

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. Jürgen Daut



Rezeptorinduzierte PI(4,5)P₂-Dynamik in hippocampalen CA1-Pyramidenneuronen

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sandra Hackelberg

aus Düsseldorf

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
29.8.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Dominik Oliver

1. Korreferent: Prof. Dr. Timothy David Plant

Zusammenfassung

Das Plasmamembranlipid Phosphatidylinositol(4,5)biphosphat (PIP₂) ist an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Die Dynamik der PIP₂-Konzentration in lebenden Zellen in ihrer nativen Umgebung ist bislang allerdings weitgehend unerforscht. Die Kenntnis der PIP₂-Dynamik in nativen Zellen ist jedoch eine wesentliche Voraussetzung, um die physiologische Funktion von PIP₂ verstehen zu können. Seit wenigen Jahren ermöglicht die Entwicklung von PIP₂-Sensoren aus PIP₂-bindenden Domänen und fluoreszierenden Proteinen die optische Messung der PIP₂-Dynamik in lebenden Zellen.

In heterologen Expressionssystemen und isolierten Neuronen ist bereits gezeigt worden, dass die Aktivierung von Gα_q-gekoppelten Rezeptoren die Konzentration von PIP₂ in der Plasmamembran reduzieren kann. Diese Reduktion führt zu einer Verminderung von Lipid-Proteininteraktionen und als Konsequenz zu einer Modulation der Aktivität oder Lokalisation PIP₂-abhängiger Proteine (Effektoren). In Neuronen führt diese Depletion von PIP₂ nach derzeitigen Modellvorstellungen u.a. zur Regulation verschiedener Ionenkanäle und damit zu einer Modulation der elektrischen Erregbarkeit der Zellen.

In dieser Arbeit habe ich mit Hilfe konfokaler Mikroskopie der PIP₂-abhängigen Membranlokalisation der Tubby-Domäne die Gα_q-induzierte PIP₂-Dynamik *in situ* in hippocampalen CA1-Pyramidenneuronen in akuten Hirnschnitten charakterisiert. Vergleichende Messungen der Translokation der PIP₂- und potentiell IP₃-sensitiven PLCδ1-PH-Domäne zeigten einen ähnlichen Verlauf im Vergleich zu Tubby, wiesen aber insbesondere bei starken Translokationen eine langsamere Regeneration auf. Pharmakologische Aktivierung Gα_q-gekoppelter muskarinischer Acetylcholinrezeptoren (mAChR) und metabotroper Glutamaterezeptoren (mGluR) führten zur robusten PIP₂-Depletion. Die Amplitude der mAChR-induzierten PIP₂-Depletion war signifikant größer als die der Typ-I mGluR-induzierten Depletion. Der Unterschied zwischen den Amplituden war in dem apikalen Hauptdendriten stärker ausgeprägt als im Soma. Bei beiden Rezeptoren zeigte die PIP₂-Dynamik im Mittel einen phasisch-tonischen Verlauf. Die Desensibilisierung der PIP₂-Depletion war bei Aktivierung von mAChR stärker ausgeprägt. Darüber hinaus zeigen die Daten erstmals, dass die Aktivierung Gα_q-gekoppelter Rezeptoren auch eine Oszillation der PIP₂-Konzentration in der Plasmamembran bewirken kann. Die mAChR- und mGluRI-induzierten Oszillationen zeigen außerdem, dass Neurone zu einer rapiden PIP₂-Regeneration während andauernder Anwesenheit der Agonisten fähig sind. Die Applikation von Agonisten weiterer Gα_q-gekoppelter Rezeptoren induzierte im Soma und apikalen Hauptdendriten keine PIP₂-Dynamik.

Insgesamt unterstützen die Daten eine physiologische Funktion der PIP₂-Dynamik in Neuronen und korrelieren gut mit dem allgemeinen Verlauf von elektrophysiologischen Antworten der Zellen auf die Agonisten. Eine physiologische Funktion der PIP₂-Dynamik wird weiter von Ergebnissen aus elektrischen Stimulationen im Bereich afferenter Fasern im *Str. oriens* unterstützt. Die Daten deuten auf eine synaptisch induzierbare PIP₂-Depletion hin, die Pharmakologie der Effekte muss aber noch näher untersucht werden. Wie Daten aus *Gyrus dentatus* Körnerzellen zeigen, ist die Gα_q-induzierte PIP₂-Dynamik nicht nur rezeptor-, sondern auch neuronentypspezifisch, denn hier induzierten mAChR- und mGluR-Agonisten keine messbare PIP₂-Depletion.

Abstract

The membrane lipid phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate (PIP₂) regulates many cellular processes. Yet the dynamics of PIP₂ concentration changes in living cells in their native environment are virtually unknown. However, knowledge of these dynamics is prerequisite to understanding the physiological functions of PIP₂. Recent development of PIP₂-probes made of PIP₂-binding domains and fluorescent proteins has enabled optical measurements of PIP₂ dynamics in living cells.

Previous studies in heterologous expression systems and isolated neurons showed that activation of Gα_q coupled receptors can deplete the PIP₂ content in the plasma membrane. This PIP₂ reduction results in a decrease of lipid-protein interactions and consequently to a modulation of the activity and localization of PIP₂-sensitive proteins (effectors). In neurons, PIP₂ depletion is thought to modulate various ion channels and thus electric excitability.

In this study, I have characterized the Gα_q-induced PIP₂ depletion in CA1 hippocampal neurons *in situ* in acute brain slices. Measurement of PIP₂ dynamics was achieved by means of confocal microscopy of PIP₂ dependent membrane association of the tubby domain. Comparative measurements of PIP₂- and potentially IP₃-sensitive PLCδ1-PH domain translocation largely resembled the tubby data but showed a slower recovery especially upon strong translocation. Pharmacological activation of both muscarinic acetylcholine (mACh) and metabotropic glutamate (mGlu) receptors (R) induced a robust depletion of PIP₂. The amplitude of mAChR induced PIP₂ depletion was significantly larger compared to mGluR (type I). This difference in amplitudes was more pronounced in the main apical dendrite compared to the soma. The average time course of PIP₂ dynamics was similar for both receptors and showed an initial peak and a lower plateau phase, revealing

desensitization. The phasic-tonic time course according to desensitization was more pronounced for mAChR activation. Furthermore, the data obtained here show for the first time that in some neurons $G\alpha_q$ coupled receptor activation induces oscillations of membrane PIP_2 concentrations. Moreover, oscillations demonstrate that neurons can rapidly recover PIP_2 during prolonged presence of agonists. Application of other $G\alpha_q$ coupled receptor agonists did not induce a measurable PIP_2 depletion in soma and main apical dendrite.

Taken together the results support a physiological function of PIP_2 dynamics and correlate well with the general time course of electrophysiological responses to the agonists. A physiological role of PIP_2 -dynamics is further supported by results of electric stimulation in the area of afferent fibers in the stratum oriens. The data implicate that PIP_2 depletion can be induced by synaptic receptor activation, but the pharmacology needs further verification. Data from dentate gyrus granule cells show that PIP_2 depletion is not only a receptor but also neurontype specific process, as application of mAChR and mGluR agonists did not induce a measurable PIP_2 -depletion here.

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis.....	I
II Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 PIP ₂ : Funktion und Regulation.....	1
1.1.1 Struktur, Metabolismus und Regulation.....	2
1.1.2 PIP ₂ -Spaltung nach Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren.....	4
1.1.3 Regulation der Aktivität von Ionenkanälen als Beispiel der PIP ₂ -Funktion.....	6
1.1.4 Methoden zur Messung der PIP ₂ -Hydrolyse und -Dynamik.....	9
1.1.5 PIP ₂ -Dynamik in Neuronen.....	10
1.2 Hippocampale CA1-Pyramidenneurone als Modellsystem.....	11
1.2.1 Neuroanatomie des Hippocampus.....	12
1.2.2 Die Septohippocampale Projektion.....	14
1.2.3 Expression und Wirkung pyramidalen mACh-Rezeptoren.....	15
1.2.4 Weitere G α_q -gekoppelte Rezeptoren der Pyramidenneurone.....	16
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Versuchstiere.....	20
2.1.2 Chemikalien, Präparationsbesteck und Geräte.....	21
2.2 Akute hippocampale Hirnschnitte.....	21
2.3 Die Patch-Clamp-Technik.....	23
2.3.1 Prinzip der Messmethode.....	23
2.3.2 Praktische Durchführung von Whole-cell-Ableitungen.....	25
2.3.3 Patchpipetten und Intrazellulärlösung.....	27
2.3.4 Aufbau des Patch-Clamp Messstands.....	28
2.3.5 Datenerfassung und Analyse.....	29
2.4 Perfusionssysteme.....	30
2.5 Elektrische Stimulation.....	31
2.5.1 Grundlagen der elektrischen Stimulation.....	31
2.5.2 Praktische Durchführung der elektrischen Stimulation.....	35
2.6 Konfokalmikroskopische Messung der PIP ₂ -Dynamik.....	36
2.6.1 Prinzip der Messmethode.....	36
2.6.2 PIP ₂ -Sonden: PLC δ 1-PH- und Tubby-Domäne.....	38
2.6.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	40
2.6.4 Aufbau des konfokalen Messstands.....	41
2.6.5 Optische Parameter, Datenerfassung und Analyse.....	42
2.7 Stereotaktische Injektion lentiviraler Konstrukte.....	43
2.8 Lentivieren.....	47
2.8.1 Produktion der Lentivieren.....	47
2.8.2 Verpackungszelllinie 293FT und Kulturbedingungen.....	49
2.9 Primärkultur dissoziierter hippocampaler Neurone.....	50
2.9.1 Präparation und Kultivierung.....	50
2.9.2 Transfektion primärer Neuronenkulturen mit Lentivieren.....	52
3 Ergebnisse.....	53
3.1 Heterologe Expression der PIP ₂ -Sonden in hippocampalen Pyramidenneuronen.....	53
3.1.1 Expressionseffizienz der viralen Konstrukte in primären hippocampalen Neuronenkulturen.....	53
3.1.2 Stereotaktische Koordinaten des hippocampalen Zielareals in P21-Wistar-Ratten.....	55
3.1.3 <i>In vivo</i> Expression der PIP ₂ -Sonden.....	57

3.2 Charakterisierung der PIP ₂ -Dynamik in hippocampalen CA1-Pyramidenneuronen nach pharmakologischer Aktivierung Gα _q -gekoppelter Rezeptoren (Sonde: Tubby-Domäne) ..	59
3.2.1 PIP ₂ -Dynamik nach Aktivierung von mAChR: Soma	59
3.2.2 Dendritische PIP ₂ -Dynamik nach Aktivierung von mAChR.....	63
3.2.3 PIP ₂ -Dynamik nach Aktivierung von mGluRI: Soma	67
3.2.4 Dendritische PIP ₂ -Dynamik nach Aktivierung von mGluRI	69
3.2.5 PIP ₂ -Dynamik nach verlängerter Aktivierung von mAChR und mGluRI (Soma)	70
3.2.6 Amplituden der apparenten PIP ₂ -Depletion mit 100 μM DHPG	75
3.2.7 Zusammenfassung der mAChR- und mGluRI-induzierten PIP ₂ -Depletion	77
3.2.8 Die Applikation weiterer Gα _q -Rezeptoragonisten induziert keine messbare Sonden- translokation	78
3.3 Analyse der PH-Domänen-Translokation in CA1-Pyramidenneuronen nach pharmakologischer Gα _q -Aktivierung und Vergleich zur Tubby-Domäne.....	80
3.3.1 Translokation nach mAChR- und mGluRI-Aktivierung: Soma.....	80
3.3.2 Oszillationen der PH-Domänen-Translokation	84
3.3.3 Dendritische PH-Domänen-Translokation	86
3.3.4 Die Applikation weiterer Gα _q -Rezeptoragonisten induziert keine messbare Translokation der PH-Domänen- sonden.....	88
3.3.5 Zusammenfassung der PH-Domänen-Translokation	89
3.4 Elektrophysiologische Effekte der verwendeten Gα _q -Agonisten	90
3.5 Synaptisch induzierte PIP ₂ -Depletion	96
3.5.1 Elektrophysiologische Messung elektrisch induzierter cholinerg <i>slow</i> EPSPs	96
3.5.2 Analyse elektrisch induzierter PIP ₂ -Depletion	99
3.6 Analyse pharmakologisch induzierter PIP ₂ -Dynamik in <i>Gyrus dentatus</i> -Körnerzellen	103
4 Diskussion	105
4.1 Ist die Depletion von PIP ₂ ein physiologischer Prozess?	105
4.1.1 Können Gα _q -gekoppelte Rezeptoren eine PIP ₂ -Depletion in nativen Neuronen induzieren?	105
4.1.2 Ist eine PIP ₂ -Depletion synaptisch induzierbar?	106
4.2 Welche Bedeutung haben Amplitude und Kinetik der beobachteten PIP ₂ -Depletion für die Signaltransmission bzw. Elektrophysiologie der Neurone?	108
4.2.1 Mittlerer Verlauf und Oszillationen der pharmakologisch induzierten PIP ₂ -Dynamik	108
4.2.2 Korrelation von synaptisch induzierter PIP ₂ -Dynamik und Elektrophysiologie..	109
4.2.3 Mögliche Grundlagen einer rezeptorspezifischen Regulation GPCR-gekoppelter Effektoren über PIP ₂	110
4.3 Was kann man aus der Beobachteten PIP ₂ -Dynamik über die Regulation von PIP ₂ in den Pyramidenneuronen schließen?.....	112
4.3.1 Dynamik der PIP ₂ -Regulation während der Aktivierung von Gα _q -Rezeptoren.....	112
4.3.2 Grundlagen der unterschiedlichen PIP ₂ -Depletion bei mGluRI und mAChR.....	113
4.4 Wie universell ist die Depletion von PIP ₂ durch Gα _q -gekoppelte Rezeptoren?	115
4.4.1 Signaltransduktion von Rezeptoren, bei denen keine PIP ₂ -Dynamik beobachtet wurde	115
4.4.2 PIP ₂ -Dynamik in <i>Gyrus dentatus</i> -Körnerzellen	117
4.5 Eignung von Tubby- und PH-Domänen als PIP ₂ -Sensoren	118
4.6 Ausblick.....	121
5 Literatur.....	123
Ehrenwörtliche Erklärung	140
Verzeichnis der akademischen Lehrer	141
Danksagung	142

II Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
AD	Außendurchmesser
A/D	analog-digital
ADP	Nachdepolarisation
ADP β S	Adenosin-5'-O-2-thiodiphosphat
AHP	Nachhyperpolarisation (engl. <i>afterhyperpolarisation</i>)
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (Rezeptor)
AP	Aktionspotential
D-AP5	D-2-Amino-5-phosphonopentansäure
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CGP 55845	(2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl] (phenylmethyl) phosphinic acid hydrochloride
d	Tag
DAG	Diacylglycerol
d.h.	das heißt
DHPG	(S)-3,5-Dihydroxyphenylglycin (mGluRI-Agonist)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPSP	<u>ex</u> itatorisches <u>p</u> ostsynaptisches <u>P</u> otential
F	Fluoreszenz ($F_0 \triangleq$ Ausgangsfluoreszenz)
FCS	<u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum
G α	G-Protein, α Untereinheit; G $\alpha_q \triangleq$ G α_q -Protein (-familie)
GABA _(A/B)	γ -Aminobuttersäure (Rezeptortyp A und B)
GAP	GTPase aktivierendes Protein
G $\beta\gamma$	G-Protein, $\beta\gamma$ -Untereinheit (Guaninnucleotid-bindendes-Protein)
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter (engl. <i>coupled</i>) Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCN	hyperpolarisations-aktivierter-zyklisch-nukleotid gesteuerter Ionenkanal
ID	Innendurchmesser
iGluR	ionotroper Glutamatrezeptor
IP ₃	Inositol(3,4,5)triphosphat
i.m., i.p.	intramuskulär, intraperitoneal
I _M	M-Strom (Ionenkanalstrom durch KCNQ-Kanäle)
IS	Intrazellulärlösung
KCNQ	engl. <i>K⁺-channel QT-like subfamily</i> (K ⁺ -Kanal der QT-Subfamilie)
K _d	Dissoziationskonstante (von Protein-Ligand Komplexen)
K _i	Dissoziationskonstante bezogen auf einen Inhibitor
KO	engl. <i>Knock-Out</i>
K _v	Spannungsaktivierter K ⁺ -Kanal
LTD	Langzeit-Depression

LTP	Langzeit-Potenzierung
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
max.	Maximum/maximal
MAPK	<u>M</u> itogen- <u>a</u> ktivier <u>e</u> <u>P</u> rotei <u>n</u> kinase
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor (I \cong Typ I)
n	Anzahl der Experimente/Neurone
N	Neuron
NBQX	2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat (Rezeptor)
Nr.	Nummer
Oxo-M	Oxotremorin-M (mAChR-Agonist)
p	Fehlerwahrscheinlichkeit (bezogen auf Signifikanzniveau)
P	postnatal(er Tag) , gezählt mit P0 = Tag der Geburt
pEC ₅₀	negativer dekadischer Logarithmus der mittleren <u>e</u> ffektiven <u>K</u> onzentration
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PH-Domäne	Pleckstrin Homologie Domäne (hier PLC δ 1-PH)
PI	Phosphoinositid
PI4K	PI-4-Kinase
PI(4)P	Phosphatidylinositol(4)phosphat
PIP5KI	PIP-5-Kinase I
PIP ₂	hier: Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat
PLC	Phospholipase-C
R	Rezeptor
RGS	engl. <i>Regulator of G-Protein Signaling</i>
R _{in}	Eingangswiderstand
ROI	engl. <i>Region of Interest</i>
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute (1/min)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.a.	siehe auch
S1, S2	Sicherheitsstufe 1, Sicherheitsstufe 2
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
sog.	sogenannt
<i>Str.</i>	<i>Stratum</i>
t	Zeit
t ₉₀	Zeit bis zum Erreichen von 90% der Amplitude (Dissoziation)
t ₁₀	Zeit bis zum Erreichen von 10% der Amplitude (\cong 90% Regeneration)
τ	Zeitkonstante
Tab.	Tabelle
Tubby	C-Terminale Tubby-Domäne des TUB Proteins
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
V _m	Membranspannung (der Zelle)
vs.	lat. <i>versus</i> : gegen(über)
z.B.	zum Beispiel

x mal

Es wurden die allgemein gebräuchlichen Abkürzungen und Maßeinheiten (SI-Einheiten) des „Système international d’unités“ einschließlich dessen Vorsätzen zur Bezeichnung von dezimalen Vielfachen und Teilen verwendet.

Auch Abkürzungen, die auf Empfehlungen der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) und IFCC (international Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) beruhen, werden nicht gesondert aufgeführt.

Aminosäuren sind mit dem Einbuchstabencode abgekürzt:

Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Aspartat	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutamat	E	Serin	S
Glutamin	Q	Threonin	T
Glycin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

1 Einleitung

1.1 PIP₂: Funktion und Regulation

Phosphatidylinositol(4,5)biphosphat (PIP₂) ist ein Lipid der zytoplasmatischen Schicht der Plasmamembran. Dort können sowohl integrale als auch an die Membran angelagerte Proteine über PIP₂-Interaktionen in ihrer Aktivität und Lokalisation reguliert werden. Man nimmt an, dass PIP₂-Konzentrationsänderungen an einigen Prozessen der zellulären Signaltransduktion beteiligt sind (für eine Übersicht s. Di Paolo & De Camilli, 2006; Balla *et al.*, 2009; Falkenburger *et al.*, 2010).

Mitte der 80er erkannte man, dass die Aktivierung von Gα_q-Protein gekoppelten Rezeptoren zur Spaltung von PIP₂ durch die Phospholipase C (PLC) führt (Berridge, 1983; Creba *et al.*, 1983). Ursprünglich nahm man an, dass die Funktion von PIP₂ in der Signaltransduktion dieser Rezeptoren ausschließlich darin besteht, als Vorläufer für die Second Messenger Diacylglycerol (DAG) und Inositol(3,4,5)triphosphat (IP₃) zu dienen (Berridge & Irvine, 1989). Alle nachgeschalteten Effekte führte man auf die Bildung dieser Second Messenger zurück. Ab den späten 90er Jahren entdeckte man jedoch immer mehr eigenständige Funktionen von PIP₂ und anderen Phosphoinositiden (PI). Heute sind PIs als Modulatoren einer Vielzahl zellulärer Prozesse etabliert. Zu diesen gehören neben der Signaltransduktion die Regulation von Endo- und Exozytose, der Zytoskelett-Reorganisation, der Aktivität von Membranproteinen sowie Funktionen im Nukleus und in Endosomen (Übersicht: Di Paolo & De Camilli, 2006; Balla *et al.*, 2009; Falkenburger *et al.*, 2010).

Die Regulation des PI-Metabolismus und dessen Fehlfunktionen sowie Mutationen der PI-Bindedomänen von Proteinen werden mit einer zunehmenden Zahl menschlicher Erkrankungen ursächlich oder fördernd in Verbindung gebracht. Dies gilt insbesondere für PIP₂. Dazu gehören u.a. neurologische Erkrankungen wie familiäre Demenz (bzw. Alzheimer; Shimohama *et al.*, 1995; Landman *et al.*, 2006; Berman *et al.*, 2008) und Bipolare Störung (Halstead *et al.*, 2005), das Andersen-Tawil-Syndrom (ATS; Lopes *et al.*, 2002), Erkrankungen des Herzens (Long-QT-Syndrom, Park *et al.*, 2005; Herz-Hypertrophie, Halstead *et al.*, 2005), Diabetes (Clement *et al.*, 2001; Marion *et al.*, 2002), Tumore (Bunney & Katan, 2010) und Assoziationen mit der Replikation des HIV-1-Virus (Ono *et al.*, 2004) sowie der zu Hörverlusten führenden Nebenwirkungen von Aminoglycosid-Antibiotika (Leitner *et al.*, 2011).

