

Chrysovalandis Schwale
Dr. med.

Auswirkungen eines KCC2-Knockdown auf die Entwicklung glyzinerger und GABAerger Synapsen in primären Rückenmarksneuronen der Ratte

Fach/Einrichtung: *Physiologie*

Doktorvater: Prof. Dr. med. Andreas Draguhn

Die wichtigsten hemmenden Transmitter des ZNS sind GABA und Glyzin, die Ihre synaptische Hemmung über ligandengesteuerte Chlorid-Ionenkanäle vermitteln. Der Kalium-2Chlorid-Kotransporter 2 (KCC2) ist ein Schlüsselmolekül für die Chlorid-Ionenhomöostase in Neuronen. Es senkt $[Cl^-]_i$ auf Werte, die das Gleichgewichtspotential von Chlorid-Ionen auf negativere Werte als das Ruhemembranpotential der Nervenzelle halten. Dies ist die Voraussetzung für die Entstehung von hyperpolarisierenden Chlorid-Ionenströmen. Daher hängt die inhibitorische Effizienz von GABA_A- und Glyzin Rezeptoren entscheidend von der Expression des KCC2-Kotransporters ab. In der jüngeren Vergangenheit wurden jedoch weitere Funktionen des KCC2 Moleküls beschrieben, wonach es als Strukturprotein an der Ausbildung dendritischer Dornen beteiligt ist und Einfluss auf die dortigen Glutamat-Rezeptoren nimmt.

In dieser Arbeit wurden Auswirkungen eines KCC2 Knockdowns auf die inhibitorische Synapse in primären Spinalneuronen der Ratte mit Hilfe von Miniatur inhibitorischen postsynaptische Strömen (mIPSCs) untersucht. Eine Gruppe war mit einem Lentivirus-shRNA-Konstrukt infiziert, das die KCC2 Expression auf 20% der Konzentration von Kontrollneuronen reduzierte. In der anderen Gruppe lag das shRNA-Konstrukt in einer inaktivierten Form vor und diente als Kontrolle. Die Experimente wurden an Tag 14-16 in vitro durchgeführt, da Spinalneurone der Ratte zu diesem Zeitpunkt KCC2 bereits exprimieren. Zunächst wurden gemischt GABA_Aerge und glyzinerge mIPSCs gemessen. Anschließend wurden GABA_Aerge und glyzinerge mIPSCs isoliert voneinander untersucht. Dazu wurde der GABA_A-Rezeptorantagonist Gabazin bzw. der Glyzin-Rezeptorantagonist Strychnin appliziert. Ausgewertet wurden jeweils Amplituden- und Frequenzwerte sowie die Abklingkinetik der Ströme. Als Ergebnis zeigte sich eine deutliche Beeinflussung der glyzinergen synaptischen Übertragung in Form von reduzierten Frequenz- und Amplitudenwerten in Folge des KCC2 Knockdown. Die GABA_Aerge synaptische Übertragung hingegen wies zwischen Knockdown und Kontrollzellen keinerlei Unterschied auf.

In einem Zweiten experimentellen Schritt wurde die funktionelle Auswirkung des KCC2 Knockdown auf die Polarität der Chlorid-Ionenströme kontrolliert. Mit Hilfe des Calcium-Imaging Verfahrens wurden nach Applikation von GABA Calcium-Ioneneinströme in KCC2 Knockdown Neuronen gemessen. Dies war ein Hinweis für eine depolarisierende GABA-Antwort.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen neuen, bisher nicht beschriebenen Zusammenhang zwischen dem KCC2 und der glyzinergen synaptischen Übertragung. Dabei deuten die Daten auf eine unterschiedliche postsynaptische Organisation von GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren in primären Spinalneuronen der Ratte hin.