenden Untersuchungen konnten das elektrophysiologisch gemessene Resultat qualitativ bestätigen. Obwohl beide Methoden auf dem gleichen zugrundeliegenden Mechanismus beruhen, nämlich der Fusion synaptischer Vesikel und deren nachfolgender Freisetzung von Transmitter, ist ein direkter Vergleich aus zwei Gründen problematisch. Erstens setzen fusionierte Vesikel nicht die Gesamtmenge des gebundenen Farbstoffs frei ((20), so dass

die Fluoreszenzabnahme zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Fusionsrate führen kann. Zweitens stammen elektrophysiologisch gemessene mIPSCs von einer unbekanntem Anzahl von Synapsen, die auf die untersuchte Zelle konvergieren.

Antiepileptika wie Vigabatrin oder auch Valproat (hier neben anderen Wirkungen) erhöhen die präsynaptische GABA-Konzentration. Klinisch ist aber bekannt, dass beide Pharmaka gelegentlich unwirksam sind (Pharmakoresistenz) oder sogar zu einer Verschlechterung der Anfallshäufigkeit und –dauer führen (paradoxe Wirkung). Die vorliegenden Ergebnisse könnten eine Erklärung für diese Phänomene darstellen: Eine Erhöhung der GABA-Konzentration kann gegenläufige Effekte auf die Vesikelfüllung und die Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel ausüben. Je nachdem, welcher dieser beiden Parameter für die Ausbildung epileptischer Aktivität wichtiger ist, können damit sowohl antiepileptische als auch epileptogene Effekte auftreten.

Die bisher dargestellten Ergebnisse haben sich auf die präsynaptische Kontrolle der synaptischen Inhibition konzentriert. Die Erregbarkeit von Neuronen wird jedoch nicht nur durch inhibitorische Synapsen vermindert, sondern auch durch spezifische intrinsische Leitfähigkeiten der postsynaptischen Zelle, die das Auftreten von Aktionspotentialen verhindern. Eine wesentliche Rolle spielen dabei hyperpolarisierende Auswärtswärtsströme, die häufig durch Kaliumströme vermittelt sind. In einer weiteren Arbeit, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Richard Miles entstanden ist, habe ich mich mit der Rolle von Kaliumströmen für die neuronale Aktivität von Pyramidenzellen in der CA1-Region des Hippocampus beschäftigt ((4)). Ein wesentliches Ergebnis war, dass Aktionspotentiale in diesen Zellen nur dann mit einer hohen zeitlichen Präzision ausgelöst werden, wenn eine ausreichende Aktivierung von Kaliumströmen das Zeitfenster für das Auftreten von Aktionspotentialen festlegt. Wenn dagegen die im Soma integrierten synaptischen Eingänge eine zu geringe Amplitude haben (< 5 mV), kann zwar ebenfalls ein Aktionspotential ausgelöst werden, jedoch mit einer sehr geringen zeitlichen Präzision. Epileptische Aktivität ist häufig durch eine pathologische Übersynchronisierung von Zellverbänden gekennzeichnet. Daher kann spekuliert werden, dass eine geringe Präzision von Aktionspotentialen ein Mechanismus ist, um das Auftreten pathologischer Rhythmen zu verhindern.

Referenzen

- (1) Axmacher N, Stemmler M, Engel D, Draguhn A, Ritz R. Transmitter metabolism as a mechanism of synaptic plasticity: a modeling study. *J Neurophysiol* 2004, *91*, 25-39.
- (2) Axmacher N, Winterer J, Stanton PK, Draguhn A und Müller W. Two-photon imaging of spontaneous vesicular release in acute brain slices and its modulation by presynaptic GABA(A) receptors. *Neuroimage* 2004, *22*, 1014-1021.
- (3) Axmacher N und Draguhn A. Inhibition of GABA release by presynaptic ionotropic GABA receptors in hippocampal CA3. *Neuroreport* 2004, *15*, 329-334.
- (4) Axmacher N und Miles R. Intrinsic cellular currents and the temporal precision of EPSP-action potential coupling in CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 2004, *16*, 713-725.
- (5) Chavas J und Marty A. Coexistence of excitatory and inhibitory GABA synapses in the cerebellar interneuron network. *J Neurosci* 2003, *23*, 2019-2031.
- (6) Engel D, Pahner I, Schulze K, Frahm C, Jarry H, Ahnert-Hilger G und Draguhn A. Plasticity of rat central inhibitory synapses through GABA metabolism. *J Physiol* 2001, *535*, 473-482.
- (7) Esclapez M, Houser CR. Up-regulation of GAD65 and GAD67 in remaining hippocampal GABA neurons in a model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 1999, *412*, 488-505.
- (8) Fagiolini M, Hensch TK. Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature* 2000, *404*, 183-186.