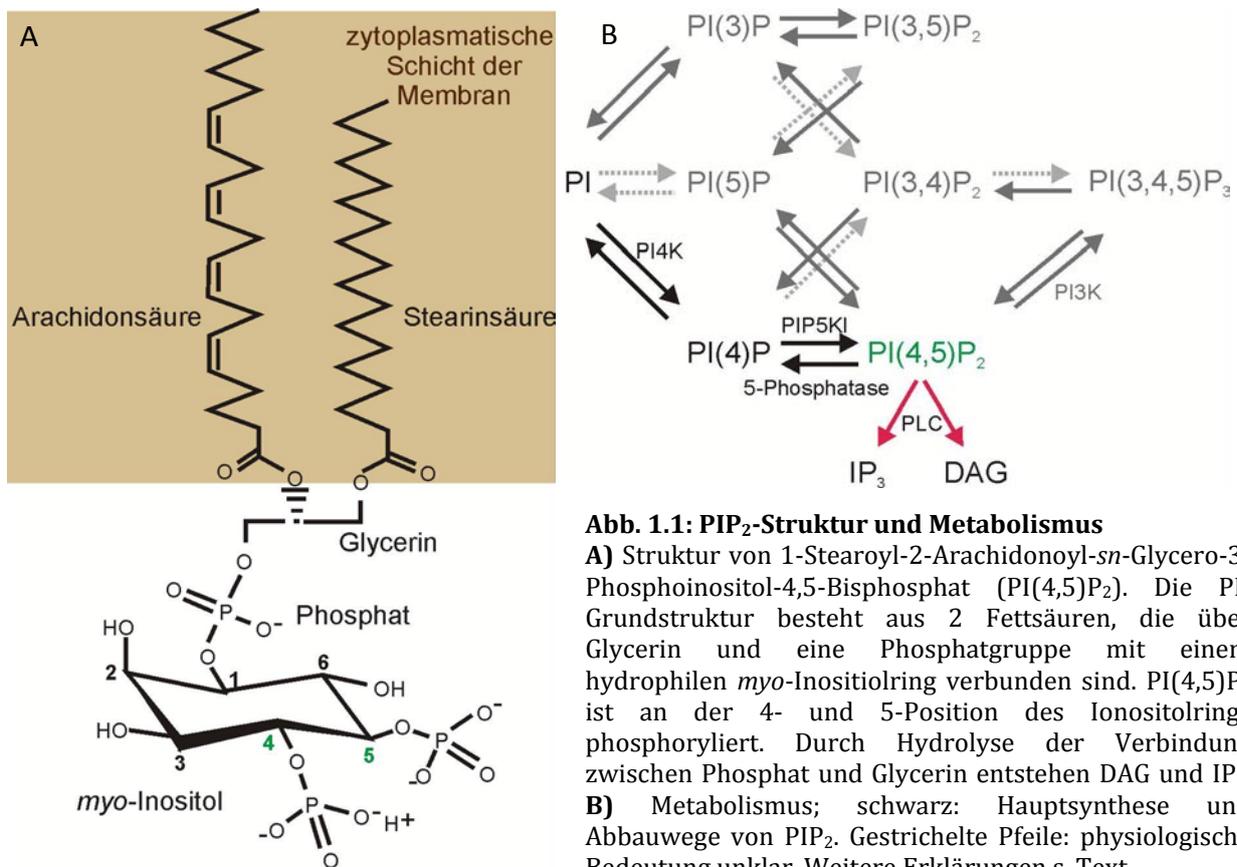
Die Ergebnisse der Erforschung von PI-Funktionen haben eine Vielzahl an Informationen über Proteine und Prozesse hervorgebracht, die von einer Konzentrationsänderung von PIs bzw. PIP_2 beeinflusst werden können. Darunter ist eine Vielzahl von Ionenkanälen der Plasmamembran. Die Hydrolyse von PIP_2 durch Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) kann neben der Bildung der Second Messenger DAG und IP_3 potentiell eine Reduktion der PIP_2 -Level bewirken. Die Depletion von PIP_2 ist in heterologen Expressionssystemen und isolierten Zellen für die Regulation verschiedener Effektoren durch GPCRs verantwortlich (Übersicht: Di Paolo & De Camilli, 2006; Balla *et al.*, 2009; Falkenburger *et al.*, 2010). Ob dies auch Bestandteil physiologischer Prozesse bzw. Signalkaskaden ist, ist Gegenstand der aktuellen Forschung und dieser Arbeit. Man nimmt an, dass in Neuronen über $\text{G}\alpha_q$ -Protein gekoppelte Rezeptoren induzierte PIP_2 -Konzentrationsänderungen die Aktivität von Ionenkanälen und damit die elektrische Erregbarkeit modulieren können. Die Dynamik der PIP_2 -Konzentrationsänderungen in nativen Neuronen ist bislang allerdings weitgehend unbekannt. Für ein Verständnis der Funktion von PIP_2 in physiologischen zellulären Prozessen ist eine Kenntnis dieser postulierten Dynamik aber wesentliche Voraussetzung.

1.1.1 Struktur, Metabolismus und Regulation

PIs sind Derivate des Phosphatidylinositols. Dieses besteht aus einem hydrophoben Diacylglycerol und einer polaren Inositol-Kopfgruppe. Durch Phosphorylierung der Hydroxylgruppen des Inositolrings an der 3-, 4- und 5-Position können sieben Isoformen gebildet werden, die in den verschiedenen Kompartimenten der Zellen eine zwar geringe, aber sehr spezifische Verteilung aufweisen. Diese spezifische Verteilung der unterschiedlichen PIs hilft, verschiedenen zellulären Kompartimenten eine Identität zu geben. Dabei sind die PIs stets in der zytoplasmatischen Seite der Membranen lokalisiert. Durch Phosphorylierung an der 4- und 5-Position entsteht Phosphatidylinositol(4,5)biphosphat (Abb. 1.1). Es macht etwa 1% der Gesamtlipide in zellulären Membranen aus (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001; Di Paolo & De Camilli, 2006) und ist das mit Abstand häufigste zweifach phosphorylierte PI (>99%, Vanhaesebroeck *et al.*, 2001). Es ist das charakteristische PI der Plasmamembran. Sofern nicht ausdrücklich anders angegeben bezeichne ich daher mit der Abkürzung PIP_2 das Phosphatidylinositol(4,5)biphosphat.

Die Konzentration und Verteilung der PIs in den verschiedenen Kompartimenten wird durch die Aktivität und Lokalisation spezifischer Kinasen und Phosphatasen reguliert

(Toker, 2002; Di Paolo & De Camilli, 2006; Kwiatkowska, 2010). Zusammen mit den über Signalkaskaden aktivierten Phospholipasen bestimmen sie über die Dynamik der PIs. Die Synthese von PIP_2 verläuft hauptsächlich über die Phosphorylierung von PI zu $PI(4)P$ und der anschließenden Addition eines weiteren Phosphats an der 5' Position (Loijens & Anderson, 1996; Ishihara *et al.*, 1998). Die Bildung von $PI(4)P$ durch 4-Kinasen (PI4K) erfolgt sowohl direkt in der Plasmamembran als auch durch Produktion im Golgi und Lysosomen und anschließendem Transport (Cockcroft *et al.*, 1985; Odorizzi *et al.*, 2000).



$PI(5)P$ wird in der Plasmamembran nur in sehr geringen Mengen gebildet. Eine zentrale Rolle bei der Produktion von PIP_2 kommt der Katalyse des zweiten Phosphorylierungsschritts und damit den TypI- $PI(4)P$ -5-Kinasen (PIP5KI) zu. Mäuse und Menschen besitzen drei verschiedene Isoformen (α , β , γ), die ihrerseits in verschiedenen Splicevarianten exprimiert werden können (Ishihara *et al.*, 1996, 1998; Loijens & Anderson, 1996). Im Allgemeinen treten alle drei Isoformen gemeinsam in den Zellen auf, scheinen aber jeweils spezifische Aufgaben zu haben. Im Gehirn ist PIP5KI γ vorherrschend (Wenk *et al.*, 2001; Akiba *et al.*, 2002; Giudici *et al.*, 2004; Volpicelli-Daley *et al.*, 2010). Ausschalten des Gens in KO-Mäusen führt zu synaptischen Defekten und ist postnatal letal (Di Paolo *et*

al., 2004). Die Rekrutierung von PIP5KI zur Plasmamembran erfolgt u.a. durch elektrostatische Wechselwirkungen der Enzymhomodimere mit den negativ geladenen Kopfgruppen verschiedener Phospholipide inklusive PIP₂ (Powner *et al.*, 2005; Szymańska *et al.*, 2008). Folglich können diese die Aktivität der PIP5Ks beeinflussen. So werden PIP5Ks z.B. über die Anwesenheit von Phosphatidsäure (PA) positiv reguliert, die durch Aktivierung der Phospholipase D und DAG-Kinase gebildet werden kann (Übersicht: Cockcroft, 2009). Ein wichtiger Regulationsmechanismus ist die Phosphorylierung von PIP5K an mehreren Positionen, die eine Inhibition der Enzyme bewirkt (Di Paolo & De Camilli, 2006; Kwiatkowska, 2010). Dabei liegen die Enzyme unter Ruhebedingungen wahrscheinlich in einer teilweise phosphorylierten Form vor und können durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung entweder deaktiviert oder stärker aktiviert werden.

Der Abbau von PIP₂ kann sowohl über Hydrolyse durch Phosphatasen als auch durch Phospholipasen erfolgen (Übersicht: Di Paolo & De Camilli, 2006). In der Plasmamembran erfolgt die Dephosphorylierung primär durch 5-Phosphatasen und dient der Kontrolle der PIP₂-Konzentration sowie der Terminierung von Signalen. So bauen 5-Phosphatasen z.B. PIP₂ in endocytisierten Vesikeln ab und begrenzen damit die PIP₂-Lokalisation auf die Plasmamembran (Cremona *et al.*, 1999). Durch die Anknüpfung einer weiteren Phosphatgruppe kann PIP₂ zu PI(3,4,5)P₃ umgewandelt werden. Die Konzentration von PI(3,4,5)P₃ ist unter Ruhebedingungen sehr niedrig und kann bei Aktivierung von PI 3-Kinasen zeitweilig sehr stark ansteigen. PI(3,4,5)P₃ wirkt als Second Messenger, indem es als Membrananker für Signalproteine fungiert (Übersicht: Cantley, 2002). Die Spaltung von PIP₂ durch Phospholipase C erfolgt durch Hydrolyse der Verbindung zwischen Glycerin und Phosphat. Dies ist der charakteristische Signalweg Gα_q-gekoppelter Rezeptoren, dessen Komponenten im nächsten Abschnitt näher erläutert werden.

1.1.2 PIP₂-Spaltung nach Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Das menschliche Genom enthält über 800 GPCRs, die eine Vielzahl verschiedenster zellulärer Prozesse regulieren (Übersicht: Fredriksson & Schiöth, 2005; Katritch *et al.*, 2012). So kann z.B. die Aktivierung von GPCRs durch Neurotransmitter zum einen die Transmitterausschüttung an der Präsynapse und zum anderen die Reaktion des postsynaptischen Neurons auf spätere synaptische Eingänge modulieren. Dies resultiert in einer Änderung der synaptischen Plastizität und der neuronalen Informationsverarbeitung. Allen GPCRs gemeinsam ist eine aus sieben α-helikalen Transmembrandomänen bestehende

Primärstruktur. Namensgebendes Charakteristikum ist die Transduktion der Rezeptoraktivierung durch heterotrimere G-Proteine (Übersicht: Simon *et al.*, 1991; Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Oldham & Hamm, 2008). Die G-Proteine bestehen aus einer $\beta\gamma$ - und einer an GDP gebundenen α -Untereinheit, die im Ruhezustand an die intrazelluläre Seite des Rezeptors assoziiert sind (Abb. 1.2). Bei Aktivierung katalysieren die GPCRs den Austausch des GDPs gegen GTP, was zu einer Reduktion der Affinität der α -Untereinheit für $\beta\gamma$ und einer Dissoziation des Heterotrimers führt. In Folge können sowohl α - als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheiten die Aktivität verschiedener Effektoren modulieren und so verschiedene Signalkaskaden in Gang setzen (vgl. Abb. 1.2). Die G-Proteine werden nach der Sequenzhomologie der α -Untereinheit und ihrer primären Effektoren in die vier Klassen $G\alpha_s$ (Effektoren/Second Messenger: Adenylatcyclase, cAMP \uparrow , PKA), $G\alpha_i$ (PI3K, Adenylatcyclase, cAMP \downarrow), $G\alpha_q$ (PLC, Ca $^{2+}$ \uparrow , IP $_3$ \uparrow , PKC, Rho GTPasen) und $G\alpha_{12}$ (Rho GTPasen) eingeteilt. Die primär an die Aktivierung von PLC gekoppelte $G\alpha_q$ -Familie besteht aus den Proteinen $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{15/16}$, welche sich jeweils in Details der aktivierten Effektoren und ihrer Expression unterscheiden (Übersicht: Hubbard & Hepler, 2006; Mizuno & Itoh, 2009). Die am weitesten verbreitete Expression haben $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$.

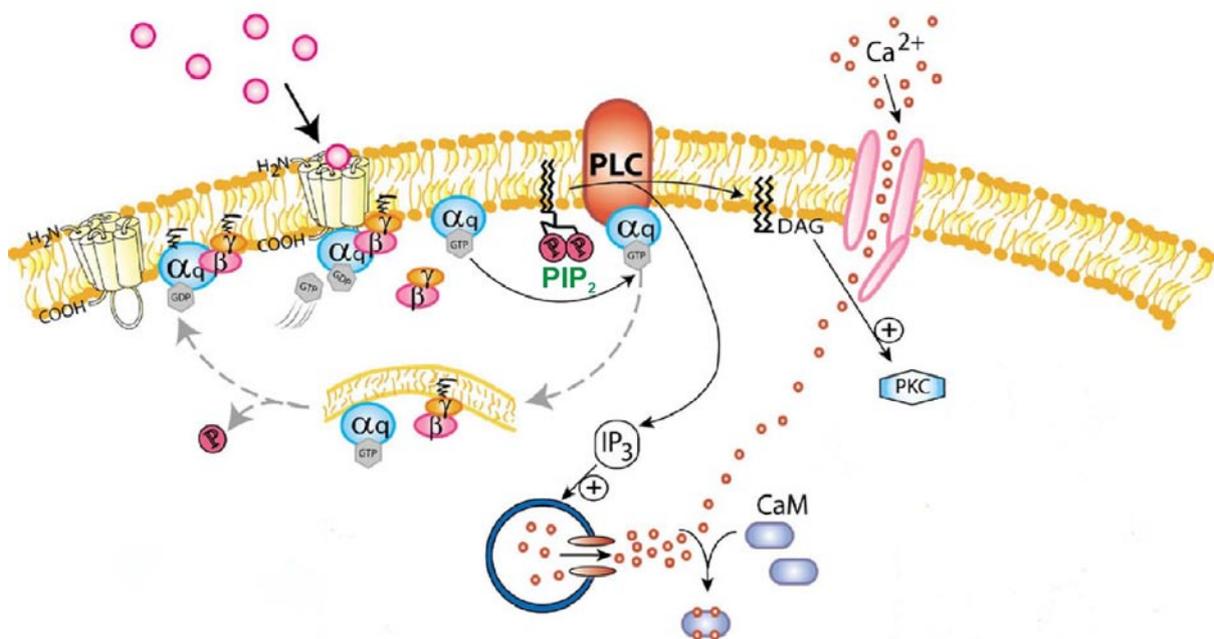


Abb.1.2: Signaltransduktion bei $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptoren. Gezeigt sind die Haupttransduktionswege (durchgezogene Linien) und der Zyklus der Aktivierung und Deaktivierung der G-Proteine durch Austausch von GDP bzw. GTP (Deaktivierung s. gestrichelte Linien). PLC: Phospholipase C; PKC: Proteinkinase C; CaM: Calmodulin. Modifiziert aus (Billington & Penn, 2003).

Bislang wurden dreizehn PLC-Isoenzyme identifiziert, die aufgrund ihrer Struktur und Regulation von Aktivierungsmechanismen in die sechs Klassen β , γ , δ , ϵ , ζ und η kategorisiert werden (Übersicht: Fukami *et al.*, 2010). Alle PLC-Isoformen besitzen

katalytische X- und Y-Domänen zur Hydrolyse von PIP₂. Mit Ausnahme des ζ-Isoenzym enthalten sie außerdem eine Pleckstrin-Homologie Domäne (PH, vgl. Abschnitt 2.6.2), mit der die PLCs an PIs in der Membran binden können. Unter Ruhebedingungen sind die meisten PLCs im Zytoplasma lokalisiert und werden bei Aktivierung zur Membran rekrutiert. Die Aktivierung wird über regulatorische Domänen gesteuert, in denen sich die einzelnen Klassen voneinander unterscheiden. G-Proteine der Gα_q-Klasse vermitteln Signale hauptsächlich über PLCβ, wobei einige β-Isoformen auch von βγ-Untereinheiten aktiviert werden können. Alle PLC-Isoformen benötigen Calcium für ihre Funktion, unterscheiden sich aber in ihrer Sensitivität (Horowitz *et al.*, 2005; Fukami *et al.*, 2010). Eine Erhöhung der Konzentration dieses Second-Messengers stellt daher eine weitere Möglichkeit der Regulation der PLC dar. Dabei kann Calcium während GPCR-Aktivierung sowohl durch Ionenkanäle der Plasmamembran einströmen als auch von IP₃ aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt werden. Im Gehirn werden Mitglieder aller PLC-Klassen mit Ausnahme von PLCζ exprimiert (Fukami *et al.*, 2010).

Die Terminierung der G-Protein-Aktivität erfolgt primär durch die endogene GTPase-Aktivität der α-Untereinheit, durch die GTP in GDP umgewandelt wird (Übersicht: Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Oldham & Hamm, 2008). Die endogen nur schwache katalytische Wirkung wird durch Bindung von sogenannten *Regulator of G-Protein Signaling* (RGS) Proteinen beschleunigt. Auch Wechselwirkungen der PLCβ mit der Gα-Untereinheit unterstützen die katalytische Wirkung und können somit die Funktion eines *GTPase aktivierenden Proteins* (GAP) erfüllen. Eine weitere Möglichkeit der Terminierung der Signaltransduktion stellt die Phosphorylierung der GPCRs dar. Sowohl die Hydrolyse von GTP als auch die Phosphorylierung des GPCR können damit eine Desensibilisierung bewirken, d.h. eine Abschwächung der Rezeptorwirkung trotz fortdauernder Anwesenheit des Agonisten.

1.1.3 Regulation der Aktivität von Ionenkanälen als Beispiel der PIP₂-Funktion

In dieser Arbeit wurden CA1-Pyramidenneurone als Modellsystem für die GPCR-induzierte PIP₂-Dynamik verwendet. Das zentrale Merkmal von Nervenzellen ist ihre elektrische Erregbarkeit, die von dem Fluss von Ionen durch spezifische Membrankanäle abhängt. In der Tat waren es ein Na⁺/Ca²⁺-Transporter und ein K_{ATP}-Kanal, bei denen Hilgemann & Ball (1996) erstmalig eine PIP₂-Abhängigkeit eines Proteins entdeckten. Sie stellten fest, dass die Zugabe von PIP₂-Analoga eine schleichende Reduzierung der Offenwahrscheinlichkeit (engl. *rundown*) in der inside-out-Konfiguration (vgl. Methoden Abschnitt 2.3.1) verhindern

konnte. Aufgrund der enormen Bedeutung von Ionenkanälen für Nervenzellen werden im Folgenden am Beispiel dieser Proteine einige Aspekte der PIP₂-Funktion erläutert.

Inzwischen wurde für eine Vielzahl von Ionenkanalfamilien gezeigt, dass ihre Funktion durch den PIP₂-Gehalt in der Membran beeinflusst wird. Dazu gehören unter anderem KCNQ, Kir, TRP, Ca_v, CNG, HCN, ERG und K₂P Kanäle (Übersicht: Suh & Hille, 2008; Logothetis *et al.*, 2010). Man nimmt an, dass Störungen des PI-Metabolismus oder Mutationen der PIP₂-Interaktionsbereiche der Kanäle zu einer gestörten Kanalfunktion führen. Die physiologische Bedeutung von PIP₂-Kanalinteraktionen wird durch Untersuchungen zahlreicher menschlicher Erkrankungen unterstützt (Halstead *et al.*, 2005; Logothetis *et al.*, 2010).

Auf die meisten Kanäle hat PIP₂ eine aktivierende Wirkung (Übersicht: Suh & Hille, 2008). Eine Zunahme des PIP₂-Gehalts kann dabei zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit, einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit oder Aufhebung einer Inaktivierung führen. Bei diesen Effekten nimmt man an, dass PIP₂ direkt mit den Kanälen interagiert. Die Zellen können die Aktivität der Kanäle mit Hilfe von PIP₂ aber auch indirekt regulieren, indem sie z.B. die Menge an Kanälen in der Membran steuern. So wurde für NMDA-Kanäle gezeigt, dass ein über PIP₂-regulierter Abbau des Aktinzytoskeletts eine Endozytose der Kanäle bewirkt (Michailidis *et al.*, 2007; Mandal & Yan, 2009). Über die Verteilung von PIP₂ und anderen PIs können Zellen auch dafür sorgen, dass Ionenkanäle nur an dem Ort aktiv sind, an dem sie benötigt werden und während des Transports in anderen Kompartimenten inaktiviert sind (Hilgemann *et al.*, 2001). So konnte für die hauptsächlich in Lysosomen lokalisierten TRPML1-Kanäle gezeigt werden, dass diese in Lysosomen durch PI(3,5)P₂ aktiviert und durch PI(4,5)P₂ an der Plasmamembran inaktiviert werden (Zhang *et al.*, 2012).

Wie stark der Einfluss von PIP₂ auf die Kanalfunktion ist, hängt von der PIP₂-Affinität der Kanäle ab (Gamper & Shapiro, 2007; Suh & Hille, 2008). Kanäle mit einer hohen PIP₂-Affinität haben eine niedrige Dissoziationskonstante, wodurch schwache Fluktuationen der PIP₂-Konzentration kaum Einfluss auf die Kanalfunktion haben (Abb. 1.3 A). Dagegen haben Kanäle mit niedriger Affinität hohe Dissoziationskonstanten, was sie potentiell empfindlicher für physiologische Fluktuationen der PIP₂-Level macht. Die PIP₂-Abhängigkeit von Kanälen mit hoher Affinität ist dagegen potentiell bei einem Transport durch PIP₂-Freie Kompartimente von Bedeutung. Dann kann das Fehlen von PIP₂ zu einer Deaktivierung der Kanäle führen oder – ähnlich wie bei den TRPML1-Kanälen – eine Aktivierung überhaupt erst ermöglichen. Die Regulation der Ionenkanäle durch PIP₂ kann dabei auch durch eine Modulation der PIP₂-Affinität selbst variiert werden (vgl. Abb. 1.3 B).

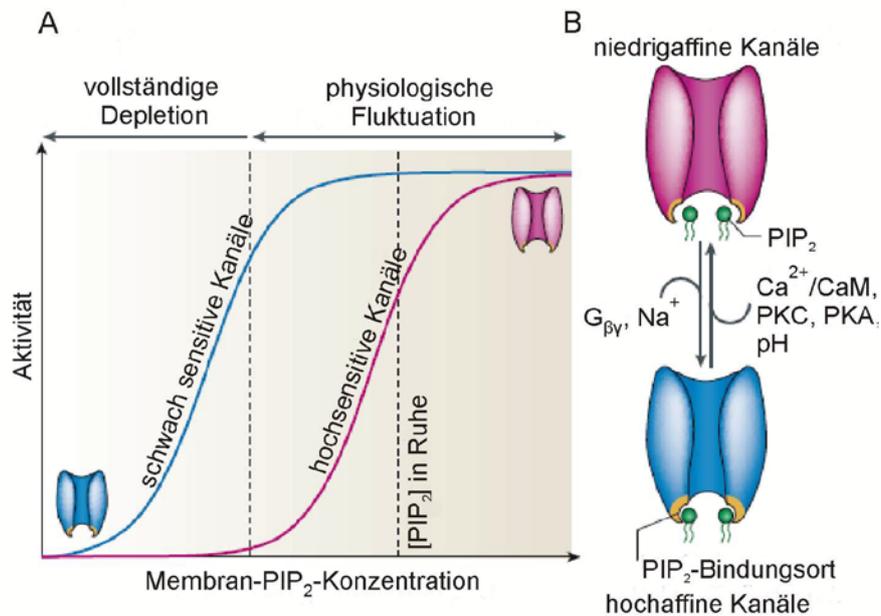


Abb. 1.3: Abhängigkeit der PIP₂-Regulation von Ionenkanälen durch die Affinität. A) In Abhängigkeit der PIP₂-Affinität haben PIP₂-Fluktuationen einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Aktivität von Ionenkanälen. **B)** Modulationen der PIP₂-Affinität können die Sensitivität der Kanäle erhöhen oder erniedrigen. G_{βγ}: G-Protein βγ-Untereinheiten; CaM: Calmodulin; PKC: Proteinkinase C; PKA: Proteinkinase A. (Modifiziert aus Gamper & Shapiro, 2007).

Erste Einblicke in die strukturellen Grundlagen von PIP₂-Kanalinteraktionen konnten in den vergangenen Jahren aus Strukturmodellen gewonnen werden, die auf Mutationsstudien und Kristallstrukturen einiger weniger Kanäle mit PIP₂-Analoga basieren (Kuo *et al.*, 2003; Logothetis *et al.*, 2007; Inanobe *et al.*, 2010; Hansen *et al.*, 2011; Whorton & MacKinnon, 2011; Schmidt *et al.*, 2012). Im Falle der Einwärtsrichter-K⁺-Kanäle Kir 2.2 und GIRK (Kir 3.1-3.4) bindet PIP₂ an eine Grenzfläche zwischen der Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne der Kanäle und bewirkt dort eine Verlagerung und Rotation von Teilabschnitten der Kanäle, die deren Konformation in Richtung des geöffneten Zustands verschieben. Für eine vollständige Öffnung der Kanäle sind Einflüsse weiterer Modulatoren nötig (Hansen *et al.*, 2011; Whorton & MacKinnon, 2011).

