

Simone Velte
Dr. med.

Spontane GABA_A-Rezeptoraktivität und calciumabhängige Kaliumleitfähigkeit in der Substantia nigra pars reticulata in Hirnschnitten von Nagern

Geboren am 19.04.1981 in Kronberg/Taunus
Staatsexamen am 04.11.2008 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Physiologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Ulrich Misgeld

Der Großteil der synaptischen Eingänge zu den GABAergen Neuronen der Substantia nigra pars reticulata (SNr) ist inhibitorisch und wirkt über GABA_A-Rezeptoren. Untersuchungen *in vivo* zeigten, dass diese Neurone einer permanenten GABA_A-Rezeptor-vermittelten Hemmung durch diese Eingänge unterliegen. *In vitro* konnte bisher jedoch keine eindeutige Aussage bezüglich der Auswirkungen der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Hemmung auf die Entladung der GABAergen Neurone der SNr getroffen werden. Dabei unterscheidet sich ihr Entladungsverhalten *in vivo* und *in vitro*, was auf die fehlenden synaptischen Eingänge *in vitro* zurückgeführt wird. Trotzdem können in Hirnschnitten spontane, zufällig auftretende GABA_A-Rezeptor-vermittelte IPSCs abgeleitet werden.

Ich untersuchte die Auswirkungen einer Blockade dieser GABA_A-Rezeptor-vermittelten Hemmung auf das Entladungsverhalten und auf SK-Kanal-vermittelte „outward current pulses“ (OCPs) in GABAergen Neuronen der SNr in Mittelhirnschnitten. Dabei konnte ich die GABAergen Neurone anhand ihrer Lokalisation und elektrophysiologischen Eigenschaften identifizieren. Ich verwendete die „Perforated Patch Clamp“-Methode, um die intrazelluläre Homöostase möglichst wenig zu stören und die Entladung der Neurone, sowie OCPs und sIPSCs zu untersuchen. Exzitatorische Einflüsse wurden durch Glutamaterezeptorantagonisten blockiert.

Die Blockade von GABA_A-Rezeptoren in GABAergen Neuronen der SNr hat zwei entgegengesetzte Auswirkungen auf die Entladung, nämlich sowohl eine Verminderung als auch eine Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz. Da sich diese beiden Prozesse überlagern, sind die Nettoeffekte der Blockade spontaner GABA_A-Rezeptor-vermittelter Hemmung auf die Entladung variabel. Eine Erhöhung der Entladungsfrequenz ist bei der Verwendung hoher Konzentrationen des GABA_A-Rezeptorantagonisten Picrotoxin (100 µM) oder wenn zuvor die SK-Kanäle mit Apamin (0,03 µM) blockiert wurden. Alle eingesetzten Konzentrationen der beiden GABA_A-Rezeptorantagonisten Gabazin und Picrotoxin führen vor der Erhöhung der Entladungsfrequenz zu ihrer transienten Verminderung. Die Erniedrigung der Entladungsfrequenz ist abhängig von intrazellulärer Calciumfreisetzung und einer Zunahme der SK-Kanalaktivität, denn sie kann durch eine Entleerung der Calciumspeicher mit Ryanodin (10 µM) und die Blockade der SK-Kanäle mit Apamin (0,03 µM) aufgehoben werden.

Sogar die Blockade einer Untergruppe der GABA_A-Rezeptoren reicht aus, um SK-Kanäle zu aktivieren, denn Picrotoxin (1 µM) ruft auch in Gabazin (1 µM) eine transiente Hemmung der Entladung hervor, reicht aber nicht aus um sIPSCs zu blockieren. Dass es sich um einen spezifisch durch GABA_A-Rezeptoren vermittelten Prozess und nicht um indirekte Auswirkungen der GABA_A-Rezeptorblockade handelt, wird anhand der Verminderung der SK-Kanalaktivität durch eine GABA_A-Rezeptorstimulation mit Muscimol (0,1-1 µM) und der Potenzierung von OCPs durch den GABA_A-Rezeptorantagonismus trotz der Blockade aktionspotential-abhängiger, synaptischer Transmission mit TTX (0,3 µM) belegt. Da OCPs in 1-EBIO (200 µM) durch die GABA_A-Rezeptorblockade potenziert werden, kann eine

direkte Interaktion zwischen dem GABA_A-Rezeptor und dem Calciumsensor des SK-Kanals ausgeschlossen werden.

Die Potenzierung von OCPs durch die GABA_A-Rezeptorblockade kann unabhängig vom Strom durch den GABA_A-Rezeptor, der mithilfe einer Erhöhung der intrazellulären Chloridionenkonzentration umgekehrt werden konnte, herbeigeführt werden. Ich gehe daher davon aus, dass die „Kurzschlusshemmung“ aufgrund der Widerstandserhöhung der Zellmembran durch die Rezeptorblockade und nicht eine Depolarisation die Ryanodinrezeptor-vermittelte Calciumfreisetzung auslöst. Der Calciumeinstrom durch spannungsgesteuerte Calciumkanäle könnte der Auslöser für eine calciumabhängige Calciumfreisetzung sein. Obwohl OCPs durch die Blockade unterschiedlicher spannungsgesteuerter Calciumkanäle mit Nickel (50-100 µM) und Cadmium (20-50 µM) signifikant vermindert werden, kann die Frequenzreduktion durch die GABA_A-Rezeptorblockade mit Nickel nicht aufgehoben werden. Dies spricht gegen eine exklusive Rolle von T-Typ-Calciumkanälen bei der Aktivierung des Ryanodinrezeptors durch die GABA_A-Rezeptorblockade. Meine Ergebnisse sprechen dafür, dass der Ryanodinrezeptor einer massiven Verstärkung eines kleinen, initialen Calciumsignals dient. Daher kann dieses zu gering sein, als dass es mit den von mir verwendeten Methoden messbar ist.

Die Blockade der spontanen GABA_A-Rezeptor-vermittelten Hemmung führt *in vitro* zu einer Ryanodinrezeptor-vermittelten Calciumfreisetzung, wodurch OCPs potenziert werden und die spontane Entladungsaktivität der Neurone durch die hyperpolarisierende SK-Kanalaktivität gehemmt wird. Auch *in vivo* könnte die Zunahme der SK-Kanalaktivität die exzitatorische Wirkung von GABA_A-Rezeptorantagonisten vermindern. Somatodendritische Transmitterfreisetzung aus nigralen Neuronen hängt von intrazellulärer Calciumfreisetzung ab. GABA_A-Rezeptor-vermittelte Hemmung könnte so die Endocannabinoidfreisetzung von GABAergen Neuronen der SNr aus Somata und Dendriten regulieren.