- (9) Feldblum S, Ackermann RF, Tobin AJ. Long-term increase of glutamate decarboxylase mRNA in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neuron* 1990, 5, 361-371.
- (10) Galarreta M, Hestrin S. Frequency-dependent synaptic depression and the balance of excitation and inhibition in the neocortex. *Nat Neurosci* 1998, 1, 587-594.
- (11) Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash SF. Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science* 1998, 282, 1504-1508.
- (12) Kamermans M, Werblin F. GABA-mediated positive autofeedback loop controls horizontal cell kinetics in tiger salamander retina. *J Neurosci* 1992, 12, 2451-2463.
- (13) Kay AR, Alfonso A, Alford S, Cline HT, Holgado AM, Sakmann B, Snitsarev VA, Stricker TP, Takahashi M, Wu LG. Imaging synaptic activity in intact brain and slices with FM1-43 in *C. elegans*, lamprey, and rat. *Neuron* 1999, 24, 809-817.
- (14) MacDermott AB, Role LW, Siegelbaum SA. Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu Rev Neurosci* 1999, 22, 443-485.
- (15) Matthews G, Ayoub GS, Heidelberger R. Presynaptic inhibition by GABA is mediated via two distinct GABA receptors with novel pharmacology. *J Neurosci* 1994, 14, 1079-1090.
- (16) Overstreet LS, Westbrook GL. Paradoxical reduction of synaptic inhibition by vigabatrin. *J Neurophysiol* 2001, 86, 596-603.
- (17) Pouzat C, Marty A. Somatic recording of GABAergic autoreceptor current in cerebellar stellate and basket cells. *J Neurosci* 1999, 19, 1675-1690.
- (18) Pyle JL, Kavalali ET, Choi S, Tsien RW. Visualization of synaptic activity in hippocampal slices with FM1-43 enabled by fluorescence quenching. *Neuron* 1999, 24, 803-808.
- (19) Rosenmund C, Stevens CF. Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 1996, 16, 1197-1207.
- (20) Sara Y, Mozhayeva MG, Liu X, Kavalali ET. Fast vesicle recycling supports neurotransmission during sustained stimulation at hippocampal synapses. *J Neurosci* 2002, 22, 1608-1617.
- (21) Soltesz I, Smetters DK, Mody I. Tonic inhibition originates from synapses close to the soma. *Neuron* 1995, 14, 1273-1283.
- (22) Stanton PK, Heinemann U, Müller W. FM1-43 imaging reveals cGMP-dependent long-term depression of presynaptic transmitter release. *J Neurosci* 2001, 21, RC167.
- (23) Stasheff SF, Mott DD, Wilson WA. Axon terminal hyperexcitability associated with epileptogenesis in vitro. II. Pharmacological regulation by NMDA and GABAA receptors. *J Neurophysiol* 1993, 70, 976-984.
- (24) Stevens CF, Wesseling JF. Activity-dependent modulation of the rate at which synaptic vesicles become available to undergo exocytosis. *Neuron* 1998, 21, 415-424.
- (25) Stevens CF, Wesseling JF. Identification of a novel process limiting the rate of synaptic vesicle cycling at hippocampal synapses. *Neuron* 1999, 24, 1017-1028.
- (26) Sulzer D, Pothos EN. Regulation of quantal size by presynaptic mechanisms. *Rev Neurosci* 2000, 11, 159-212.
- (27) Vautrin J, Schaffner AE, Barker JL. Fast presynaptic GABAA receptor-mediated Cl⁻ conductance in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* 1994, 479, 53-63.
- (28) Wang LY, Kaczmarek LK. High-frequency firing helps replenish the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Nature* 1998, 394, 384-388.