Eine noch vollkommen ungelöste Frage bezüglich der PIP₂-vermittelten Regulation von Ionenkanälen und anderen Membranproteinen ist, wie die Zellen eine Rezeptorspezifität erzielen können. Nicht alle G_{αq}-gekoppelten Rezeptoren eines Zelltyps bewirken z.B. die gleiche Modulation der gegebenen PIP₂-sensitiven Kanäle bzw. benutzen zu deren Regulation den gleichen Mechanismus. In der Literatur finden sich dazu sehr konträre Konzepte (Übersicht: Gamper & Shapiro, 2007). Ein Modell besagt, dass PIP₂ und Rezeptoren in Mikrodomänen organisiert sind, wodurch die Komponenten der Signalkaskade eng gekoppelt und lokal begrenzt sind. Es ist allerdings umstritten, wie solche Mikrodomänen gebildet und aufrecht erhalten werden können. In eine ähnliche Richtung

geht die Hypothese der Sequestrierung bzw. Gruppierung von PIP₂ durch Proteine, die PIP₂ „ansammeln“ können. Hier ist unklar, unter welchen Umständen das so lokal akkumulierte PIP₂ für andere Prozesse verfügbar ist. Sowohl die Modelle zu lokalen Mikrodomänen als auch zur Sequestrierung von PIP₂ gehen von einer begrenzten Diffusion der Lipidmoleküle aus. Im Gegensatz dazu gibt es in einigen Zellen Hinweise darauf, dass eine receptorspezifische PIP₂-Depletion auch ohne lokal begrenzte Diffusion möglich ist. So kann eine parallel zur PIP₂-Hydrolyse gesteigerte Synthese dazu führen, dass ein Absinken der PIP₂-Konzentration receptorspezifisch verhindert wird (vgl. Gamper & Shapiro, 2007 und Diskussion).

1.1.4 Methoden zur Messung der PIP₂-Hydrolyse und -Dynamik

Als Hokin und Hokin (1953) die ersten Messungen zur PI-Hydrolyse durchführten, basierten ihre Analysen auf dem Acetylcholin-induzierten Einbau von ³²P in Inositolphospholipide des Pankreas. Später diente die radioaktive Bestimmung von myo-[³H-Inositol] (Schoepp *et al.*, 1994) oder der IP₃-Masse (Challiss *et al.*, 1990) als Maß des PIP₂-Metabolismus. Die Methoden finden nach wie vor Anwendung zur Untersuchung der *in vitro* und *in vivo* Wirkung verschiedener Rezeptoragonisten auf die PIP₂-Hydrolyse. Die Analyse radioaktiver Marker kann allerdings nur grobe Hinweise auf die Aktivierung eines PLC-gekoppelten Signalwegs geben und ist in der örtlichen Auflösung sehr begrenzt. Die Messung der PIP₂-Hydrolyse zeigt nicht, ob sich dessen Konzentration in den Membranen verändert und wie sich die Dynamik in einzelnen Zellen verhält.

Als sich abzeichnete, dass PIs eigene Funktionen in den verschiedenen Kompartimenten der Zellen erfüllen, begann man spezifischere Methoden zu entwickeln. Die Identifizierung PI-spezifischer Proteindomänen macht es seit Ende der 90er Jahre möglich, Sonden zur optischen Messung der PI-Dynamik in lebenden Zellen zu entwickeln (vgl. Methoden Abschnitt 2.6.2). Diese Sonden bestehen aus Fusionsproteinen von PI-bindenden Domänen mit fluoreszierenden Proteinen. Die PI-Abhängige Lokalisation der Sonden an der Membran zeigt dabei relative Veränderungen der PI-Konzentration in der Membran an.

Alternativ wurde in einigen Studien die Aktivität von hoch-PIP₂-sensitiven Ionenkanälen als Indikator der putativen PIP₂-Dynamik verwendet (Delmas *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005; Hardie, 2007; Leitner *et al.*, 2012). Die Untersuchung der PIP₂-Funktionen wird außerdem durch Weiterentwicklungen der Werkzeuge zur Manipulation der PIP₂-Konzentrationen unterstützt, die eine zeitliche präzisere Beeinflussung ermöglichen (Übersicht: Balla *et al.*, 2009; Mehta & Zhang, 2011). Dazu gehören rekrutierbare 5-Phosphatasen, die

pharmakologisch (Rapamycin-System), elektrisch (spannungsgesteuerte CI-VSP) oder optisch (Idevall-Hagren *et al.*, 2012) gesteuert werden können. Insbesondere der Einsatz optischer Manipulationsmethoden könnte in Zukunft auch eine bessere örtliche Auflösung ermöglichen.

1.1.5 PIP₂-Dynamik in Neuronen

Mit Hilfe der PIP₂-spezifischen Sonden konnte in heterologen Expressionssystemen und bei einigen aus dem Gewebe isolierten Zellen gezeigt werden, dass die massive Aktivierung G α_q -gekoppelter Rezeptoren *in vitro* eine Depletion der PIP₂-Level bewirken kann (Di Paolo & De Camilli, 2006; Balla *et al.*, 2009; Übersicht: Falkenburger *et al.*, 2010). Ob dies auch bei Zellen in ihrem nativen Umfeld geschieht, ist noch weitgehend unerforscht. Dies liegt vor allem daran, dass die Arbeit an nativen Zellen einen höheren experimentellen Aufwand erfordert und die Transfektion der Zellen mit den benötigten Konstrukten anspruchsvoller ist. Zudem können in heterologen Expressionssystemen verschiedene zelluläre Komponenten weitgehend isoliert betrachtet werden. Obwohl der Einsatz spezifischer Sonden zur optischen Messung der relativen PIP₂-Konzentration zunehmend zu einer Standardmethode wird, liegen daher bislang nur spärliche Informationen über die endogene PIP₂-Dynamik in Zellen vor.

Die reduzierte Betrachtung von zellulären Prozessen in heterologen Expressionssystemen ist einerseits sehr nützlich, birgt aber andererseits die Gefahr einer Verzerrung der Abläufe und des Wirkungsgrads der einzelnen Komponenten. Auch isolierte Zellen geben die Situation im vollständigen System nur bedingt wider. Studien an kardialen Myozyten haben gezeigt, dass sich der PIP₂-Gehalt isolierter Zellen deutlich von dem im Gewebe unterscheiden kann (s. Hilgemann *et al.*, 2001). Dies wird auf den Verlust von Membran- bzw. Strukturproteinen zurückgeführt, der aus dem fehlenden Kontakt zu benachbarten Zellen resultiert. Neben dem Ausmaß der PIP₂-Depletion könnte sich auch deren Verlauf in nativen Zellen von dem in kultivierten unterscheiden. Insgesamt ist über den Zeitverlauf der rezeptorinduzierten PIP₂-Depletion wenig bekannt. Viele Studien haben sich mit der Frage nach dem „ob“ und „wie viel“ beschäftigt, aber nicht mit der zeitlichen Modulation. Dabei könnte eine zeitliche Veränderung des Signals den Grad der Wirkung auf die Effektoren beeinflussen.

Die ersten Versuche, die durch Aktivierung endogener Rezeptoren in Neuronen induzierte PIP₂-Dynamik mit PIP₂-Sonden zu messen, wurden Anfang des vergangenen Jahrzehnts u.a. in Primärkulturen von Purkinjoneuronen (Okubo *et al.*, 2001), Hippocampus (Micheva,

2001; Nahorski *et al.*, 2003; Willets *et al.*, 2004; Nash *et al.*, 2004) und Neuronen des *Ganglion cervicale superius* (SGC, Gamper *et al.*, 2004; Winks *et al.*, 2005) durchgeführt. Bereits zu diesem Zeitpunkt führte die IP₃-Affinität der verwendeten PLCδ1-PH Domäne bei den vor allem nach PLC-Aktivierung erhaltenen Daten allerdings zu einer bedeutenden Unsicherheit in der Beantwortung der Frage, ob tatsächlich eine PIP₂-Depletion vorlag. Die meisten Autoren interpretierten die Translokation der Sonde daher als einem IP₃ bzw. der allgemeinen PIP₂-Hydrolyse entsprechendem Signal (s. Abschnitt 2.6.2 und Diskussion).

Mit Hilfe der PIP₂-spezifischen sogenannten Tubby-Domäne zeigten Hughes *et al.* (2007) und Nelson *et al.* (2008) erstmals unzweideutig eine über Aktivierung von Gα_q-Rezeptoren induzierte PIP₂-Depletion in kultivierten Neuronen. Die Ergebnisse aus SGC-Neuronen von Hughes *et al.* bestätigten dabei frühere Experimente, nach denen die Gα_q-gekoppelten muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) und Bradykinin B₂-Rezeptoren eine unterschiedliche PIP₂-Depletion bewirken (Gamper *et al.*, 2004; Winks *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2007). Nelson *et al.* bestätigten die mAChR-induzierte PIP₂-Depletion in hippocampalen Pyramidenneuronen und zeigten in Neuroblastomzellen, dass die Agonist-induzierte PIP₂-Depletion durch PLC abhängig von physiologischen Ca²⁺ Konzentrationen ist.

1.2 Hippocampale CA1-Pyramidenneurone als Modellsystem

CA1-Pyramidenneurone des Hippocampus vereinen drei Eigenschaften, die sie zu einem guten Modell machen, um eine durch physiologische Prozesse induzierte PIP₂-Dynamik *in situ* zu testen: Die Präsenz sowohl von Rezeptoren als auch Kanälen, die mit einer physiologischen Funktion der putativen PIP₂-Dynamik in Verbindung gebracht werden und eine gute Vitalität in Hirnschnitt-Präparationen.

Die durch Acetylcholin und Muskarin aktivierten m₁-like-GPCRs wurden im Zusammenhang mit PIP₂-Konzentrationsänderungen relativ häufig verwendet. Hippocampale CA1-Pyramidenneurone haben eine hohe Expression von m₁ (Levey *et al.*, 1995). Die mAChRs werden *in vivo* (Übersicht: Dutar *et al.*, 1995) vor allem über cholinerge Fasern der septohippocampalen Projektion aktiviert. Der prominenteste durch muskarinische (mACh) Rezeptoren regulierte Strom ist der von K⁺-Ionen getragene I_M (M steht für Muskarin), der auf Kv7- (KCNQ) Kanälen basiert (Brown & Adams, 1980; Brown & Passmore, 2009). Für KCNQ-Kanäle ist eine physiologische Funktion von PIP₂-Konzentrationsänderungen am besten belegt (Falkenburger *et al.*, 2010; Kruse *et al.*, 2012) und als Mechanismus der

Inhibition durch m_1 -like-(ACh)-Rezeptoren akzeptiert (Übersicht: Hughes *et al.*, 2007; Brown & Passmore, 2009).

Zudem sind die Pyramidenneurone des Hippocampus die wohl am besten studierten Neurone des Gehirns (Übersicht: Andersen *et al.*, 2007). Der Aufbau des Hippocampus macht ihn außerdem für die praktische Erforschung neuronaler Mechanismen besonders geeignet, da seine Neurone ein weitgehend abgeschlossenes Netzwerk bilden. Der Hippocampus ist an verschiedenen Formen der Gedächtnisbildung und Kognitiven Prozessen der Vermeidung, Ängstlichkeit, Sensomotorik, der Regulation von Stress, Aufmerksamkeit und Novität involviert (Übersicht: Andersen *et al.*, 2007).

Da im Folgenden wiederholt Bezug auf die Lokalisation von Rezeptoren und neuronalen Strukturen genommen wird, gibt der nächste Abschnitt zunächst eine Orientierung über die Neuroanatomie des Hippocampus. Danach folgt eine Beschreibung der septohippocampalen Projektion und schließlich ein Überblick über die Expression und Wirkung von m_1 -like-Ach- und anderen mutmaßlich $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptoren von CA1-Pyramidenneuronen.

1.2.1 Neuroanatomie des Hippocampus

Die Hippocampusformation besteht aus dem Ammonshorn (CA steht für *Cornu ammonis*), *Gyrus dentatus*, Subiculum, Präsubiculum, Parasubiculum und entorhinalen Cortex (Übersicht: Andersen *et al.*, 2007; Klausberger & Somogyi, 2008). Der eigentliche Hippocampus, das Ammonshorn, wird weiter in die Abschnitte CA1, CA2 und CA3 eingeteilt. Die Lage des Hippocampus im Gehirn der Ratte und sein Aufbau sind in Abb. 1.4 A gezeigt. Zum Vergleich ist in Abb. B die Lage des Hippocampus im Temporallappen des Menschen dargestellt. In der Ratte bildet der Hippocampus eine langgezogene, bananenförmige Struktur. Die Darstellung des transversalen Hirnschnitts veranschaulicht die primäre Verschaltung (Abb. 1.4 A). Die Neurone des entorhinalen Cortex projizieren über den *Tractus perforans* (engl. *perforant path*) zum *Gyrus dentatus* und der CA3-Region sowie über den *Tractus perforans* und *Tractus alveolaris* in die CA1-Region und zum Subiculum. Die Körnerzellen des *Gyrus dentatus* projizieren über die Moosfasern (engl. *mossy fibers*) zu CA3. Die Pyramidenzellen in CA3 senden ihre Axone ihrerseits als sog. Schaffer-Kollaterale in die CA1-Region. Die CA1-Pyramidenneurone projizieren zum Subiculum. Sowohl CA1- als auch Subiculum-Pyramidenneurone projizieren in die tiefen Schichten des entorhinalen Cortex zurück. Das Subiculum ist die Hauptquelle subcortikaler Projektionen des Hippocampus,

während der entorhinale Cortex den Hauptausgang zum Neocortex darstellt. Die *Fissura hippocampi* trennt den *Gyrus dentatus* von CA1-Region und Subiculum.

Die einzelnen Regionen des Hippocampus werden weiter in verschiedene Schichten eingeteilt, deren Organisation jeweils recht ähnlich ist. Abb. 1.4 C zeigt dies am Beispiel von CA1. Die Zellkörper (Somata) der primären Neurone (d.h. Neurone, die in andere Bereiche des Hippocampus oder Gehirns projizieren) liegen in der Pyramidenzellschicht. Ihre basalen Dendriten erstrecken sich in die relativ zellfreie Schicht des *Stratum oriens*. Die Axone der Pyramidenneurone entspringen ebenfalls der basalen Seite und treten nach ihrer Passage durch das *Stratum oriens* in die sich anschließende dünne Schicht des Alveus ein. Auf der gegenüberliegenden Seite erstrecken sich die apikalen Dendriten der Pyramidenneurone bis zur *Fissura hippocampi*. Sie durchziehen dabei zunächst das *Stratum radiatum*, in dem sich die CA3 zu CA1 Schaffer-Kollaterale befinden. Die äußerste Schicht bildet das *Stratum lacunosum-moleculare*, in dem sich die dünnen distalen Dendriten der Pyramidenneurone befinden. Hier enden auch Fasern aus dem entorhinalen Cortex und dem medialen Thalamus. Alle Schichten des Hippocampus enthalten zudem verschiedene Interneurone (d.h. Neurone mit lokalen, auf die jeweilige Region beschränkten Verbindungen), die etwa 10% der Neuronenpopulation des Hippocampus ausmachen (Freund & Buzsáki, 1996).

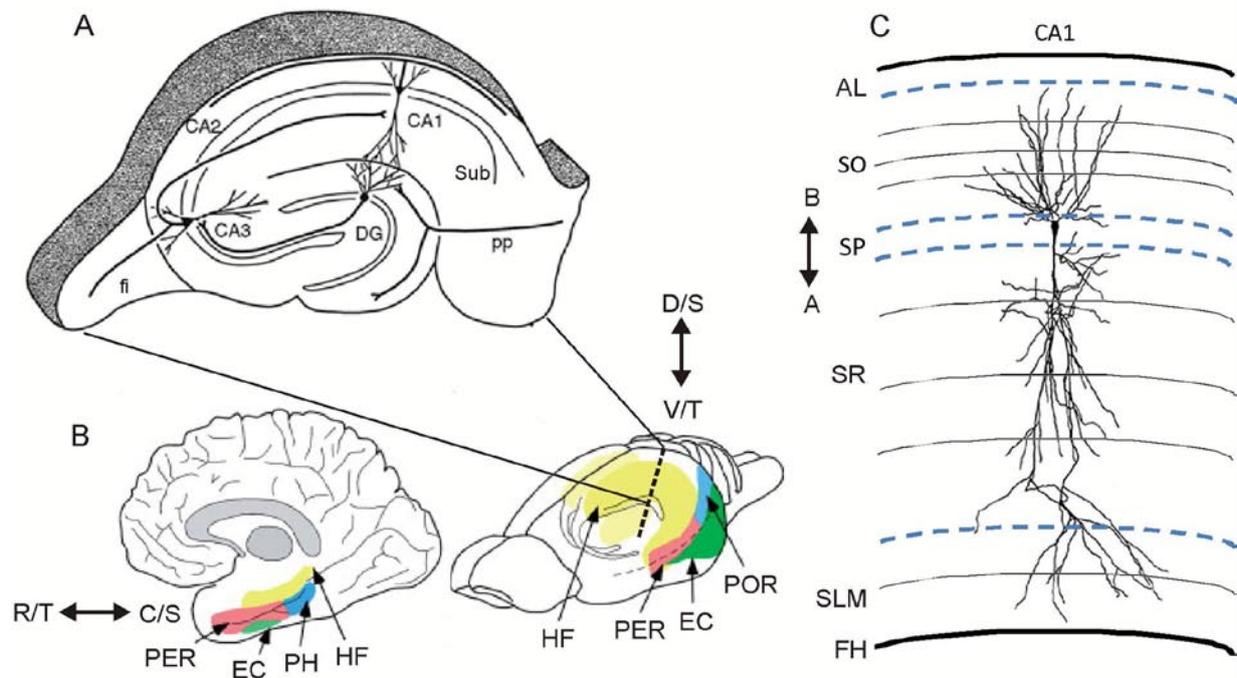


Abb. 1.4: Neuroanatomie des Hippocampus. **A)** Transversaler Hirnschnitt durch den Hippocampus der Ratte (links oben) und Lage der Hippocampusformation (HF) im Gehirn (unten Mitte). **B)** Lage der Hippocampusformation im Gehirn des Menschen (laterale Ansicht). **C)** Schichteinteilung der CA1-Region. Abkürzungen: A: apikal, AL: Alveus; B: basal, C: caudal, D: dorsal; DG: Gyrus dentatus, EC: entorhinaler Cortex; FH; *Fissura hippocampi*; fi: Fimbria, R: rostral; S: septal; SO: *Stratum oriens*, SP: *Str. pyramidale*; SR: *Str. radiatum*; SLM: *Str. lacunosum-moleculare*; PER: perirhinal; PH: parahippocampal; POR: postrhinal. pp: *perforant path*; V: ventral; A & B Modifiziert aus (Andersen *et al.*, 2007; Burwell & Agster, 2008)

1.2.2 Die Septohippocampale Projektion

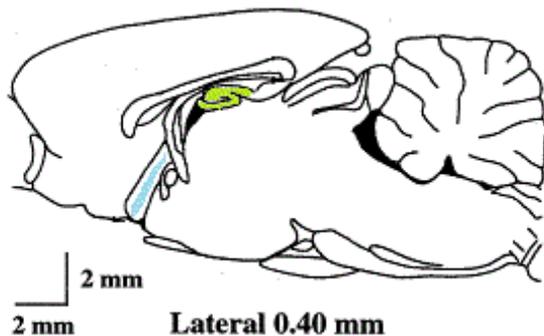


Abb. 1.5: Sagittaler Schnitt durch das Gehirn der Ratte mit Lage von Hippocampus (gün) und medialem Septum/ diagonalem Band von Broca (blau). Modifiziert aus: (Liu *et al.*, 1998).

Die Septohippocampale Projektion ist entscheidend beteiligt an der Generierung hippocampaler Theta-Oszillationen [5 – 12 Hz (Übersicht Bland & Oddie, 2001; Buzsáki, 2002; Hasselmo, 2005)]. Diese treten im Hippocampus während Phasen der Kodierung und Rekonsolidierung von Informationen, Arousal und des REM-Schlafs (engl. *rapid eye movement*) auf. Ihren Ursprung nehmen die Fasern im medialen Septum und im daran assoziierten diagonalen Band von Broca (*Stria diagonalis*), wo sich die Zellkörper der Neurone befinden [Abb. 1.5 (Übersicht: Dutar *et al.*, 1995; Buzsáki, 2002)]. In den Hippocampus treten die Fasern über drei Haupttrouten ein: die Fimbria, den dorsalen Fornix und den „supracallosal striae“ oberhalb des Balkens. Daneben wurde noch eine ventrale Route beschrieben, die den Amygdala-Komplex passiert und größtenteils im Subiculum endet.

Die Entwicklung des septohippocampalen Projektionswegs beginnt mit dem Einwandern hippocamposeptaler Fasern in das Septum (Linke & Frotscher, 1993; Supèr & Soriano, 1994; Linke *et al.*, 1995). Die ersten septohippocampalen Fasern erreichen den Hippocampus am embryonalen Tag 17. Zwar dauert die Entwicklung der Fasern bis in das Erwachsenenalter an (Vijayan, 1979), die Verbindungen sind aber 14 Tage nach der Geburt weitgehend ausgebildet und funktional (Widmer *et al.*, 2006). Dies erlaubt es, die Signaltransmission der Projektion bereits an 14 bis 28 Tage alten Tieren zu untersuchen.

Die primären Neurotransmitter der septohippocampalen Neurone sind GABA und Acetylcholin (Übersicht: Dutar *et al.*, 1995; Buzsáki, 2002). Daneben verwenden die Neurone verschiedene Neuropeptide. Die septohippocampalen Fasern stellen den größten Anteil cholinergischer Eingänge der hippocampalen Neurone und innervieren den gesamten Hippocampus. Die Verteilung innerhalb des Hippocampus ist relativ diffus, weist aber eine gewisse Präferenz zu den Pyramiden- und Körnerzellschichten und deren proximalen Dendriten sowie dem *Stratum oriens* auf (s. Cole & Nicoll, 1983; Linke & Frotscher, 1993; Dutar *et al.*, 1995 und darin enthaltene Referenzen). Während die cholinergen Fasern

sowohl primäre als auch Interneurone innervieren, terminieren GABAerge Fasern fast ausschließlich auf GABAergen Interneuronen (Buzsáki, 2002). Man nimmt an, dass über Interneurone vermittelte rhythmische inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs) zu der Modulation von Theta-Rhythmen beitragen.

1.2.3 Expression und Wirkung pyramidalen mACh-Rezeptoren

Die Freisetzung des Transmitters Acetylcholin durch septohippocampale Nervenendigungen aktiviert in den hippocampalen Neuronen vor allem metabotrope mACh-Rezeptoren (s. Dutar *et al.*, 1995). Im Hippocampus werden alle bekannten muskarinischen Rezeptoren (m_1 bis m_5) exprimiert (Flynn *et al.*, 1995; Levey *et al.*, 1995). Die sogenannten m_1 -like-Rezeptoren m_1 , m_3 und m_5 sind an $G\alpha_q$ -Proteine gekoppelt, während die m_2 - und m_4 -Rezeptoren $G\alpha_i$ -Proteine aktivieren (Wess *et al.*, 2007). In den Pyramidenneuronen bewirkt Acetylcholin vorwiegend eine Steigerung der elektrischen Erregbarkeit, die über m_1 - und m_3 -Rezeptoren vermittelt wird (Rouse *et al.*, 2000; Dasari & Gullledge, 2011). Der m_1 -Rezeptor ist der im Hippocampus und speziell in den Pyramidenneuronen am stärksten exprimierte Rezeptor. Studien an KO-Mäusen haben gezeigt, dass die Expression des m_1 -Rezeptors hinreichend für alle erregenden mAChR-Effekte in den Pyramidenneuronen ist (Dasari & Gullledge, 2011). Bei alleiniger Expression von m_3 bleibt ein Teil der mACh-Wirkungen erhalten, während m_1/m_3 -Doppel-KOs einen vollständigen Verlust der m_1 -like-Effekte aufweisen. Die m_1 - und m_3 -Rezeptoren werden sowohl im Soma als auch Dendriten der Pyramidenneurone exprimiert (Levey *et al.*, 1995). Den m_2 - und m_4 -Rezeptoren wird von allem eine Rolle in der Regulation der Transmission an Präsynapsen zugeschrieben, zu der auch die Inhibition der Ausschüttung diverser Transmitter (inklusive Acetylcholin selbst) zählt (Dasari & Gullledge, 2011).

Entgegen der Vorstellung, dass metabotrope Rezeptoren eher eine langsame modulierende Wirkung haben, hängt der Einfluss muskarinischer Rezeptoren auf die synaptische Plastizität vom exakten Timing der Eingänge ab. Gu und Yakel (2011) haben gezeigt, dass die synaptische Plastizität an der Schaffer-Kollateral-CA1-Synapse durch cholinerge Fasern mit einer Präzision im ms-Bereich moduliert werden kann. Je nach Abfolge der Eingänge kann sowohl eine Langzeitdepression (LDP) als auch eine Langzeitpotenzierung (LTP) eintreten. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch weitgehend unverstanden.

Deutlich besser erforscht ist die über $G\alpha_q$ verlaufende direkte erregende Wirkung auf die CA1-Pyramidenneurone (Übersicht: Cobb & Davies, 2005). Allerdings gibt es auch hier noch

keinen vollständigen Konsens über die molekularen Grundlagen der physiologischen Wirkung. Auf biochemischer Ebene erfolgt die Signaltransduktion über eine $G\alpha_q$ -induzierte PIP_2 -Hydrolyse durch PLC mit Bildung von IP_3 und DAG, einem Ca^{2+} Anstieg sowie u.a. der Aktivierung von PKC und MAPK (vgl. Abschnitt 1.1.2). Auf elektrophysiologischer Ebene induzieren die mACh-Rezeptoren eine langsame Depolarisation, eine Erhöhung des Eingangswiderstands, eine Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz und der langsamen Nachdepolarisation (ADP) sowie einer Inhibition der mittleren und langsamen Nachhyperpolarisation (AHP). Unstimmigkeit herrscht hier vor allem über die molekulare Identität und den Beitrag der modulierten Stromkomponenten. Die langsame Depolarisation wird vor allem auf eine Verschiebung der Aktivierungskurve von HCN-Kanälen zurückgeführt, deren Öffnung unter physiologischen Bedingungen einen Na^+ -Einstrom bewirkt (Colino & Halliwell, 1993; Young *et al.*, 2005). CA1-Pyramidenneurone haben eine hohe Expression von HCN-Kanälen, die auch das Ruhemembranpotential mitbestimmen (Maccaferri *et al.*, 1993; Surges *et al.*, 2004). Des Weiteren werden die I_M -Ströme der bereits angesprochenen KCNQ-Kanäle sowie verschiedene Ca^{2+} -Kanäle [N und L-Typ \downarrow (Liu *et al.*, 2008), R-Typ \uparrow (Tai *et al.*, 2006)], Ca^{2+} -aktivierte K^+ und K^+ -Leckströme (\downarrow) moduliert (Cobb & Davies, 2005).

1.2.4 Weitere $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren der Pyramidenneurone

Wie oben beschrieben, wurden die CA1-Pyramidenneurone vor allem aufgrund der Expression von mACh-Rezeptoren als Modellsystem ausgewählt, für die bereits eine PIP_2 -Depletion in isolierten Zellen gezeigt wurde. Die Neurone besitzen jedoch weitere $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren, die potentiell ebenfalls eine PIP_2 -Depletion bewirken können. Ein Vergleich der PIP_2 -Dynamik bei verschiedenen Rezeptoren kann zeigen, wie verbreitet die Regulation von GPCR-Effektoren durch PIP_2 ist und ob es Unterschiede im Muster der putativen PIP_2 -Depletion gibt.

Die primären Neurone des Hippocampus verwenden zur synaptischen Weiterleitung elektrischer Signale den Transmitter Glutamat (Übersicht: Andersen *et al.*, 2007). Dementsprechend findet man im Hippocampus neben ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluR) auch eine hohe Expression metabotroper Glutamatrezeptoren (mGluR). Glutamatrezeptoren der Klasse I (mGluRI) vermitteln ihre Signale primär über $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren und bewirken postsynaptisch eine Steigerung der elektrischen Erregbarkeit und synaptischen Plastizität (Übersicht: Niswender & Conn, 2010). Zu diesem

Typ zählen der mGlu₁- und mGlu₅-Rezeptor. Beide Rezeptoren werden im Hippocampus sowohl in primären als auch Interneuronen exprimiert (Fotuhi *et al.*, 1994; Shigemoto *et al.*, 1997). Die Expressionsstärke des mGlu₁ ist in den primären Neuronen in GD > CA3 >> CA1. Der mGlu₅ ist dagegen in allen Regionen reichlich vorhanden, mit einer besonders hohen Expression in CA1 (s. Referenzen in Andersen *et al.*, 2007).

Der Hippocampus ist neben der septohippocampalen Projektion das Ziel weiterer modulierender Afferenzen aus verschiedenen Teilen des Gehirns (Übersicht: Andersen *et al.*, 2007). Etliche dieser Verbindungen aktivieren ebenfalls Gα_q-gekoppelte Rezeptoren. Dem Signalweg entsprechend bewirken die meisten der Rezeptoren den m₁-like- und mGluI-Rezeptoren ähnliche electrophysiologische Effekte. Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über einige Gα_q-gekoppelte Rezeptoren, über die in der Literatur eine Expression und/oder Wirkung in der CA1-Region berichtet wurde. Die Expression in Pyramidenneuronen bedeutet in diesem Falle, dass dort eine Expression bekannt ist bzw. Hinweise dazu vorliegen. Darüber hinaus werden die meisten der Rezeptoren auch im Interneuronen exprimiert, dies ist aber nicht in allen Fällen explizit ausgewiesen.

Tabelle 1.1: Gα_q-gekoppelte Rezeptoren in der CA1-Region

Rezeptor (endogener Agonist)	Expression/Lokalisation (+ Lokalisation afferenter Fasern)	Effekte	Spezifischer Agonist (Selektivität)
m ₁ -like Acetylcholin	Pyramidenneurone	elektrische Erregbarkeit ↑ LTP/LTD	Oxo-M (mAChR) pK _i 5,1-5,6 (m ₁ ,m ₃) ²
mGluI Glutamat	Pyramidenneurone	elektrische Erregbarkeit↑ synaptische Plastizität	DHPG (mGluRI) pK _i 5,4-5,8 (R 1/5) ²
α _{1A} - Adrenorezeptor ^{1,3} Noradrenalin	Postsynapse ⁴ (<i>Paired-Pulse Ratio</i>) Interneurone ⁵ (whole-cell PC) <i>lacunosum-moleculare</i> ⁶ <i>>radiatum, pyramidale</i> ⁷	synaptische Plastizität ⁸ LTD CA3-CA1 Synapse ⁴ (elektrische Feldpotentiale) GABA/Somatostatin ⁵ Freisetzung (PC)	Methoxamin ^{4,2,9} pEC ₅₀ ⁹ 5,85
Bradykinin B ₂ ¹ Bradykinin	Pyramidenneurone ¹⁰ Soma	neuroprotektiv in Inflammation & Epilepsie ^{10,11}	Bradykinin (B ₁ & B ₂) pIC ₅₀ 9,3 ²

„atypische Dopamin _{D1} - like“ ^{12,13} Dopamin	Pyramidenneurone (alle Dopamin R) ^{14,15} <i>oriens</i> > <i>pyramidale</i> , <i>radiatum</i> ^{14,7}	Ca ²⁺ ↑ ¹⁷ , IP ₃ ↑ ¹⁶ LTD ¹⁸	SKF 83959 ^{12,13,16} Effekt max. 30μM ¹⁶ Dopamin pK _i 4,3 -7,6 ²
Histamin-H ₁ ^{1,19} Histamin	Pyramidenneurone ²⁰ moderate Expression/ spärliche Faserverteilung rostral > caudal	LTP ²⁰ Reduktion AP ²¹ + Verhaltensstudien ²⁰	2- Pyridylethylamin ^{2,22} (H ₁) pK _i 3,7 ²
5-HT _{2A-C} ²³ Serotonin	Pyramidenneurone ^{24,25} 5-HT _{2A} Str. pyramidale 5-HT _{2C} Str. lacunosum- molekulare <i>oriens</i> - <i>radiatum</i> < <i>molekulare</i> ²⁶	Eingangswiderstand↑ ²⁷ unterschwellige EPSP Amplitude↑ LTP ²⁸	DOI ²⁹ (5-HT _{2A/2C}) pK _i =8-9 ²⁹
P2Y ₁ ³⁰ ADP (ATP)	Pyramidenneurone ^{31,32} u.a. glutamaterge Prä- und Postsynapse ³³	I _M ↓ (Kultur) ³² Anionenstrom↑ ³⁴ (Kultur)	ADPβS ³² (P2Y _{1,11,12,13}) pK _i 7,3 ²
Neurokinin (NK ₁) ³⁵ (Tachikinin R) Neurokinin	Interneurone ^{36,37}	elektrische Erregbarkeit↑ ³⁵	Neurokinin pK _i 6,1 -9,3 ²

Abkürzungen: AP: Aktionspotential; EPSP: exzitatorisches postsynaptisches Potential; LDP: Langzeitdepression; LTP: Langzeitpotenzierung; PC: Patch-Clamp; R: Rezeptor.

Referenzen: (mAChR und mGluRI s. Text); 1 (Alexander *et al.*, 2011) 2 (Sharman *et al.*, 2013) 3 (Hein, 2006), 4 (Scheiderer *et al.*, 2004), 5 (Hillman *et al.*, 2009), 6 (Oleskevich *et al.*, 1989), 7 (Kwon *et al.*, 2008), 8 (Tully & Bolshakov, 2010), 9 (Bohmann *et al.*, 1993), 10 (Argañaraz *et al.*, 2004) 11 (Silva Jr. *et al.*, 2008), 12 (Rashid *et al.*, 2007), 13 (Hasbi *et al.*, 2010), 14 (Camps *et al.*, 1990), 15 (Medin *et al.*, 2011), 16 (Jin *et al.*, 2003), 17 (Ming *et al.*, 2006), 18 (Liu *et al.*, 2009), 19 (Köhler *et al.*, 2011), 20 (Lintunen *et al.*, 1998), 21 (Selbach *et al.*, 1997), 22 (Burban *et al.*, 2010), 23 (Millan *et al.*, 2008), 24 (Li *et al.*, 2004), 25 (Berumen *et al.*, 2012), 26 (Noristani *et al.*, 2010), 27 (Beck, 1992), 28 (Wang & Arvanov, 1998), 29 (Knight *et al.*, 2004), 30 (Bilbao *et al.*, 2012), 31 (Csölle *et al.*, 2008), 32 (Filippov *et al.*, 2006), 33 (Tonazzini *et al.*, 2007), 34 (Li & Olson, 2008), 35 (Ogier *et al.*, 2008), 36 (Acscády *et al.*, 1997), 37 (Sloviter *et al.*, 2001).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die physiologische Bedeutung der putativen PIP₂-Depletion für die Signaltransduktion lebender Zellen ist noch nicht endgültig geklärt. Wie bereits beschrieben, beeinflusst die Manipulation des PIP₂-Gehalts in der Plasmamembran die Aktivität einer Vielzahl von Proteinen und deren Funktion. Um die Bedeutung der Effekte einordnen zu können, müssen sie in Relation zu der physiologischen Dynamik der putativen PIP₂-Depletion gesetzt werden.

Der nächste Schritt in der Beurteilung der physiologischen Bedeutung der putativen PIP₂-Dynamik ist daher deren Erforschung an Zellen in ihrem nativen Umfeld.

Aufgrund der Vielzahl neuronaler Proteine und Prozesse, für die eine regulative Bedeutung der PIP₂-Dynamik angenommen wird, sind sie für die Erforschung der physiologischen PIP₂-Funktion besonders interessant.

Ziel dieser Arbeit war es, die rezeptoraktivierte Dynamik der PIP₂-Konzentration in der Plasmamembran hippocampaler Pyramidenneurone *in situ* zu messen. Dazu wurden fluoreszierende PIP₂-Sonden mit Hilfe von viralen Vektoren in lebenden Ratten exprimiert, um diese anschließend in akuten hippocampalen Hirnschnitten messen zu können. Als primäres Modellsystem diente die cholinerge Aktivierung PLC-gekoppelter G α_q -Rezeptoren in CA1-Pyramidenneuronen. Die Charakterisierung der rezeptorinduzierten PIP₂-Dynamik erfolgte zunächst durch die pharmakologische Aktivierung der Rezeptoren. Des Weiteren wurde die Induktion einer PIP₂-Dynamik durch weitere G α_q -Rezeptoren getestet und mit den mAChR-Ergebnissen verglichen. Um eine Korrelation der PIP₂-Dynamik mit den elektrophysiologischen Effekten zu ermöglichen, wurden separate Patch-Clamp Messungen mit allen verwendeten Agonisten durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde die synaptische Induzierbarkeit einer PIP₂-Depletion nach elektrischer Stimulation cholinergischer Fasern geprüft. Dazu wurden die entsprechenden Stimulationsprotokolle zunächst in elektrophysiologischen Messungen getestet und dann in den optischen PIP₂-Messungen angewendet.

Für die Experimente wurde primär die PIP₂-spezifische C-terminale Domäne des Tubby-Proteins verwendet. Zum Vergleich wurde die Translokation der PLC- δ -PH-Domäne in CA1-Pyramidenneuronen gemessen. Zusätzlich wurde die rezeptorinduzierte PIP₂-Dynamik in Pyramidenneuronen mit der Dynamik in *Gyrus-dentatus*-Körnerzellen verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Alle Tierexperimente wurden an weiblichen und männlichen Ratten (*Rattus norvegicus*) des Stammes Wistar durchgeführt. Das Alter der Tiere variierte je nach Experiment zwischen P0 und P32 (mit P0 = Tag der Geburt) und ist bei den Beschreibungen der einzelnen Methoden spezifiziert. Die Ratten wurden hauptsächlich der Zucht der universitätseigenen Tierhaltung entnommen und bei Bedarf bei der Firma Charles River (Köln) zugekauft. Die Zuchtpaare bestanden aus jeweils einer männlichen und weiblichen Ratte und wurden in Standardkäfigen des Typs Makrolon IV (mit hohem Deckel) gehalten. Mindestens einmal pro Woche wurden die Tiere in einen sauberen Käfig umgesetzt. Den Tieren stand Futter der Marke LASQCdiet® Rod18 (LASvendi, Soest) und auf pH 2,8-3 angesäuertes Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Der Lichtrhythmus betrug 12 Stunden, die Temperatur 20 bis 22 °C und die Luftfeuchtigkeit 50-70%. Junge Ratten wurden mindestens bis P21 bei den Eltern gehalten und zum Absetzen in Standardkäfige gesetzt. Für die stereotaktischen Operationen wurden P21 Tiere verwendet (Gewicht 43 bis 70g), welche gemäß Tierversuchsantrag bis 2 Stunden postoperativ in den S2 Labors verblieben und dann im Tierhaltungsraum separiert wurden. Ratten eines Versuchstages wurden stets aus einem Wurf entnommen und nach der Aufwachphase gemeinsam in einen Standardkäfig des Typs Makrolon III-hoch gehalten. Zur Vermeidung einer Dehydrierung und zur Unterstützung der Regeneration wurde den Tieren bis einen Tag postoperativ zusätzlich in Wasser aufgeweichtes Standardfutter und Haferflocken gegeben.

Die Durchführung aller Tierexperimente erfolgte gemäß den genehmigten Anzeigen der Tötung von Tieren zur Gewebe-/Organentnahme und Pilotstudie zur stereotaktischen Injektion (Geschäftszeichen V54-19c 20/15 c MR20/28) sowie dem Tierversuchsantrag V54-19c 2015 (1) GI MR 20/28 Nr. 62/2011 (Regierungspräsidium Gießen).

2.1.2 Chemikalien, Präparationsbesteck und Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Seelze) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Rezeptor Agonisten und Antagonisten sowie Ionenkanalblocker wurden von Tocris (Bristol, UK), Sigma-Aldrich und Biotrend (Köln) erworben. Die Substanzen wurden nach Herstellerangaben in Wasser, DMSO oder Ethanol gelöst und Stocklösungen soweit nicht anders angegeben bis zu ihrer Verwendung bei -20°C eingefroren. Die Endkonzentration von DMSO und Ethanol in den fertigen Gebrauchslösungen lag unter 1 %. Das zum Herstellen von Lösungen verwendete Wasser/ *aqua bidest.* wurde einem Reinstwassersystem entnommen (Milli-Q®, Merck Millipore).

Zellkulturmedien und Chemikalien wurden von Invitrogen (Darmstadt), Biochrom (Berlin) und Sigma-Aldrich bezogen.

Das Präparationsbesteck wurde bei Fine Science Tools (Heidelberg) gekauft.

Die verwendeten Geräte und ihre Bezugsquellen sind bei den Beschreibungen der einzelnen Methoden angegeben. Im Labor übliche Standardgerätschaften und Verbrauchsmaterialien werden nicht näher spezifiziert.

2.2 Akute hippocampale Hirnschnitte

Zur Anfertigung hippocampaler Hirnschnitte wurden juvenile Ratten (P14-P32) zunächst mit den Inhalationsnarkotika Isofluran (Baxter, Unterschleißheim) oder Sevofluran (Sevorane®; Abbott, Wiesbaden) betäubt und durch Dekapitation getötet. Da Sevofluran nicht schleimhautreizend ist und gegenüber Isofluran einen angenehmeren Geruch hat, wurde es im Zuge der Stressminimierung insbesondere bei älteren Tieren bevorzugt eingesetzt. Der Kopf der Ratte wurde in pürierte, halb gefrorene und mit Carbogen (Gemisch aus 95% O_2 und 5% CO_2 ; Air Liquide, Düsseldorf) begaste physiologische Saccharose-ACSF (Tabelle 2.1) gehalten und der Schädel entlang der sagittalen Linie eröffnet. Nach raschem herauspräparieren des Gehirns wurde es in frische pürierte Saccharose-ACSF überführt und kurz stehen gelassen (ca. 1 Minute). Danach wurden Reste des Kleinhirns entfernt und die Hemisphären mit einem Skalpell getrennt. Die Hälften wurden auf ihre mediale Schnittfläche gelegt und jeweils dorsal ein Teil des Cortex im 10° Winkel zur Vertikalen entfernt (vgl. Abb. 2.1). Beide Hemisphären wurden mit Cyanacrylat-Kleber (UHU Sekundenkleber blitzschnell Pipette, Bühl/Baden) auf die entstandene Schnittfläche geklebt, vorsichtig mit eiskalter ACSF übergossen, in die Schneidekammer überführt und mit halb

gefrorener, Carbogen begaster Saccharose-ACSF bedeckt. Mit einem Vibratom (VT1200, Leica Biosystems, Wetzlar) wurden pro Hemisphäre 8-10 je 300 µm dicke Schnitte transversaler Orientierung angefertigt. Zur Aufbewahrung wurden die Schnitte nach Hemisphären getrennt in mit 4°C Saccharose-ACSF-gefüllte Behälter überführt, in denen sie von beiden Seiten mit Lösung umspült wurden. Nach Abschluss des Schneidevorganges wurden die Behälter zur Regeneration der Hirnschnitte für 35 Minuten in ein auf 35°C temperiertes Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Präparate bis zu ihrer Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Alle Messungen wurden in Standard-ACSF durchgeführt (Tabelle 2.1). Nach Überführung der Präparate aus den Aufbewahrungsbehältern in die Messkammer wurden die Schnitte mindestens 20 Minuten mit Standard-ACSF gewaschen (ab hier nur als ACSF bezeichnet).

Tabelle 2.1 Zusammensetzung der extrazellulären Lösungen für akute Hirnschnitte (in mM)

Substanz	(Standard-)ACSF	Saccharose-ACSF
NaCl	125	87
NaHCO ₃	25	25
D-Glukose	25	25
Saccharose	-	75
KCl	2.5	2.5
NaH ₂ PO ₄	1.25	1.25
CaCl ₂	2	0.5
MgCl ₂	1	7

Der Sollwert für die Osmolarität beträgt für Standard-ACSF ca. 319 mOsm/kg sowie für Saccharose-ACSF ca. 345 mOsm/kg und wurde mit einem Gefrierpunktsmometer (Gonotec, Berlin) überprüft. Der pH-Wert wurde bei dem physiologischen Kohlensäure-Bikarbonat-Puffersystem durch die konstante Begasung mit Carbogen bei Raumtemperatur auf 7,35 eingestellt. Dazu wurde das Gasgemisch über Glasfilterkerzen (6mm, Porosität 4, Nr. 18104, ROBU Glasfiltergeräte, Hattert) bei halb gefrorener ACSF mindestens 15, bei Raumtemperatur 30 Minuten vor Verwendung in die Lösung geleitet.

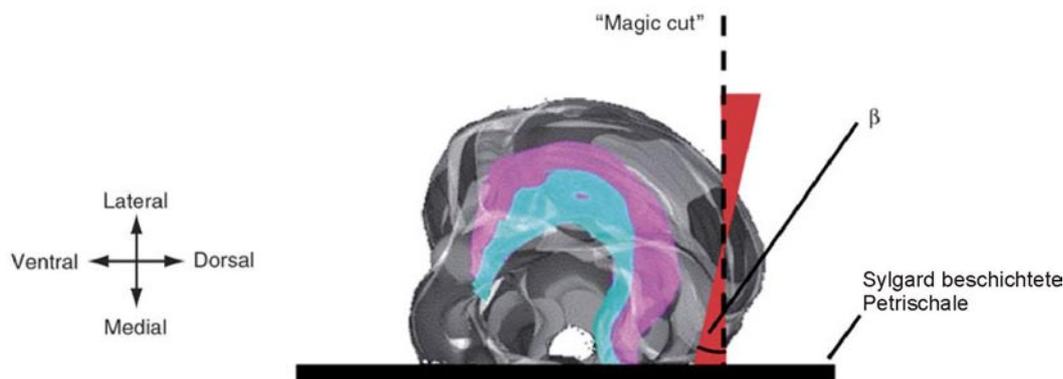


Abb. 2.1: Schnittführung des sogenannten „Blocking“ oder „Magic cuts“. Der Winkel β beträgt für die Präparation der CA1-Region $\sim 10^\circ$. In der anterior-posterioren Achse verläuft der Schnitt tangential zum Cortex [Magenta: CA1/CA3-Region; Blau: *Gyrus dentatus*; (aus Bischofberger *et al.*, 2006)].

2.3 Die Patch-Clamp-Technik

2.3.1 Prinzip der Messmethode

Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelten um 1976 eine Voltage-Clamp-Technik, für die sie 1991 mit dem Nobelpreis in Medizin ausgezeichnet wurden. Die Besonderheit gegenüber ähnlichen Verfahren liegt vor allem in der hohen Auflösung, das heißt, in dem im Vergleich zum Signal sehr geringen Rauschen. Die Patch-Clamp-Technik ermöglicht es, Ströme von nur wenigen pA zu messen, die durch einzelne Ionenkanäle fließen (Hamill *et al.*, 1981). Das Grundprinzip dieser Technik ist in Abb. 2.2 dargestellt. Eine saubere Glaspipette mit einer Öffnung von etwa 1 µm wird auf eine intakte Zelle aufgesetzt.

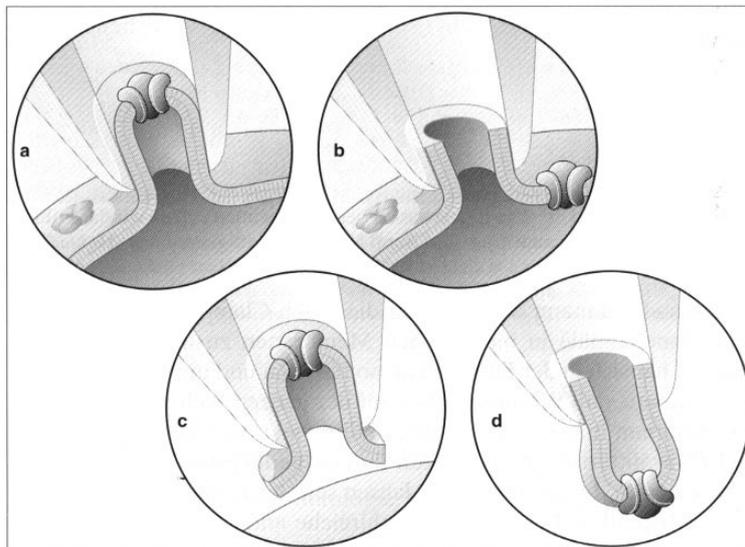


Abb. 2.2: Die Zeichnung stellt die vier wichtigsten Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik dar: a) Cell- attached b) Whole-cell c) Inside-out d) Outside-out (aus Numberger & Draguhn, 1996).

Durch leichten Unterdruck wird ein Membranstück an die Pipette gesaugt (a), wobei ein hochohmiger Kontakt zwischen Membran und Glas entsteht. Dessen Widerstand liegt im Bereich von einigen Gigaohm (Gigaseal). Dieser Widerstand gewährleistet eine effektive Rauschminderung, da die Varianz des Rauschens σ^2 proportional zu $\frac{1}{R}$ ist. Ionenkanäle in

der Zellmembran können dann in unterschiedlichen Konfigurationen untersucht werden:

a) cell-attached-Konfiguration: Die Zelle bleibt unversehrt und aktiv. Es können Ströme gemessen werden, die über das angesaugte Membranstück fließen.

b) whole-cell-Konfiguration: Wird in der cell-attached-Konfiguration ein Unterdruck an die Pipette angelegt, bricht das angesaugte Membranstück auf. Dadurch wird die gesamte Zelle

mit der Pipette elektrisch gekoppelt, so dass Ströme über die gesamte Zellmembran gemessen werden können.

c) inside-out-Konfiguration: Die Pipette wird aus der cell-attached-Konfiguration von der Zelle abgezogen. Das eingesaugte Membranstück befindet sich dann mit der zytoplasmatischen Seite zur Badlösung gerichtet in der Pipettenöffnung.

d) outside-out-Konfiguration: Wird die Pipette in der whole-cell-Konfiguration von der Zelle abgezogen, schließt sich das eingesaugte Membranstück wieder. Die vormals extrazelluläre Seite der Membran ist jetzt der Badlösung zugewandt.

In die Pipette wird ein chlorierter Silberdraht eingeführt, der mit einem hochempfindlichen Vorverstärker verbunden ist (Abb. 2.3). Der Vorverstärker liefert das Eingangssignal für den Hauptverstärker. Es wird zwischen zwei Messungsmodi unterschieden: *Voltage-Clamp* (Spannungsklemme) und *Current-Clamp* (Stromklemme).

Die Patch-Clamp-Technik ermöglicht es, im *Voltage-Clamp*-Modus die Membranspannung konstant zu halten und den dazu notwendigen Kompensationsstrom zu messen. Der Vorverstärker ist ein Strom-Spannungs-Wandler und erlaubt es, Spannungsmessungen und Strominjektion mit nur einer Elektrode durchzuführen. An den Eingängen des Operationsverstärkers (\triangleright), der sich innerhalb des Vorverstärkers befindet, liegt die Spannung der Pipette (V_{pip}), sowie die vom Experimentator vorzugebende Sollspannung (V_{soll}) an ($V_{\text{pip}} = V_{\text{soll}}$). V_{soll} wird durch den Hauptverstärker eingespeist. Ändert sich die Leitfähigkeit der Zellmembran - z.B. durch das Öffnen von Ionenkanälen - fließt ein Strom zwischen Referenzelektrode und Pipette (I_{pip}). Damit die Pipettenspannung nicht von der Sollspannung abweicht, gleicht der Operationsverstärker I_{pip} durch einen kompensierenden Strom (I_{comp}) aus ($I_{\text{comp}} = -I_{\text{pip}}$). Am Widerstand R fällt dabei eine Spannung (V_{aus}) ab, die proportional zu I_{comp} ist ($V_{\text{aus}} = I_{\text{comp}} * R$).

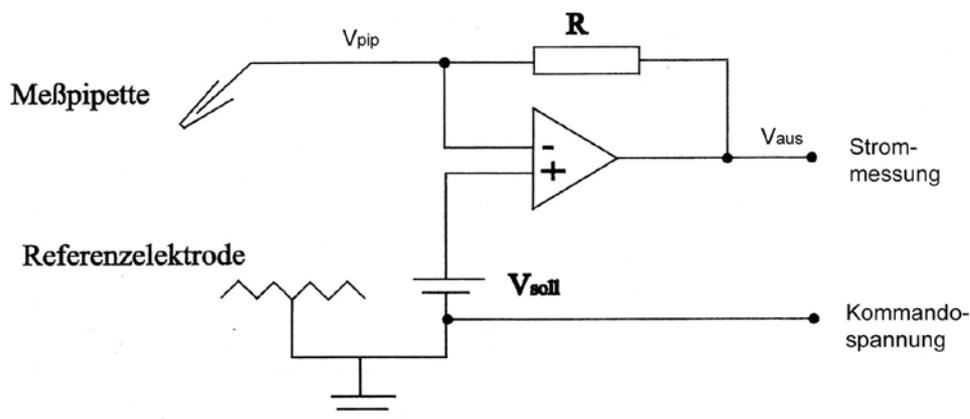


Abb. 2.3: Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Vorverstärkers. Erklärungen siehe Text.

V_{aus} wird vom Hauptverstärker ausgehend auf einem Oszilloskop analog dargestellt und parallel über einen A/D-Wandler auf einen Computer übertragen (vgl. Kap. 2.3.5). Das Signal kann zwischen 1 mV/pA und 1 V/pA verstärkt werden.

Im *Current-Clamp*-Modus wird der Strom konstant gehalten und die Membranspannung gemessen. Unter der Voraussetzung, dass infolge des Patchvorganges kein signifikanter Leckstrom generiert wurde, entspricht in der whole-cell-Konfiguration die bei $I=0$ (keine Strominjektion) gemessene Spannung dem inhärenten Membranpotential der Zelle ($V_{\text{pip}} = V_m$). Dies ist jedoch streng genommen nur kurz nach Durchbrechen der Membran gegeben, da mit der Zeit ein Lösungsaustausch zwischen Pipette und Zytoplasma stattfindet. Durch definierte negative und positive Strominjektionen kann die Zelle hyperpolarisiert bzw. depolarisiert werden um die Eigenschaften der Zelle zu analysieren und synaptische Eingänge zu simulieren.

2.3.2 Praktische Durchführung von Whole-cell-Ableitungen

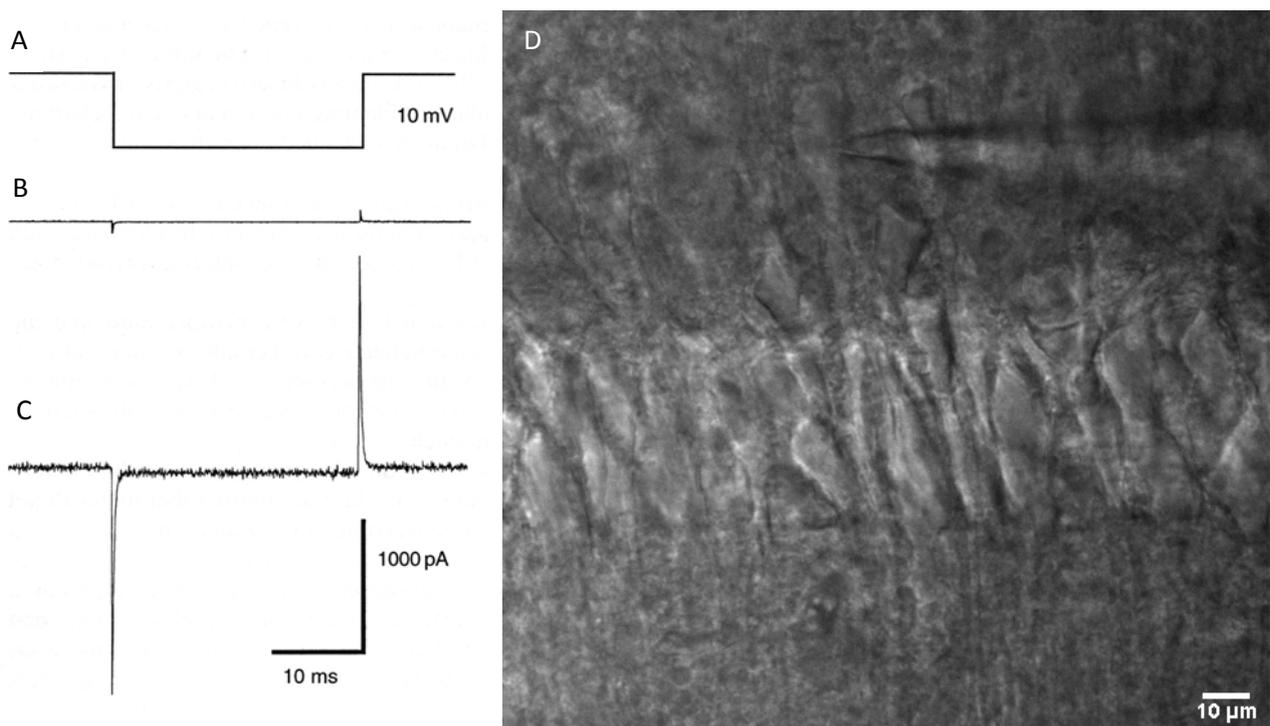


Abb. 2.4: Ablauf der Annäherung an die Zellmembran und Ausbildung der whole-cell-Konfiguration A) Testpuls B) Stromregistrierung nach Ausbildung der cell-attached-Konfiguration C) Stromregistrierung nach Durchbrechen der Membran (aus Numberger & Draguhn, 1996) D) CA1-Pyramidenneuron mit Patchpipette (hippokampaler Hirnschnitt einer P28-Ratte)

Befinden sich die Pipette und Referenzelektrode in der Badlösung, kann die Stromantwort der Pipette auf einen rechteckförmigen Kommandospannungspuls (10 mV) mit dem

Oszilloskop betrachtet werden (Abb. 2.4 A). Der Widerstand der Patchpipette kann aus dieser Stromantwort ermittelt werden.

In der cell-attached-Konfiguration befindet sich die Pipette auf der Zelloberfläche. Während sich ein Gigaseal zwischen Pipettenwand und Membran bildet, verändert sich die Stromantwort der Pipette auf den Testpuls. Der Haltestrom während des Spannungssprunges wird wegen des hohen Widerstandes (Gigaseal) minimal (Abb. 2.4 B). Dadurch sind nach Ohm'schen Gesetz bei geringer Verstärkung des Signals lediglich kapazitive Ströme am Anfang und Ende des Testpulses zu erkennen.

Das Membranstück in der Pipette lässt sich „durchbrechen“, indem ein Unterdruck an die Pipette angelegt wird. So gelangt man von der cell-attached-Konfiguration in die whole-cell-Konfiguration. Die Stromantwort auf den Testpuls ändert sich dadurch schlagartig (Abb. 2.4 C). Hierbei ist es wichtig, ein negatives Haltepotenzial einzustellen (welches annähernd dem erwarteten Ruhepotential entspricht), um die Zelle nicht zu schädigen. Die kapazitiven Ströme werden größer, da im Gegensatz zur cell-attached-Konfiguration bei jedem Spannungssprung die gesamte Fläche der Zellmembran umgeladen wird. Die große Membranfläche hat einen geringeren Widerstand als das kleine Membranstück, das sich in der cell-attached-Konfiguration in der Pipettenöffnung befindet. Folglich nimmt der Haltestrom während des Spannungspulses zu.

Die für den Umladeprozess der als Kondensator wirkenden Membranfläche benötigte Zeit hängt von dem Serienwiderstand R_s ab. Dieser setzt sich zusammen aus dem Pipettenwiderstand R_{pip} und den Membranbestandteilen innerhalb der Pipettenöffnung. Im Idealfall entspricht dieser in etwa dem Pipettenwiderstand, beträgt in der Praxis aber das zwei bis dreifache dieses Wertes. Ein Teil des Kommandopotentials fällt über R_s ab und führt zu Verzögerungen des Umladeprozesses sowie Unterschieden zwischen der gemessenen und tatsächlichen Membranspannung. Eine wichtige Voraussetzung für *Voltage-Clamp*-Messungen ist daher, dass der Serienwiderstand deutlich kleiner als der Membranwiderstand ist ($R_s \ll R_m$). Unter diesen Bedingungen kann bei kleinen, kugeligen Zellen unter der Verwendung von Kompensationsverfahren eine gute Spannungskontrolle erreicht werden. Die Anfangs-Serienwiderstände lagen bei den vorliegenden Messungen in der Regel zwischen 9-30 M Ω . Bei stark verzweigten Zellen wie Neuronen *in situ* kommt allerdings noch ein ähnliches Phänomen hinzu, dass man als *Space-Clamp-Problem* bezeichnet. Hier wirken die engen Verzweigungen wie Serienwiderstände innerhalb der Zelle und erlangen ein beträchtliches Ausmaß gegenüber dem Membranwiderstand (vgl. Abb. 2.5). Aus diesem Grund besteht bei diesen Zellen in der Peripherie nur eine unzureichende Kontrolle über das Membranpotential.

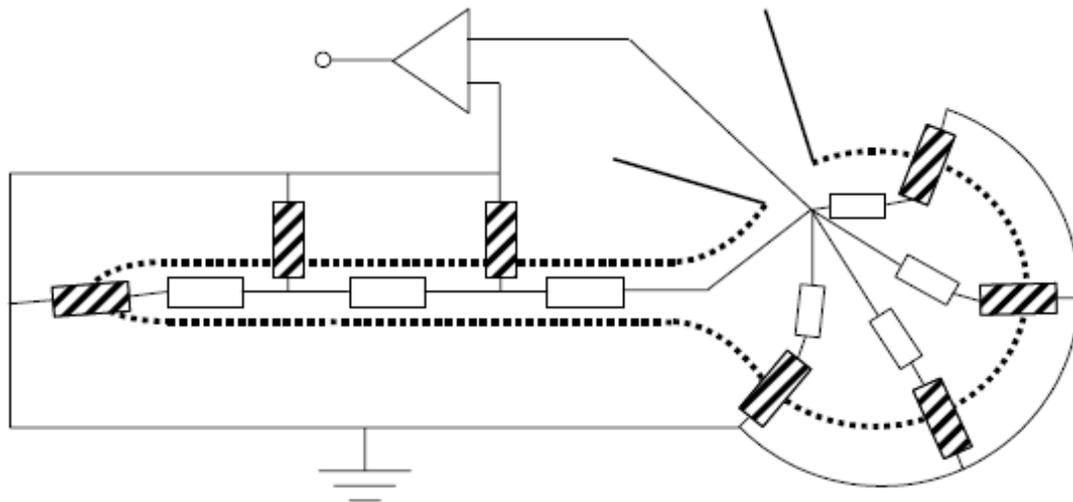


Abb. 2.5: Vereinfachtes Modell einer Zelle mit langen Ausläufern oder starken Verzweigungen. In solchen Zellen gewinnt der Widerstand zwischen Teilen des Zytoplasmas und der Pipette ein beträchtliches Ausmaß und gewinnt gegenüber dem Membranwiderstand (schraffiert) an Bedeutung. Die Folge ist eine unzureichende Spannungsklemme in der Peripherie (aus Molleman, 2003).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Patch-Clamp-Daten sind soweit nicht anders angegeben im *Current-Clamp-Modus* gemessen worden. Zwar entfällt in diesem Modus das Problem der Spannungsklemme, aber auch hier sind Membranwiderstand und Pipetten- bzw. Zugangswiderstand in Serie geschaltet. Der gemessene sogenannte Eingangswiderstand setzt sich folglich zusammen aus R_m und R_s . Ein schlechter Zugang zum Zytoplasma kann über den Serienwiderstand zu einem beträchtlichen Spannungsabfall bei Strominjektion führen, weshalb $R_s \ll R_m$ sein sollte. Kritisch ist vor allem ein sich während der Messung stark verändernder Serienwiderstand. Dies kann vor allem durch „*Resealing*“, also einem Wiederverschließen der Membran unter der Pipettenöffnung während längerer Messungen geschehen. Der Serienwiderstand wurde daher nicht kompensiert, aber nach durchbrechen der Membran sowie vor und nach einer Messung über den Testpuls im *Voltage-Clamp-Modus* überprüft. Messungen, innerhalb dessen sich der Serienwiderstand stark änderte ($>40\%$), wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Des Weiteren wurden nur Neurone berücksichtigt, deren Membranpotential zu Messbeginn mindestens -60 mV betrug.

2.3.3 Patchpipetten und Intrazellulärlösung

Gemessen wurde mit filamentierten und unfilamentierten Borosilikatglaskapillaren (AD 1 mm, ID 0,78 mm, GB100FT-8P und GB100T-8P, Science Products, Hofheim) sowie unfilamentiertem Quarzglaskapillaren (AD 1 mm, ID 0,7 mm, Q100-70-75) die mit einem Sutter-P2000-Puller (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) gezogen wurden. Der Widerstand der mit IS (Tabelle 2.2) gefüllten Pipetten in ACSF (Abschnitt 2.2) lag zwischen 3-4 M Ω .

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Intrazellulärlösung (IS) für Neurone (in mM)

Substanz	IS
K-Gluconat	135
KCl	20
MgCl ₂	2
Na ₂ -ATP	2
Na ₂ -GTP	0.3
HEPES	10
EGTA	0.1

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,2 eingestellt

2.3.4 Aufbau des Patch-Clamp Messstands

Für die elektrophysiologischen Messungen wurden die Hirnschnitte mit einer weitlumigen Pasteurpipette in die Messkammer eines Patch-Clamp-Messstands (engl. *Setup*) überführt. Dort wurden sie kontinuierlich mit frischer carbogenbegaster ACSF umspült. Zur Stabilisierung der Messungen wurden sie durch ein Grid aus einem mit vereinzelt Zahnseidefäden umspannten Platinring in Position gehalten. Das *Setup* (Abb. 2.6) war auf einen schwingungsgedämpften Tisch (Technical Manufacturing Corporation, Peabody MA, USA) montiert und von einem Faradaykäfig umgeben. Das aufrechte Mikroskop (BX51WI, Olympus, Hamburg) stand auf einem speziellen Tisch, mit dem man es unabhängig vom Objektisch verschieben konnte (angefertigt in der Feinmechanikwerkstatt der Universität Marburg nach Plänen der Physiologie der Universität Freiburg). Das Mikroskop war mit einem differentiellen Interferenzkontrast (DIC) ausgestattet und mit einer infrarotsensitiven Kamera (TILL Photonics, Gräfelfing) verbunden. Das Bild der Kamera wurde auf einem schwarz-weiß Röhrenbildschirm (CEM-15A, CBC GmbH, Düsseldorf) projiziert. Zwei Mikromanipulatoren (Luigs und Neumann, Ratingen) waren zu beiden Seiten des Mikroskops auf Säulen (Linos/Qioptiq Photonics, Göttingen) direkt auf dem schwingungsgedämpften Tisch montiert und wurden über Joysticks (Märzhäuser, Wetzlar) gesteuert. Einer der Manipulatoren diente der Positionierung einer lokalen Applikation oder Stimulationselektrode, der andere der Positionierung der Messelektrode. Die Messelektrode war direkt an den Vorverstärker (engl. *headstage*) angeschlossen, der die Daten an den Patch-Clamp-Verstärker (HEKA EPC10 USB, Lambrecht) übermittelte. Der Verstärker besaß einen integrierten A/D-Wandler und übermittelte die Daten über einen USB-Anschluss an den Computer (Dell, Frankfurt), der den Verstärker über die Patch-Master-Software steuerte. Die Datenspurten konnten zusätzlich auf dem Bildschirm eines an den Verstärker

angeschlossenen Oszilloskops (TDS 1001B, Tektronix) dargestellt werden. Der Pipettenhalter war über einem Schlauch mit einem Druckluftregulator (ALA Scientific Instruments, Farmingdale NY, USA) verbunden, mit dem ein definierter Überdruck auf die Pipette gegeben werden konnte (ca. 0,06 -0,07 bar). Dies ist wichtig, damit die Pipette auf dem Weg durch die Badlösung und den Hirnschnitt nicht verstopft, aber auch die Nervenzellen nicht durch zu hohen Druck verletzt werden. Als Referenzelektrode diente ein AgCl-Pellet (Science Products, Hofheim).

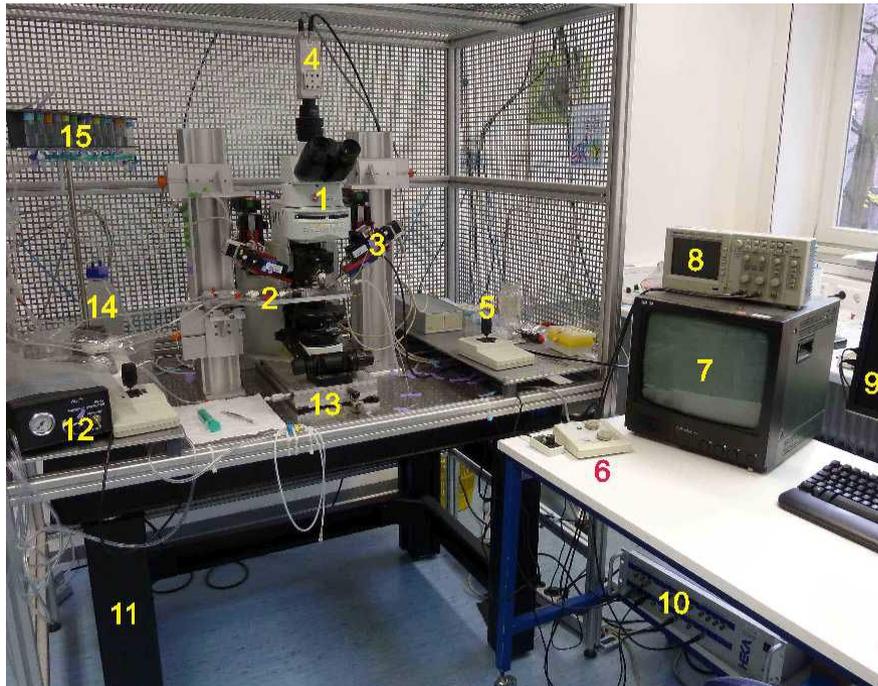


Abb. 2.6: Aufbau des Patch-Clamp-Messtands. 1) Mikroskop 2) Objektisch 3) Mikromanipulator 4) Infrarotkamera 5) Joystick 6) Kontrolleinheiten von Mikroskopbeleuchtung und Infrarotkamera 7) Kamerabildschirm 8) Oszilloskop 9) Computerbildschirm 10) Patch-Clamp-Verstärker 11) schwingungsgedämpfter Tisch 12) Druckluftregulator 13) Mikroskoptisch 14) Absaugungsflasche 15) Applikationssystem (Vorratsbehälter)

2.3.5 Datenerfassung und Analyse

Die Software Patch-Master (Version 2.43, HEKA, Lambrecht) diente neben der Steuerung des Verstärkers auch der Erfassung von Strom und Spannungsspur. Mit einem Bessel-Tiefpassfilter wurden alle Frequenzen über 2,9 kHz herausgefiltert. Die Digitalisierung der Daten durch den Analog/Digitalwandler erfolgte mit einer Frequenz von 20 kHz. Die Benutzeroberfläche der Software beinhaltet neben einer kompletten Übersicht der Verstärkerparameter die Darstellung der Daten in einem virtuellen Oszilloskop, der Messprotokolle sowie die Möglichkeit einer ersten Analyse der Daten während der Messung („Online-Analyse“). Letztere wurde genutzt, um zeitnah erste Informationen u.a. zur

Zugangsqualität sowie Verlauf von Membranpotential und Eingangswiderstand zu erhalten. Für eine umfassendere Auswertung wurden die Daten in das Programm Igor Pro (Version 6.03A, WaveMetrics, Portland, OR USA) importiert.

2.4 Perfusionssysteme

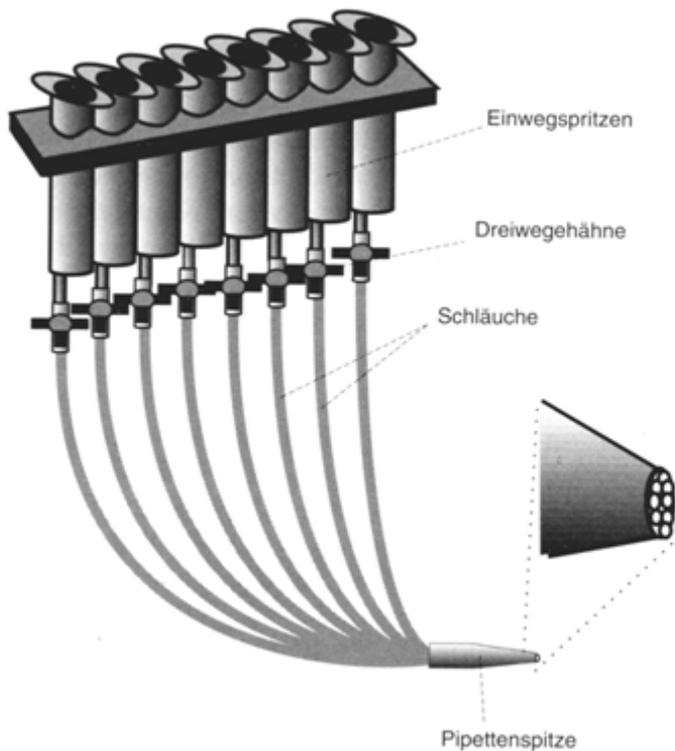


Abb. 2.7: Perfusionssystem für die Applikation verschiedener Testsubstanzen. Die in dieser Arbeit verwendeten Systeme für die lokale Perfusion besaßen an der Spitze zusätzlich eine aufgesteckte Applikationsnadel (aus Numberger & Draguhn, 1996)

Die *submerged*-Messkammern waren konzipiert, um einen gleichmäßigen und raschen Lösungsaustausch zu gewährleisten. In diesem Messkammertyp liegen die Hirnschnitte auf dem Boden der Kammer knapp unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche und werden einseitig umspült. Um den pH-Wert der ACSF-basierten Lösungen konstant zu halten und die Flüssigkeit mit Sauerstoff anzureichern, wurde in die Vorratsgefäße über Glasfilterkerzen kontinuierlich Carbogen eingeleitet. Alle Messungen fanden bei Raumtemperatur statt. Durch eine Absaugvorrichtung wurde das Badlösungs-niveau konstant gehalten. Um die Hirnschnitte verschiedenen Substanzen aussetzen zu können, wurden Applikationssysteme ähnlich dem in Abb. 2.7 verwendet. Um ein möglichst geringes Totvolumen und damit einen schnellen Wechsel zu erzielen, wurden die verschiedenen Lösungen vereinzelt an die Badkammer herangeführt. Bei den lokalen Applikationssystemen wurden die Leitungen

kurz vor dem Bad am Mikromanipulator zusammengeführt und dann über eine schmale Kanüle (MicroFil MF28G-5, 250 μm ID, World Precision Instruments, Berlin oder TSP200350, 200 μm ID, BGB Analytik AG, Boeckten) an die CA1-Region der Hirnschnitte herangebracht. Der Lösungsaustausch an der Spitze der Kanüle erfolgte in 1-2 s.

2.5 Elektrische Stimulation

Die elektrische Stimulation der synaptischen Ausschüttung endogener Transmitter erfolgte in Anlehnung an Protokolle von Cole & Nicoll (1983, 1984) und Morton & Davies (1997). Die Stimulationselektrode wurde im *Stratum oriens* der CA1-Region platziert (Abb. 2.8) und die Reaktion eines CA1-Pyramidenneurons entweder mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik (s. Kapitel 2.3) oder der fluoreszenzoptischen Messung einer PIP₂-Sonde (Kapitel 2.6) gemessen.

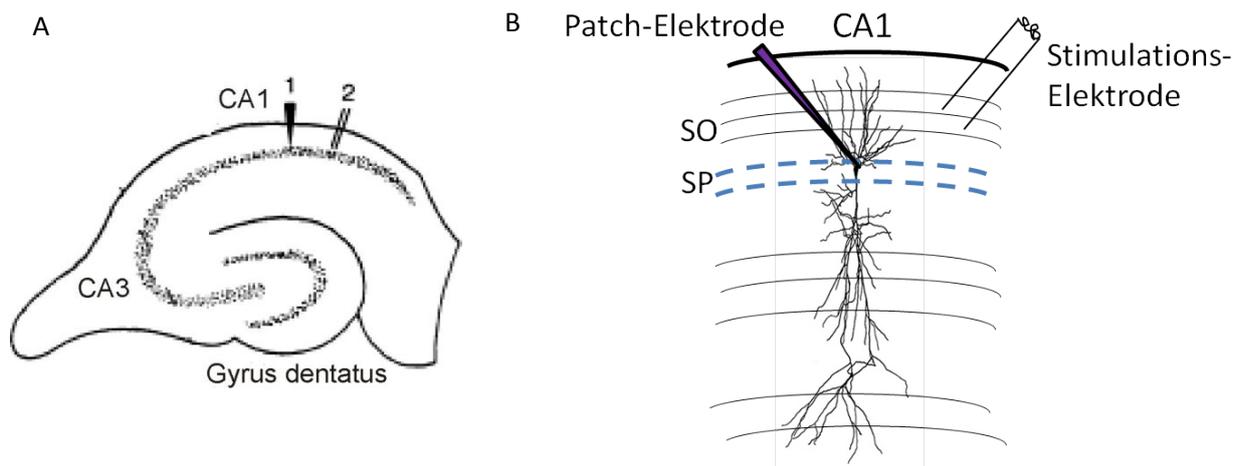


Abb. 2.8: Schemazeichnung der Positionen von Stimulations- und Patch-Elektrode. A) Übersicht eines hippocampalen Hirnschnitts mit Messpipette (1) und Stimulationselektrode (2, aus Morton & Davies, 1997). B) Ausschnittsvergrößerung der CA1-Region; SO *Stratum oriens*, SP *Stratum pyramidale*.

2.5.1 Grundlagen der elektrischen Stimulation

Die elektrische Stimulation erregbarer biologischer Membranen in akuten Präparaten erfolgt in der Regel durch Strominjektion (für eine Übersicht s. Merrill *et al.*, 2005). Die wesentlichen Vorteile der Verwendung von Strom gegenüber der Spannung sind die bessere Kontrolle der Parameter und damit auch der Reproduzierbarkeit. Dabei werden zwei Elektroden an das Gewebe herangebracht, zwischen denen Strom durch das physiologische Medium (Elektrolyt) fließt. Als eigentliche Stimulationselektrode dient dabei zumeist die

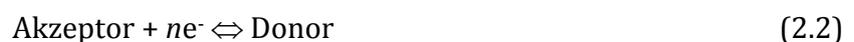
Kathode, während die Anode als Gegenstück eingesetzt wird und sich je nach Versuchsansatz nicht immer in direkter Umgebung des Zielareals befindet. Wird (negativer) Strom über die Kathode injiziert, bewirkt dies eine Hyperpolarisation der (positiv geladenen) extrazellulären Seite der Membranen in der direkten Umgebung der Elektrode, was einer intrazellulären Depolarisation entspricht. Übersteigt die Depolarisation die Aktionspotentialschwelle z.B. eines Axons, kann es zur Auslösung eines Aktionspotentials kommen und damit zur stabilen Weiterleitung der elektrischen Erregung.

Die Auswahl eines geeigneten Protokolls und Materials für die Stimulationsexperimente bedarf dabei der Berücksichtigung verschiedener Aspekte. So muss die Stimulation nicht nur effizient sein, um eine erfolgreiche Erregung zu erzielen, sondern auch möglichst gewebe- und elektrodenschonend. Oft muss im Sinne valider Resultate ein Kompromiss zwischen den unterschiedlichen Anforderungen gefunden werden.

Eine wichtige Grundlage ist hierbei die eigentliche Übertragung von elektrischer Ladung bzw. Potentialänderungen in der Grenzregion von Elektrode und Elektrolyt. Unter Ruhebedingungen (Strom = 0) stellt sich zwischen Elektrode und Elektrolyt ein elektrochemisches Gleichgewichtspotential ein, dass sich aus der Nernst-Gleichung (2.1) errechnen lässt. Die Nernst Gleichung stellt das Gleichgewichtspotential der Elektrode in Bezug zur Konzentration der Ionen eines Redoxpaares in der Lösung.

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{Z_e F} \ln \frac{a_{\text{Ox}}}{a_{\text{Red}}} \quad (2.1)$$

Mit E Elektrodenpotential, E° Standardelektrodenpotential, R allgemeine Gaskonstante, T absolute Temperatur, Z_e Äquivalenzahl, F Faraday-Konstante und a Aktivität des betreffenden Redox-Partners. Fließt nun Strom in die Elektrode, so wirkt die Grenzschicht zunächst als Kondensator und es kommt zu einer Umladung entlang dieser elektrochemischen Doppelschicht (die Elektrode wird polarisiert). Wie viel elektrische Ladung ($Q = I \cdot t$) über diesen Mechanismus umgesetzt werden kann, hängt wesentlich von den kapazitiven Materialeigenschaften und der Geometrie (effektiven Fläche) der Elektrode ab. Die Differenz des hierbei erreichten Elektrodenpotentials zum Gleichgewichtspotential wird auch als Überspannung bezeichnet (gemessen in Relation zu einer Referenzelektrode). Erreicht die Überspannung das Redoxpotential eines gegebenen Oxidations-Reduktions-Paares, kommt es zur Übertragung von Elektronen in das Medium durch die Reaktion:



(Elektrolyse, auch Faraday'sche Redoxreaktion) wobei n der Anzahl transferierter Elektronen entspricht. Für die Vereinbarkeit einer Reaktion mit der experimentellen Stimulation ist entscheidend, ob dabei toxische Produkte entstehen und der Strom

regeneriert werden kann. Daneben kann die Änderung des pH-Wertes durch die Entstehung von H⁺- und OH⁻-Ionen negative Einflüsse auf das Gewebe haben. Auch die Elektrode selbst kann z.B. durch Korrosion Schaden nehmen. Die jeweilige Kinetik der einzelnen Redoxreaktionen entscheidet darüber, ob ein gegebener Prozess reversibel ist. Irreversibel ist die Elektrolyse vor allem dann, wenn das Produkt aus der Umgebung der Elektrode weg diffundiert. So kommt es in wässriger Umgebung unter Umständen zum Ausgasen von Wasserstoff an der Kathode und Sauerstoff an der Anode. Einen akzeptablen Beitrag zur Ladungsübertragung kann eine Reaktion nur leisten, wenn sie reversibel und gewebekompatibel ist. Eine Sonderstellung nimmt die Eigenschaft der sogenannten Pseudokapazität einiger Metalle ein (Gileadi *et al.*, 1975). Hierbei findet zwar ein elektrolytischer Elektronentransfer statt, aber das Produkt bleibt an die Oberfläche gebunden und kann bei einer Umkehr der Stromrichtung wieder als Donor fungieren. Die effektive Kapazität solcher Metalle kann um ein zehnfaches höher sein als durch die alleinige Umladung der elektrochemischen Doppelschicht [z.B. Platin, 294 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ geometrischer Fläche (Rand & Woods, 1971)].

Die Versuchsbedingungen sollten also idealerweise so gestaltet sein, dass eine hohe Überspannung vermieden wird und Strom vor allem in kapazitive Umladungen und reversible Redoxreaktionen fließt. Neben der Auswahl eines möglichst inerten, korrosionsresistenten und gewebeverträglichen Materials (z.B. Edelmetalle und spezielle Legierungen) können die Stimulationsprotokolle einen wesentlichen Beitrag leisten. Häufig werden Pulsprotokolle eingesetzt, die aus kurzen, repetitiven Einzelpulsen zusammengesetzt sind. Im einfachsten Falle wird ein monophasischer Puls in einer definierten Frequenz wiederholt. Die Pulsdauer beträgt meist einige zehn- bis hundert Mikrosekunden. Dies dient nicht nur der Reduktion unerwünschter Effekte, sondern liegt auch daran, dass darüber hinaus die für die Auslösung eines Aktionspotentials benötigte Ladung eher ansteigt. Gründe hierfür sind u.a. Akkomodationsprozesse (gesteigerte Inaktivierung der Na⁺-Kanäle) und die nur teilweise Beteiligung der Ladungsumverteilung in die Änderung des Membranpotentials (Plonsey & Barr, 1988; Warman *et al.*, 1992). Monophasische Pulse sind sehr effektiv für die elektrische Stimulation von biologischen Membranen, können allerdings auch das Gewebe stark schädigen. Selbst bei rein kapazitiven Strömen ist das Elektrodenpotential nach Ende des Pulses nicht sofort wieder auf dem Ausgangswert, sondern wird allmählich über (potentiell schädliche) Redoxreaktionen entladen. Der verzögerte Abbau der Überspannung führt nicht nur zu einer verlängerten Wirkung auf die Membranen, sondern kann auch in einer schleichenden Erhöhung des Elektrodenpotentials von Puls zu Puls resultieren. Um diese Probleme zu reduzieren, haben

biphasische Pulsprotokolle neben der stimulierenden kathodischen noch eine anodische Phase, bei der die Stromrichtung umgekehrt wird um das Elektrodenpotential wieder zum Ausgangswert zu führen. Abb. 2.9 A zeigt die Strukturierung eines symmetrischen biphasischen Pulsverlaufs. Bei symmetrischen Pulsen führt allerdings jeder in der kathodischen Phase an irreversible Redoxreaktionen verlorene Strom zu einem Überschuss in positiver Richtung und dem Risiko der Elektrodenkorrosion. Auch kann der erwünschte stimulierende Effekt durch ein solches Protokoll abgeschwächt werden. Mögliche Lösungen bestehen in der Anpassung der anodischen Phase oder dem Einbau einer kurzen Pause zwischen den Pulspaaren (engl. interphase delay). Abb. B fasst die Vor- und Nachteile einiger Pulsformen zusammen. Abb. C bis E veranschaulichen die verschiedenen elektrochemischen Prozesse, die während der Stimulation an der Kathode ablaufen können.

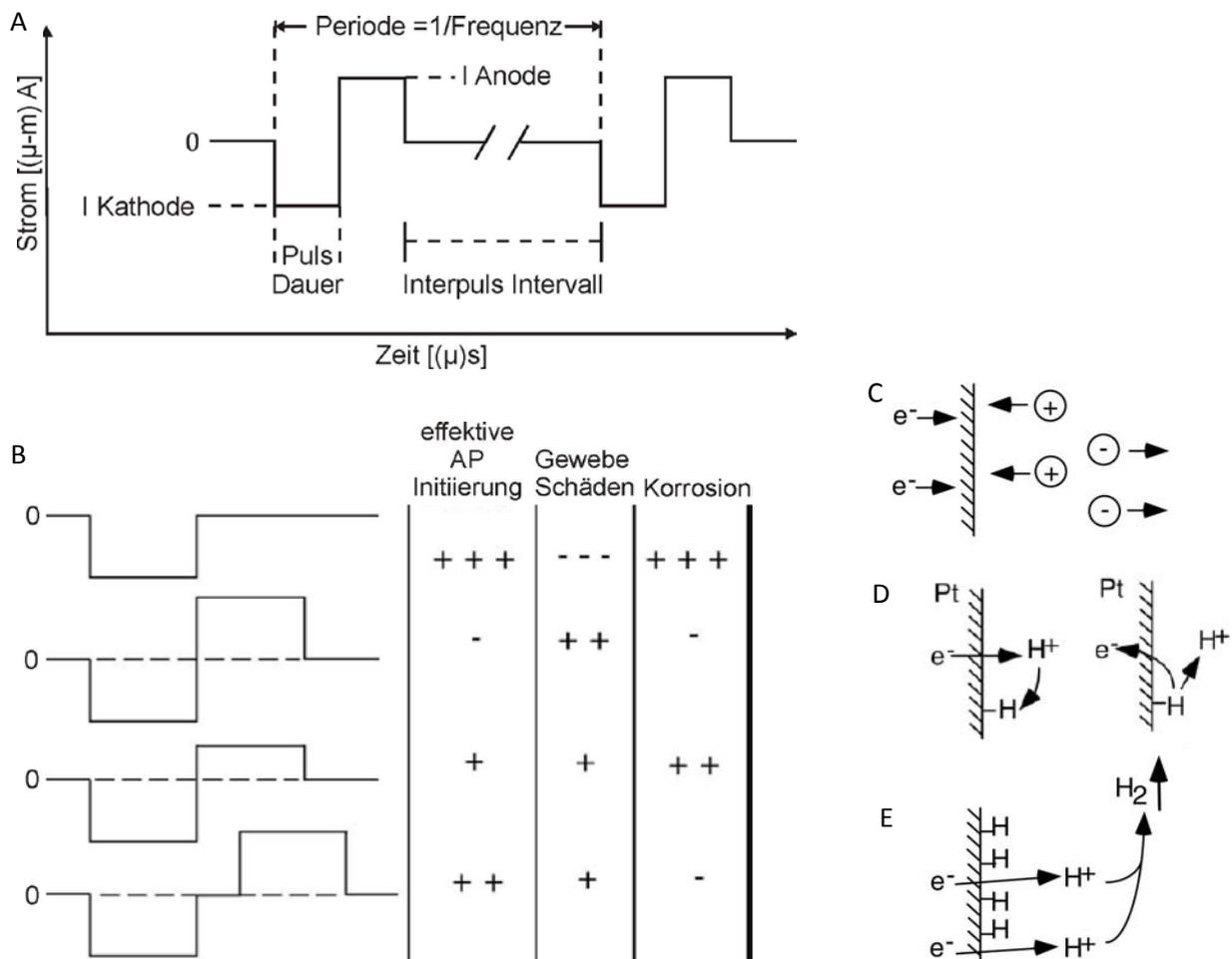


Abb. 2.9: Pulsformen und elektrochemische Prozesse bei Strominjektion. A) Verlauf und Parameter eines einzelnen biphasischen Strompulses in einer Stimulationssequenz. B) Bewertung ausgewählter Verlaufsformen hinsichtlich der 3 Hauptkriterien. C-E) elektrochemische Prozesse an einer (Platin-) Elektrode bei kathodischer Strominjektion: C) kapazitive Ladungsumlagerung, D) Pseudokapazität, E) Reduktion eines Akzeptors und Elektronenverlust [hier durch Ausgasen von Wasserstoff (modifiziert aus Merrill *et al.*, 2005)].

2.5.2 Praktische Durchführung der elektrischen Stimulation

In dieser Arbeit wurden bipolare Edelstahlelektroden mit einem Durchmesser von 50 μM (Nr. CE2F75, FHC Inc., Bowdoin ME, USA) verwendet. Alternativ wurden in einigen Experimenten auch mit 4 M NaCl (pH 7,4, HEPES-Puffer) gefüllte Glasmikropipetten (AD 1 mm, ID 0,78 mm, GB100T-8P, Science Products, Hofheim) mit einer AgCl-Elektrode oder eine bipolare konzentrische Platin/Iridium-Edelstahlelektrode eingesetzt (Nr. CBAPB75, FHC Inc.). Im Kapitel Ergebnisse ist jeweils spezifiziert, mit welcher Elektrode die Resultate erhalten wurden. In Anlehnung an die Literatur zur Stimulation cholinergere „slow EPSPs“ (s.o.) wurden biphasische symmetrische und asymmetrische 20-200 μs Pulse in einer Frequenz von 20-50 Hz, einer Intensität von 0,1 – 10 mA und bis zu 100 Wiederholungen getestet. Das am häufigsten eingesetzte Protokoll bestand aus 100 Pulsen zu 40 Hz mit 1 mA (Kathode) zu 0,5 mA (Anode) Strom und 200 μs Dauer. Bei Verwendung der AgCl-Elektrode wurden auch monophasische Protokolle getestet.

Soweit nicht anders angegeben, wurde die synaptische Transmission über AMPA/Kainat-Rezeptoren durch 4 μM NBQX, NMDA-Rezeptoren durch 50 μM D-AP5, GABA_A- durch 50 μM Picrotoxin und GABA_B-Rezeptoren durch 1 μM CGP 55845 blockiert. In einem Teil der Experimente wurde der Acetylcholinesterase-Hemmer Physostigmin (Eserin, 10 μM) eingesetzt, um den Acetylcholinabbau zu hemmen und die Wirkung des Transmitters zu verstärken. Die Substanzen wurden der Bad- bzw. lokalen Applikation zugegeben. In Patch-Clamp-Experimenten wurde zur Erfolgskontrolle das Membranpotential der Zellen stetig überwacht sowie die elektrischen Eigenschaften der Zellen vor und – mit einigen Sekunden Abstand – nach jeder Stimulation durch Strominjektion über die Patch-Pipette getestet. Damit wurden z.B. Informationen über Eingangswiderstand und Adaptationsverhalten gewonnen (vgl. Ergebnisse).

2.6 Konfokalmikroskopische Messung der PIP₂-Dynamik

2.6.1 Prinzip der Messmethode

Stauffer *et al.* beschrieben 1998 erstmals eine Technik, die es erlaubt die Dynamik der PIP₂-Konzentration der Plasmamembran in lebenden Zellen zu verfolgen. Sie ermöglicht die Arbeit mit weitgehend nativen Membranen, bei der im Gegensatz zu anderen Verfahren (z.B. Antikörperfärbung) keine Fixierung der Zellen notwendig ist. Damit wurde die experimentelle Voraussetzung geschaffen, die Dynamik der PIP₂-Konzentration direkt mit dem Verhalten von Ionenkanälen und Daten intrazellulärer Signalkaskaden (z.B. Second Messengern) zu korrelieren. Die Methode beruht auf der Kombination einer PIP₂-spezifischen Lipidbindedomäne mit einem fluoreszierenden Protein (für eine Übersicht s. Várnai & Balla, 2008). Die verwendeten Domänen entstammen Proteinen, zu deren natürlicher Funktion die Bindung an Lipide zählt, etwa weil Sie durch dessen Konzentration reguliert bzw. lokalisiert werden (vgl. Abschnitt 2.6.2). Abb. 2.10 veranschaulicht die Funktionsweise der resultierenden heterolog exprimierten Messsonden.

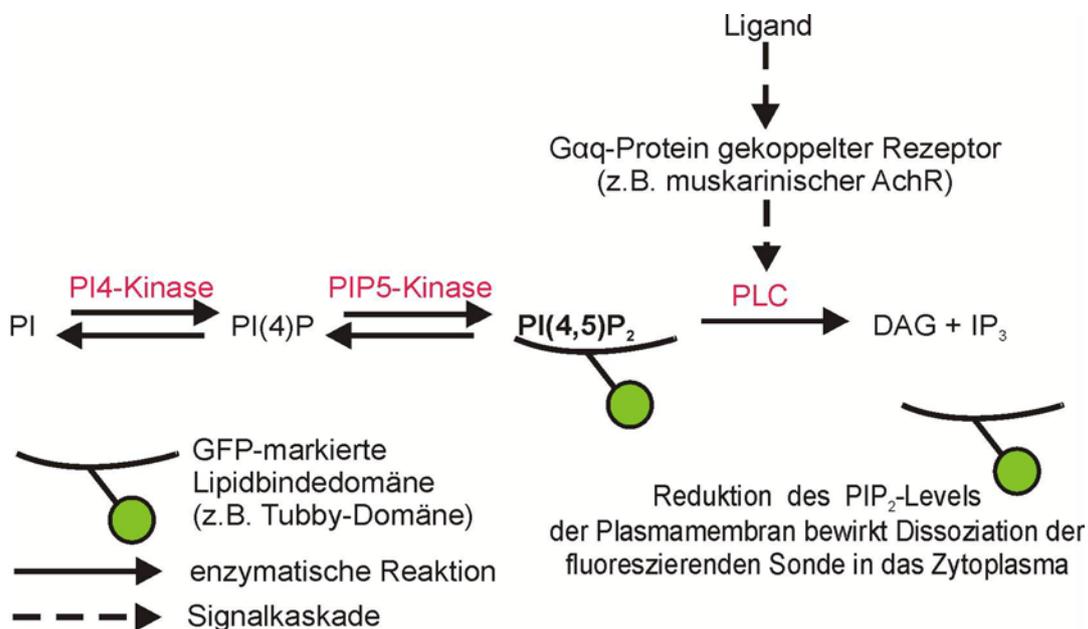


Abb.2.10: Funktionsprinzip der GFP-markierten PIP₂-Sonden. Die Bindung und damit Lokalisation der Sonden zur Plasmamembran ist ein Maß des PIP₂-Levels in der Membran. (rot: Enzyme)

Die PIP₂-Konzentration in der Plasmamembran wird durch die Aktivität von Kinasen und Phosphatasen bestimmt und steht in einem metabolischen Gleichgewicht (vgl. Kapitel 1.1.1). Unter Ruhebedingungen wird ein Großteil der PIP₂-Sonden durch ihre spezifische Bindung an das Lipid an der Plasmamembran gehalten [Abb. 2.10 Mitte (vgl. Várnai & Balla, 2008)].

Aufgrund der GFP-Markierung zeigt sich dies im mikroskopischen Bild durch eine hohe Fluoreszenzintensität entlang der Plasmamembran. Sinkt die PIP₂-Konzentration bedingt durch eine von einer Signalkaskade ausgelösten Spaltung des Lipids, verlieren die Sonden ihre Bindungspartner in der Plasmamembran und diffundieren in das Zytoplasma. Im Mikroskop erhöht sich folglich die Fluoreszenzintensität im Zytoplasma und sinkt im Bereich der Membran. Die Spaltung kann u.a. durch die Bindung eines Transmitters an seinen G α_q -gekoppelten Rezeptor induziert werden (vgl. Abb. 2.10 & Abschnitt 1.1.2). Steigt die PIP₂-Konzentration durch enzymatische Neubildung wieder an (vgl. Suh & Hille, 2002; Várnai & Balla, 2006), so werden die spezifischen Sonden wieder an die Plasmamembran rekrutiert und das Fluoreszenzsignal an der Membran regeneriert sich. Der Grad der Membranassoziation der Sonden ist daher ein direktes Maß für den PIP₂-Gehalt der Membran.

Die Sonden stehen dabei immer in einem Gleichgewicht von membrangebundenen und ungebundenen Molekülen, das von ihrer Spezifität und Affinität bestimmt wird (vgl. Várnai & Balla, 2008). Die Spezifität ist die nichttriviale Voraussetzung für die Eignung einer Lipidbindedomäne für die Messung eines bestimmten Lipids bzw. PIs. Die verschiedenen bekannten Domänen weisen eine unterschiedliche Selektivität gegenüber einzelnen PIs auf, die in ihrem Ursprungsprotein unter Umständen noch von weiteren Interaktionen beeinflusst wird. Dabei kann die Aussagekraft der Sondentranslokation sowohl durch unerwünschte Bindungspartner in der Membran als auch durch im Zytosol gelöste Inositolphosphate (vor allem IP₃) eingeschränkt werden. Bei gegebener Spezifität bestimmt die Stärke der Affinität die Relation zwischen freien und gebundenen Sondenmolekülen für unterschiedliche PI-Konzentrationen. Eine zu niedrige Affinität führt zu einer überwiegenden Lokalisation und damit Fluoreszenzintensität im Zytoplasma bereits bei relativ hohen PIP₂-Konzentrationen. Ist die Affinität zu hoch, kann die Sonde PIs effektiv gegen enzymatische Umsetzung und Interaktionspartner abschirmen. Letzteres stellt einen aktiven Eingriff in die Eigenschaften des PIP₂-Pools dar und verhindert die Messung nativer Effekte. Eine angemessene Affinität liegt etwa bei K_d-Werten von 0,5 – 1 μ M. Daneben sollten die Sonden für eine dynamikgetreue Messung auch schnelle Assoziations- und Dissoziationskinetiken aufweisen. Einen ähnlichen Effekt auf die Messbarkeit der PI-Dynamik kann unter Umständen auch eine sehr niedrige oder hohe Expression der Konstrukte haben.

2.6.2 PIP₂-Sonden: PLCδ1-PH- und Tubby-Domäne

Die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH) der Phospholipase δ1 (PLCδ1) war die erste als spezifische PIP₂-Sonde verwendete Proteindomäne und wird als solche nach wie vor gegenüber anderen Mitgliedern der Familie PH-ähnlicher Proteine favorisiert (Stauffer *et al.*, 1998; Várnai & Balla, 1998). Die PH-Domäne besteht aus einer etwa 100 Aminosäuren langen Sequenz und wurde erstmals in Pleckstrin, dem Hauptsubstrat der Proteinkinase C (PKC) in Blutplättchen, definiert (Tyers *et al.*, 1989). Während die Domäne ursprünglich gerade für die Bindung an PIs bekannt wurde, machen Proteine mit dieser Eigenschaft heute nur noch einen kleinen Teil der Familie aus (Übersicht: Scheffzek & Welte, 2012). Ihre Mitglieder zeichnen sich vor allem durch die Beteiligung an einer Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen aus. Die PLCδ1-PH-Domäne bindet mit hoher Affinität [K_d 1 – 2,8 μM; (Rebecchi *et al.*, 1992; Lemmon *et al.*, 1995; Hirose, 1999; Gambhir *et al.*, 2004; Narayan & Lemmon, 2006)] an PI(4,5)P₂ und ist bis heute die meistgenutzte Sonde für dieses Lipid. Problematisch ist ihre gegenüber PIP₂ 10- bis 20-fach höhere Affinität zu IP₃. In der Literatur herrscht ein Disput darüber, inwieweit die Translokation der PH-Domäne in Folge der Aktivierung eines Gα_q-gekoppelten Rezeptors auf der Spaltung von PIP₂ oder der Generierung von IP₃ begründet ist (Nelson *et al.*, 2008; Szentpetery *et al.*, 2009). In dieser Arbeit bezeichnet der Ausdruck PH-Domäne soweit nicht anders angegeben die PLCδ1-PH Domäne.

Eine Alternative bietet die nicht strukturverwandte Tubby-Domäne. Die Tubby-Domäne ist definiert als eine etwa 260 Aminosäuren lange Sequenz im C-Terminus des TUB-Proteins. Ein Funktionsverlust des Proteins führt in Mäusen zu spät einsetzender Fettleibigkeit, Blind- und Taubheit (Übersicht: Mukhopadhyay & Jackson, 2011). Der Gendefekt trat in den sogenannten *Tubby*-Mäusen als Spontanmutation auf, nach denen Proteine mit einer homologen Aminosäuresequenz zur Familie der *Tubby-like proteins* (TULPs) zusammengefasst wurden. Mutationen in TULP1 führen beim Menschen zu *Retinitis pigmentosa*. Studien zur Funktion des TUB-Proteins ergaben, dass es unter Ruhebedingungen mit Hilfe der Tubby-Domäne über PIP₂-Bindung an der Plasmamembran lokalisiert ist (Santagata *et al.*, 2001). Desweiteren enthält es eine nukleare Erkennungssequenz. Eine Gα_q-vermittelte Spaltung von PIP₂ durch PLCβ führt zur Freisetzung von TUB und dessen Translokation in den Zellkern, wo es vermutlich an der Genregulation beteiligt ist. Im Folgenden bezeichne ich als Tubby-Domäne (bzw. Tubby) stets die C-terminale Proteindomäne aus TUB. Der Entdeckung des Funktionsprinzips der Tubby-Domäne folgte kurze Zeit darauf ihr erster Einsatz als PIP₂-Sonde (Hughes *et al.*,

2007; Quinn *et al.*, 2008). Die Tubby-Domäne besitzt neben der für PI(4,5)P₂ auch eine gewisse Affinität zu PI(3,4)P₂ und PI(3,4,5)P₃, was aber aufgrund eines etwa 99%igen Anteils von PI(4,5)P₂ an den zweifach phosphorylierten PIs der Plasmamembran (nach Vanhaesebroeck *et al.*, 2001) für die Lokalisation nur geringe Bedeutung haben dürfte. Im Unterschied zur PH-Domäne konnte in lebenden Zellen keine apparente Affinität zu IP₃ nachgewiesen werden (Quinn *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 2008; Szentpetery *et al.*, 2009). Damit ist sie prinzipiell das genauere Messinstrument für den Zeitverlauf von PIP₂ Konzentrationsschwankungen. Ihre PIP₂-Affinität wird in der Literatur unterschiedlich bewertet, wobei sie in Relation zur PH-Domäne häufig als höher affin eingestuft wird. Diese Einschätzung beruht vor allem auf direkten Vergleichen mit der PH-Domäne aus Experimenten zum Membran-Zytoplasma-Verhältnis, *Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)* und Gα_q-Rezeptoraktivierung (Quinn *et al.*, 2008; Szentpetery *et al.*, 2009). Letztere bergen auch bei IP₃-Pufferung immer die Gefahr einer Verzerrung der Resultate. Daten, die aus PIP₂-Umsetzung ohne Entstehung von IP₃ gewonnen wurden, zeigen eine gegenüber der PH-Domäne ähnliche oder sogar geringere PIP₂-Affinität, so z.B. durch Aktivierung einer 5-Phosphatase [mit dem Rapamycin System oder der spannungsgesteuerten CiVSP (Szentpetery *et al.*, 2009; Halaszovich *et al.*, 2009)].

Die Kristallstrukturen beider Domänen mit der stereospezifischen Bindung Ihrer Phospholipidpartner sind in Abb. 2.11 schematisch dargestellt. Die PH-Domäne besteht aus einer 7-strängigen β-Sandwichstruktur, an die sich an einer Ecke eine α-Helix anschließt. Die geladene Phospholipidbindungsstelle befindet sich auf der gegenüberliegenden Seite (Ferguson *et al.*, 1995). Die Tubby-Domäne bildet einen Zylinder aus 12 antiparallelen β-Faltblättern, in deren Zentrum sich eine hydrophobe α-Helix befindet (Santagata *et al.*, 2001). Die α-Helix bildet den C-Terminus des Proteins und ist in den *Tubby*-Mäusen durch Mutation fehlgefaltet. Die Interaktion mit den PIP₂-Phosphatgruppen übernehmen zwei hoch konservierte positiv geladene Aminosäuren (K330 und R332). Aufgrund der IP₃-Affinität der PH-Domäne habe ich in meiner Arbeit vor allem die Tubby-Domäne für die Messungen verwendet. Einige Experimente wurden zusätzlich mit der PH-Domäne wiederholt. Um die Lokalisation der Domänen in den Neuronen verfolgen zu können, waren sie mit EGFP markiert. EGFP ist eine weiterentwickelte Variante des GFP (*enhanced green fluorescent protein*). GFP ist ein grün fluoreszierendes Protein, welches bei marinen Invertebraten vorkommt und genetisch in Zellen eingebracht werden kann (Tsien, 1998; Remington, 2011).

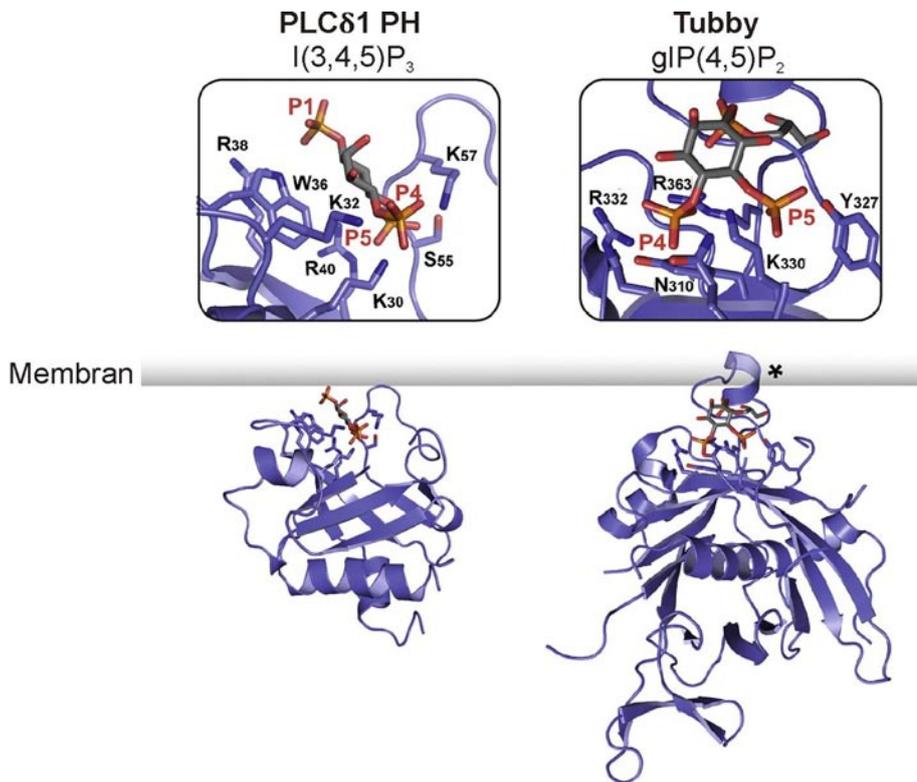


Abb. 2.11: Kristallstrukturmodelle der stereospezifischen Bindung der Proteindomänen PLCδ1-PH und Tubby an Phospholipidkopfguppen. Links: Bindung von PLCδ1-PH an I(1,4,5)P₃ (aus Ferguson *et al.*, 1995). Rechts: Bindung der C-terminalen Tubby Domäne an 1-glycerophosphoryl-I(4,5)P₂ (aus Santagata *et al.*, 2001). Von der mit einem Sternchen markierten Region wird angenommen, dass sie in die Membran hereinragt. (Abb. modifiziert aus Moravcevic *et al.*, 2012).

2.6.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Der wesentliche Unterschied der konfokalen Mikroskopie gegenüber der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie liegt in der Tiefendiskrimination. Die sogenannte konfokale Blende (engl. *Pinhole*) sorgt dafür, dass nur Licht aus der Fokus- bzw. Brennebene des Objektivs zum Detektor durchgelassen wird. Bei der punktförmigen Beleuchtung eines Laserstrahls werden folglich im konfokalen Strahlengang Beleuchtungs- und Beobachtungspunkt ineinander abgebildet (konjugierte Ebenen). Von außerhalb der Fokusebene kommendes Licht wird durch die Blende abgeblockt. Das konfokale Mikroskop ist daher inhärent tiefendiskriminierend und reduziert zusätzlich die Streuung, was den Kontrast weiter verstärkt. Die über die Blendenöffnung geregelte Konfokalität wird in Airy-Einheiten (AE) beschrieben. Eine weit gestellte konfokale Blende bedeutet einen Verlust der konfokalen Eigenschaften und der Strahlengang entspricht wieder der Epifluoreszenzmikroskopie.

Bei einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wird das Objekt punktförmig vom gebündelten Laserstrahl beleuchtet (siehe Abb. 2.12). Dabei wird der Laserstrahl zunächst

auf einen Farbteiler gelenkt, der im Falle der Fluoreszenzmikroskopie das Anregungslicht durch das Objektiv auf die Probe reflektiert. Der Scanner lenkt den Laserstrahl so ab, dass die Probe in Linien abgetastet wird. Das längerwellige emittierte Licht kann durch den Farbteiler passieren und durch die konfokale Blende zum Detektor gelangen, dem zusätzlich noch ein Emissionsfilter zur Selektion der Wellenlänge vorgeschaltet ist (in der Abb. nicht gezeigt). Der Photomultiplier wandelt die schwachen Lichtsignale in einen nachweisbaren elektrischen Puls um, die vom Photonenzähler als „Count“ registriert werden. Da durch den Photomultiplier Photonen gezählt werden, ist dieser Farbenblind. Eine farbliche Darstellung des Bildes wird über die Computersoftware erreicht.

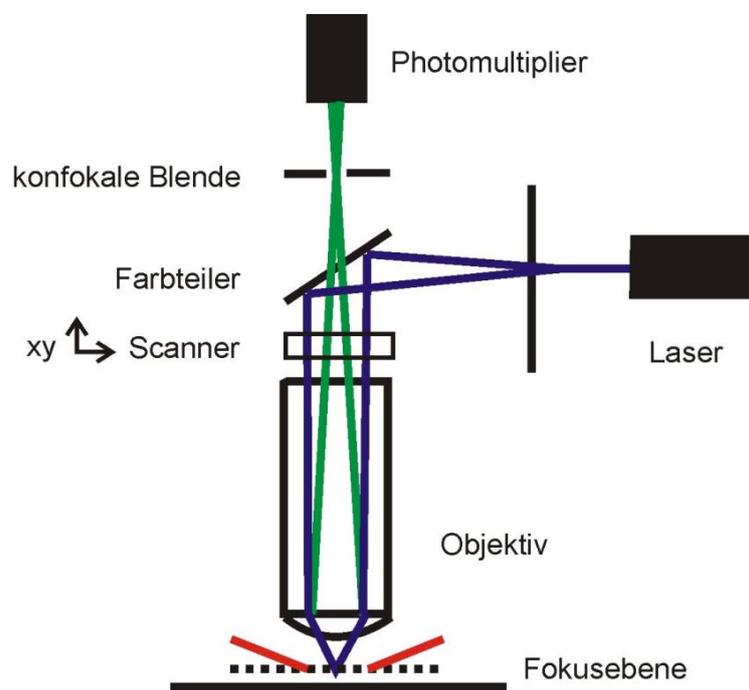


Abb. 2.12: Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Fluoreszenzmikroskopie). Das kurzwellige (hier blaue) Anregungslicht wird auf die Probe gelenkt und das emittierte längerwellige (hier grüne) Licht zum Detektor (Photomultiplier) gleitet. Die Öffnung der konfokalen Blende (*Pinhole*) entscheidet über die Tiefendiskrimination. Der Scanner lenkt den Laser in Linien über das Objekt. (rot: Applikationsnadel bzw. Stimulationselektrode; weitere Erklärungen im Text)

2.6.4 Aufbau des konfokalen Messstands

Die Ausstattung des Messstands für die konfokalmikroskopische Messung der PIP₂-Sonden-Translokation war der des Patch-Clamp-Setups sehr ähnlich (vgl. Kapitel 2.3.5). Herzstück des Messstands war das aufrechte konfokale Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710 inklusive der dazugehörigen Komponenten (Zeiss, Jena/Oberkochen). Zwei Computer sorgten für die Echtzeitverarbeitung der Daten (*Real Time Unit*) und den Betrieb der Bediensoftware

(Abschnitt 2.6.5). Die Steuerung des Mikroskops erfolgte über ein Bedienpult oder einen der Computer. Das Mikroskop war auf einem kommerziellen Verschiebetisch montiert, auf dessen U-förmiger Schiene zwei Mikromanipulatoren und der Objektisch mit der Messkammer angebracht waren (alle Luigs & Neumann, Ratingen). Im Gegensatz zum Verschiebetisch des Patch-Clamp-Setups wird bei diesem System nicht das Mikroskop selbst verschoben, sondern alle anderen Komponenten in Relation dazu. Der Messplatz verfügte über Patch-Clamp-Messinstrumente zur parallelen Durchführung konfokalmikroskopischer und elektrophysiologischer Experimente, war jedoch nicht von einem Faradaykäfig umgeben. Das mikroskopische Bild wurde nicht auf einem Röhrenfernseher, sondern auf einem Computerbildschirm dargestellt.

2.6.5 Optische Parameter, Datenerfassung und Analyse

Die Steuerung des Mikroskops und aller optischen Parameter sowie die Datenerfassung erfolgte über die Software ZEN (Versionen 2008 und 2009; Zeiss, Oberkochen). Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die verwendeten optischen Parameter der konfokalen GFP-Fluoreszenzmessung an akuten Hirnschnitten. Für die grobe Orientierung im Hirnschnitt wurden die Durchlicht- und Epifluoreszenzkomponenten (Filter 38HE, Zeiss) des Mikroskops genutzt. Die *Regions of Interest* (ROI) wurden ebenfalls in ZEN festgelegt und die daraus extrahierten Intensitätsdaten anschließend zur weiteren Analyse nach Igor Pro (Version 6.03A, WaveMetrics, Portland, OR USA) exportiert. Die Bearbeitung von konfokalen Aufnahmen erfolgte mit der Software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

Tab. 2.3: Übersicht der wesentlichen Komponenten und Parameter der konfokalen Messungen

Komponente/Parameter	Typ/Wert
Objektiv	W Plan-Apochromat 20x
Fluophor (Filterset)	EGFP (EF1)
Laser (<i>power</i>)	Argon (0,2 -0,5 %)
Anregungswellenlänge λ	488 nm
Emissionswellenlänge λ	492 - 598 nm
<i>Pinhole</i> (konfokale Blende)	1 AE
Auflösung	0,13 μm /Pixel
Detektor <i>Gain</i>	~ 1200
Scanzeit/Bild (<i>Time Series</i>)	(1 -) 1,75 s

2.7 Stereotaktische Injektion lentiviraler Konstrukte

Um die PIP₂-Dynamik in akuten Hirnschnitten messen zu können, müssen die spezifischen Sonden zuvor in den lebenden Ratten zur Expression gebracht werden. In dieser Arbeit wurden dazu rekombinante Lentiviren unter stereotaktischer Kontrolle bilateral direkt in die Hippocampi juveniler Ratten injiziert (P21, Abb. 2.13). Diese Methode hat als wesentliche Vorteile, dass gewünschte Konstrukt innerhalb weniger Tage und mit hoher räumlicher Präzision in das Zielareal des jeweiligen Tiermodells einbringen zu können.

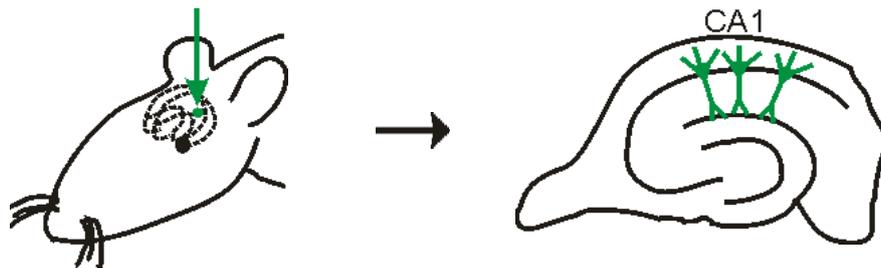


Abb. 2.13: Experimentelles Schema von stereotaktischer Injektion und akutem Hirnschnitt.

Stereotaktische Operationen orientieren sich an einem Koordinatensystem, in dem das Zielareal in drei Dimensionen (x,y und z) als Distanz von Bregma (Position 0) definiert ist. Bregma ist der Treffpunkt zwischen der sagittalen und coronalen Hirnnaht des Schädels (vgl. Abb. 2.14). Die x-Achse entspricht der medial-lateralen (links-rechts), y der rostral-caudalen (bzw. anterior-posterior, vorne-hinten) und z der dorsal-ventralen (oben-unten) Achse des Kopfes. Die erforderlichen Koordinaten erhält man aus stereotaktischen Atlanten. Die in dieser Arbeit verwendeten Referenzwerte für adulte Ratten entstammen dem Atlas „The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates“ (2. Auflage, Paxinos & Watson, 1996) und wurden für P21-Tiere modifiziert. Die Koordinaten wurden nach folgender Formel (2.3) berechnet:

$$x,y,z = (\text{Distanz Bregma-Lambda juvenil (mm)}/8,7(\text{mm})) * \text{adulte Koordinate} \quad (2.3)$$

Wobei Bregma und Lambda definiert sind als der Schnittpunkt der sagittalen Hirnnaht mit dem jeweiligen Mittelpunkt einer Kurvenfunktion („bester Fit“) durch die coronale Hirnnaht sowie der lambdoiden Hirnnaht [(Paxinos & Watson, 1982) vgl. Abb. 2.14]. Diese entsprechen nicht immer den genauen Treffpunkten der Hirnnahte. Der Wert 8,7 entspricht der durchschnittlichen Entfernung von Bregma und Lambda der für den Atlas verwendeten Ratten (männlich, 290g). Die adulten Referenzkoordinaten bezogen auf Bregma waren: für x = + bzw. - 6,125, y = - 6,15 und z = - 6,2.

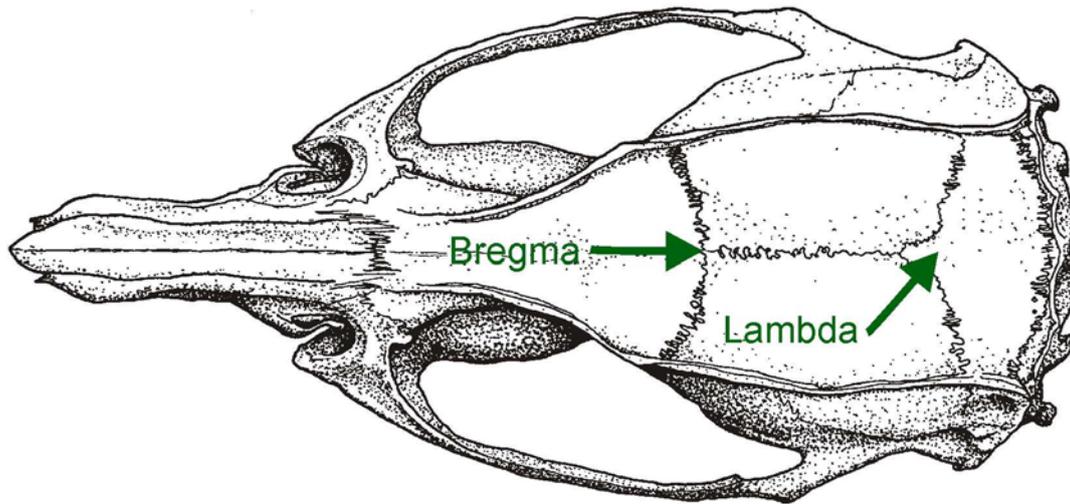


Abb. 2.14: Aufsicht auf den Schädel einer männlichen 290 g Ratte mit den Bezugspunkten Bregma und Lambda (modifiziert aus Paxinos & Watson, 2005).

Die eigentliche Injektion erfolgte durch Druckapplikation mittels einer Hamiltonspritze (5 μ l, 7105 N, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz). Auf die Spritze wurde eine ausgezogene Mikropipette aus filamentiertem Borosilikatglas (G120F-4, 1,20 mm AD x 0,69 mm ID, Warner Instruments, Hamden CT, USA) geklebt. Dazu wurden die Pipetten zuerst mit einem DMZ-Universal-Puller (Zeitz, Martinsried) gezogen (Spitzendurchmesser < 10 μ M, Programm siehe Tab. 2.4) und die Hamiltonspritze in der stereotaktischen Halterung fixiert. Danach wurde die Pipette luftblasenfrei mit flüssigem Parafin befüllt (Paraffin für die Spektroskopie, Merck, Darmstadt) und mit Cyanacrylatkleber (UHU blitzschnelle Pipette, Bühl/Baden) an einem bereits auf die Kanüle der Spritze geklebten Stück Glaskapillare befestigt.

Tabelle 2.4: Parameter des Programms zum Ziehen der Stereotaxie-Mikropipetten (DMZ-Puller)

(entspricht bis auf den Wert für HEAT H=600 dem voreingestellten Programm 01)

P(A)	H	F(TH)	s(TH)	t(H)	s(H)	t(F1)	F1	s(F2)	F2	AD
	600	025	010	000	030	000	160	070	700	000

Vor Beginn der Operation wurden alle Oberflächen inklusive der stereotaktischen Apparatur (David Kopf Instruments, Tujunga, Kalifornien USA) mit Softasept® (B. Braun, Melsungen) desinfiziert und das Präparationsbesteck mit einem Heißluftsterilisator (Microsteril 436, B.M.S., Bacnatica, Italien) sterilisiert. Die Einleitung der Narkose erfolgte mittels einer intraperitoneal (i.p.) gegebenen Mischspritze aus 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ketaminhydrochlorid 10% zur Injektion, Bela-Pharm, Vechta) und 10 mg/kg

Xylazin (Rompun® 2% Injektionslösung, Bayer AG, Leverkusen), der ~ 0,05 mg/kg Atropin ($\leq 10 \mu\text{l}$ einer 0,5 mg/ml Atropinsulfatlösung zur Injektion, B.Braun) und ca. 0,5 ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung für Injektionszwecke (0,1 ml / 10g Körpergewicht; Diaco, Triest, Italien) beigefügt waren. Jedes Tier wurde vor der Operation gewogen und bekam eine dementsprechende individuelle Dosis der Medikamente verabreicht. Die Kombination der Wirkstoffe gewährleistete eine ausreichend tiefe Narkose und weitgehend komplikationslose Durchführung der Eingriffe. Ketamin entfaltet seine Wirkung vor allem über die Inhibition zentralnervöser NMDA-Rezeptoren (nicht-kompetitiver Antagonist) und führt zu einer sog. *dissoziativen Anästhesie*, bei der die Schutzreflexe weitgehend erhalten bleiben (Adams, 1997). Es hat außerdem hypnotische, (somatisch) analgetische und kreislaufaktivierende Wirkung. In Operationen unerwünschte Effekte sind die Begünstigung von Traumzuständen, Hypersalvitation sowie die Aktivierung u.a. des Muskeltonus, weshalb Ketamin selten alleine eingesetzt wird. Xylazin hingegen ist ein α_2 -Adrenorezeptor-Agonist mit sedativer, analgetischer, muskelrelaxierender und anxiolytischer Wirkung (Gross, 2001). Atropin ist ein Parasympatholytikum und Antagonist an muskarinischen Rezeptoren. Als solches kann es eingesetzt werden um bronchialer Hypersalvitation, Bronchospasmen sowie einer Bradykardie entgegen zu wirken. Die Injektion isotonischer Kochsalzlösung diente der Vermeidung einer Dehydrierung während des Eingriffes. Bei Auftreten einer zu geringen Narkosetiefe vor Ende der Operation wurde 1/3 der Wirkstoffmenge intramuskulär (i.m.) nachdosiert.

Unmittelbar nach Erlöschen des Stellungsreflexes wurde das Operationsgebiet rasiert (Vakuum Bartschneider, Philips, Hamburg) und mit Braunol® (B.Braun, Melsungen) desinfiziert. Die sedierte Ratte wurde auf eine homotherme Heizdecke gelagert (TSE Systems, Bad Homburg), die über eine Rektalsonde die stetige Kontrolle der Körpertemperatur (Sollwert 37,5 °C) und Regulation der Decke erlaubte (max. 40,5 °C). Die Kornea wurde mit einem Augengel (Vidisc ®, Heidelberg) vor dem Austrocknen geschützt. Anschließend wurde der Körper der Ratte mit einer durchsichtigen Luftpolsterfolie abgedeckt und der Kopf mit Hilfe der oberen Frontzähne und den „Ear Bars“ in der stereotaktischen Apparatur eingespannt. Nach Erreichen der chirurgischen Narkosetiefe (deutliche Hyporeflexie bei Liedschluss- und Zehenreflex) wurde die Haut über der sagittalen Schädelnaht von caudal nach rostral eröffnet und seitlich fixiert. Der Schädel wurde nach Bregma ausgerichtet und so justiert, dass sich Bregma und Lambda parallel zur horizontalen und lotrecht zur Injektionsachse befanden.

Als nächstes wurde die stereotaktische Apparatur von Bregma ausgehend auf die x-y-Zielkoordinaten eingestellt und in beide Seiten des Schädels ein ca. 0,6 mm großes Loch

gebohrt (Hartmetallbohrspitze, Bungard, Windeck). Eventuell auftretende Blutungen wurden mit sterilen Pfeiltupfern gestillt (Sugi®, Kettenbach GmbH, Eschenburg). Zu diesem Zeitpunkt (und fortwährend über die Dauer des Eingriffs) wurden nochmals die Reflexe, Temperatur und Atmung der Ratte überprüft. Anschließend wurde ein Virusaliquot aufgetaut und auf ein Stück Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA) pipettiert, um die Virussuspension dann langsam luftblasenfrei in die Spitze der Mikropipette aufzuziehen. Die stereotaktische Injektion der Lentiviren fand in einem S2-Labor statt. Alle Gegenstände und Oberflächen, die potentiell mit Virus in Kontakt kamen, wurden umgehend mit Softasept® bzw. 70% Ethanol desinfiziert sowie die Einwegartikel nach der Operation autoklaviert. Die Halterung mit der Hamiltonspritze wurde in die Apparatur eingehängt und die Spitze der Mikropipette auf Schädelniveau abgesenkt (z-Position 0). Falls erforderlich wurde die Hirnhaut (Dura) durchtrennt bevor die Glasspitze in das Gehirn zur errechneten z-Koordinate geführt wurde. Die Spitze wurde zunächst 0,05-0,1 mm tiefer als berechnet abgesenkt und dann wieder zur Zielposition angehoben, um ein Reservoir für die erste Injektion zu schaffen. Nach der langsamen Injektion von ca. 500 nl Virussuspension (ca 100 nl/15 s) wurde eine Position 0,3 -0,35 mm weiter dorsal eingestellt und so über einen Zeitraum von je 5-10 Minuten bilateral 4-6 Virusdosen in das Zielareal eingebracht. Dies sollte eine Verteilung infizierter Zellen über mehrere hippokampale Hirnschnitte auf der dorsoventralen Achse gewährleisten. Nach einer Wartezeit von mindestens 1 Minute an der letzten Position wurde die Mikropipette herausgezogen und die Fixierungen am Kopf der Ratte gelöst. Der Hautschnitt wurde mit sterilem Nahtmaterial verschlossen (Ethilon II, EH 7930H 5-0, 45 cm, Ethicon, Norderstedt) und nochmals mit Braunol® benetzt. Um die Heilung und das Nähen zu erleichtern, wurden die Wundränder während der OP mit isotonischer Kochsalzlösung (s.o.) feucht gehalten. Die Ratte wurde bis zum Aufwachen auf der temperierten Heizdecke belassen. Danach wurde Sie in den Regenerationskäfig gesetzt und ihr Zustand regelmäßig kontrolliert. Nach spätestens zwei Stunden zeigten die Tiere in der Regel eine gute Koordination und begannen zu trinken und fressen. Die gebrauchte Mikropipette wurde erst mit 70% Ethanol benetzt und dann in Aceton gehängt, mit dem sie von der Hamiltonspritze gelöst wurde.

Die Tötung der Tiere zur Organentnahme und Anfertigung hippocampaler Hirnschnitte erfolgte 5-10 Tage nach der stereotaktischen Injektion der lentiviralen Konstrukte.

2.8 Lentivieren

Damit die für die Messungen benötigten Sonden in den Neuronen heterolog exprimiert werden können, müssen die Konstrukte zunächst in die Zellen eingeschleust werden. *In vivo* kann dazu nicht auf die in Zellkulturen verwendeten Transfektionsreagenzien zurückgegriffen werden. Anstelle dessen werden bei stereotaktischen Versuchen rekombinante Viren verwendet, welche die gewünschte genetische Information tragen.

2.8.1 Produktion der Lentivieren

Die Herstellung der rekombinanten Lentivieren erfolgte durch die Technische Assistentin Olga Ebers in Anlehnung an ein Protokoll von Alex Lepier, LMU München (Modifiziert von Christian R. Halaszovich). Es beruht auf einem System ohne Helfervirus, bei dem alle nötigen Informationen für die zelluläre Virusproduktion in drei Plasmiden enthalten sind. Der Vektor pCMV Δ R8.9 wird für die Proteine zur Verpackung, der Vektor pVSVG für die viralen Hüllproteine benötigt. Die Sequenz des für die Experimente vorgesehenen Proteins wird in den Expressionsvektor eingefügt. In meiner Arbeit habe ich hauptsächlich Viren mit dem Vektor FUGW (FU, Ubiquitin Promoter) verwendet, anfänglich aber auch den neuronenspezifischen FC(1.3)GW (FC, α -CamKII) Promoter getestet. Nur wenn alle drei Plasmide zusammen in eine Zelle transfiziert werden, wird diese zur Virusproduktion befähigt. Von diesem Zeitpunkt an wurden die Kulturen als „S2“ eingestuft. Während die transfizierten Zellen über ihre gesamte Lebensdauer infektiösen Virus produzieren können, sind die entstandenen Viren selbst replikationsdefizient, da sie nur die Information für das gewünschte Konstrukt beinhalten. Infizierte Zielzellen können folglich selbst keinen Virus freisetzen und sind wieder als „S1“ einzustufen, sobald sich kein aktiver Virus mehr in der Umgebung (z.B. im Medium) befindet.

Die Tabelle 2.5 gibt eine kurze Übersicht der wesentlichen Arbeitsschritte für die Herstellung der Lentivieren und der verwendeten Materialien.

Alle Plasmide wurden freundlicherweise von Pavel Osten (MPI für Medizinische Forschung Heidelberg) zur Verfügung gestellt und enthielten EGFP als Insert (PH-Domäne und Tubby-Konstrukt s. Halaszovich *et al.*, 2009).

Tabelle 2.5: Zusammenfassung der wesentlichen Arbeitsschritte zur Lentivierenproduktion

Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamin 2000 und dem unten genannten Transfektionsansatz nach Herstellerprotokoll.

Tag	Arbeitsschritt	Medium
-2	Splitten der HEK293FT-Zellen Angestrebte Konfluenz an Tag 1: 60-70%	Stockmedium
1	Transfektion Transfektionsansatz: 2x 50 ml Röhrchen 4,5 ml Opti-MEM 4,5 ml Opti-MEM 22,5 µg Δ8.9 108 µl Lipofectamin 15 µg VSVG 9µl Expressionsplasmid Ernten der Zellen, Resuspendieren und Transfektion Aussähen zu 60-70% Konfluenz; 3x 10 cm Schalen	Opti-MEM (-Serum) Opti-MEM (+Serum)
2	Waschen und Medienwechsel	Verpackungsmedium
3-4	1. Ernte und Aufreinigung der Viren Medienwechsel Überstand: Zellkulturzentrifuge 3000 rpm, 15 min Überstand: filtern durch Millex HV 0,45µM Filter 1. Ultrazentrifugation 25000 rpm, 1 h 30 min (4°C) Inkubation der Pellets auf Eis, 4h Pellets dissoziieren, Auffüllen auf 30 ml 2. Ultrazentrifugation (Parameter = 1.) Inkubation der Pellets auf Eis, über Nacht Pellets dissoziieren Zentrifugation in Tischzentrifuge, 30s (~5000 rpm) Überstand: aliquotieren und einfrieren (-80°C)	Verpackungsmedium 1 ml Puffer TBS-5 TBS-5 100 µl TBS-5 + 50µl TBS-5
4-5	2. Ernte und Aufreinigung der Viren Medium abnehmen, Zellen verwerfen Wiederholung der oben genannten Arbeitsschritte	

2.8.2 Verpackungszelllinie 293FT und Kulturbedingungen

Die menschliche, embryonale Nierenzelllinie 293 (*human embryonic kidney-cells*; HEK293) ist mit Adenovirus transfiziert und dadurch immortalisiert. Die Variante HEK293FT enthält zusätzlich das Large-T-Antigen des SV40 Virus, welches die Amplifizierung transfizierter Plasmide ermöglicht. Die Zelllinie wurde von Invitrogen (Darmstadt) bezogen.

HEK 293FT-Zellen wurden in dem Stockmedium DMEM high glucose +GlutaMax (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, mit dem Dipeptid L-Alanin-L-Glutamin anstelle des instabileren Glutamin), das 10% fötales Kälberserum (FCS) und 500 µg/ml Geneticin (G418, Selektion für Large-T-Antigen) enthielt, bei 37°C, 5% CO₂ und ~ 95% Luftfeuchtigkeit in Flaschen (75 cm²) kultiviert. Bei einer Dichte von max. 80-90% Konfluenz wurden die Zellen abgelöst und auf neue Flaschen verteilt (Splitting, 2-mal pro Woche). Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS (137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) gewaschen und dann mit Trypsin-EDTA (1:5 in PBS) bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden in 15 ml Stockmedium resuspendiert.

Für Transfektionen wurden die Zellen bei 60-70% Konfluenz auf 10 cm Schalen ausplattiert. Als Transfektionsmedium wurde Opti-MEM + GlutaMax (*miniumum essential medium*, serumreduziert) mit und ohne 10% FCS verwendet. Das Verpackungsmedium bestand aus DMEM + Glutamax + HEPES mit 10% FCS, 1mM Na-Pyruvat, 1% nichtessentiellen Aminosäuren und 0,1 mM DTT.

Für die Langzeitlagerung wurden Zellen geerntet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase (70-90% Konfluenz) befanden. Die Zellen wurden in Stock Medium mit 10% DMSO resuspendiert und in 2 ml Cryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Auftauen der Zellen wurde folgendermaßen durchgeführt: Die Zellen wurden schnell bei 37°C aufgetaut und vorsichtig zu 10 ml vorgewärmten Stockmedium pipettiert. Die Zellen wurden herunter zentrifugiert und in einer 75 cm² Flasche ausgesät.

2.9 Primärkultur dissoziierter hippocampaler Neurone

2.9.1 Präparation und Kultivierung

Da die Qualität der Viruschargen entscheidend für das Gelingen der *in vivo* Experimente ist, wurden sie vorab an primären hippocampalen Neuronenkulturen getestet. Diese wurden auch genutzt, um erste Experimente mit den PIP₂-Sonden durchzuführen. Die Kultivierung hippocampaler Neurone erfolgte nach einem von Christian R. Halaszovich und Olga Ebers etablierten Protokoll in Modifikation nach Meberg & Miller (2003). Zellkulturmedien und die Gliazellkultur wurden von Olga Ebers bereitgestellt. Alle Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank mit sterilen Lösungen durchgeführt.

Für die Primärkultur wurden P0-P1-Ratten durch Dekapitation getötet. Der Schädel wurde eröffnet, indem ein Schnitt entlang der sagittalen Linie sowie zwei Querschnitte über dem Bulbus olfactorius und der Grenze zum Cerebellum geführt wurden. Das Gehirn wurde vorsichtig herausgehoben und in 4°C kaltes HBSS Medium gelegt (Tabelle 2.4). Unter einem Binokular (Olympus, Hamburg) wurden die Hemisphären mit einem Skalpell getrennt und Reste des Stammhirns entfernt. Dann wurden die Hippocampi vorsichtig heraus präpariert, in frisches warmes HBSS überführt und 10x Trypsin-EDTA bis zu einer Gesamtkonzentration von 0,05% in HBSS zugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei 37°C wurde der Überstand abgesaugt und die Hippocampi zwei- bis dreimal mit NB/FCS gewaschen um die Trypsinaktivität zu stoppen. Im letzten Waschschrift wurde NB/FCS zu einem Endvolumen von 2ml zugegeben und das Gewebe mit einer auf den Boden des Röhrchens aufgesetzten feuerpolierten Pasteurpipette in 6 bis max. 10 Zügen zerkleinert. Anschließend wurde die Öffnung einer Pasteurpipette leicht zugeschmolzen, das Gewebe erneut 6- bis 10-mal trituiert und das Volumen mit NB/FCS auf 13,5 ml pro Ratte aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde zu je 2ml pro Well auf Glasplättchen in einer 24er Multiwellplatte ausgesät. Die Plättchen waren zuvor in den Multiwellplatten für 30 min mit Poly-D-Lysin (PDL; 0,1 mg/ml in Boratpuffer) bei 37°C inkubiert, 3x mit sterilen H₂O gewaschen und mit 2 ml NB/FCS überschichtet worden. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und ~95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium gegen ein Gemisch aus 50% frischem NB/B27 (Tabelle 2.x) und 50% gliakonditioniertem NB/B27 ausgetauscht. Um das gliakonditionierte Medium zu erhalten, wurde das Medium einer Gliazellkultur einen Tag vor einem geplanten Medienwechsel bei den Neuronen gegen frisches NB/B27 ausgetauscht. Nach 24 h wurden 50% des Mediums erneut ausgetauscht und das abgenommene Medium für die Neurone verwendet. Das gliakonditionierte Medium enthält

für die Neurone lebenswichtige und wachstumsfördernde Substanzen, die von den Gliazellen abgegeben werden. Am vierten Tag nach der Präparation wurden 50% des Mediums der Neuronenkultur gegen gliakonditioniertes Medium mit 2-4 μM AraC (finale Konzentration 1-2 μM) ersetzt um das Wachstum in der Neuronenkultur vorhandener Gliazellen zu hemmen. Die Wirkung von AraC beruht auf einer Störung der DNA-Replikation (siehe Pourquier *et al.*, 2000). Am siebten Tag erfolgte ein erneuter 50%iger Medienwechsel, welcher zur Erhaltung der Kultur alle sieben Tage wiederholt wurde. In den Tabellen 2.6 bis 2.10 sind die Arbeitsschritte und verwendeten Lösungen zusammengefasst.

Tabelle 2.6 Zusammenfassung der Arbeitsschritte und verwendeten Lösungen

Zeit	Arbeitsschritt	Temperatur/ Inkubationszeit	Medium
0	Präparation	4°C	HBSS
	Verdau	37°C für 15 min	0,05% Trypsin-EDTA in HBSS
	Waschen, 2-3x	4°C	NB/FCS, final \leq 2ml
	Trituieren, 6-10x	4°C	NB/FCS
	Trituieren, 6-10x	4°C	NB/FCS
	Ausplattieren	4°C; Inkubator 37°C	NB/FCS 13,5 ml
4 h	Medienwechsel (MW)	37°C	50% gliakonditioniertes NB/B27
4 d	$\frac{1}{2}$ MW	37°C	2-4 μM AraC in gliakonditioniertem NB/B27
7 d	$\frac{1}{2}$ MW	37°C	50% gliakonditioniertes NB/B27
14d	Erhaltung, $\frac{1}{2}$ MW	37°C	50% gliakonditioniertes NB/B27

Tabelle 2.7 Zusammensetzung des Boratpuffers

Borsäure	1,55 g
Natrium-Tetraborat Decahydrat	2,375 g
H ₂ O ad	500 ml

Der pH-Wert sollte sich auf 8,4 einstellen und wurde gegebenenfalls mit HCl korrigiert. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert

Tabelle 2.8 Zusammensetzung des Präparationsmediums HBSS

HBSS 10x (Hanks Buffered Salt Solution; -Ca ²⁺ , -Mg ²⁺)	20 ml
1 mM HEPES	200µl
H ₂ O dest. steril	180 ml
gesamt	200 ml

Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7,3 eingestellt und anschließend steril filtriert

Tabelle 2.9 Zusammensetzung des Neurobasal(NB)/FCS Mediums

Neurobasal Medium (- Glutamin)	180 ml
FCS	20 ml
Glutamin (200 mM Stock)	2 ml
Penicillin/Streptomycin (100x)	2 ml
gesamt	204 ml

Tabelle 2.10 Zusammensetzung des NB/B27 Mediums

Neurobasal Medium (- Glutamin)	500 ml
B27 Supplement (50x)	10 ml
Glutamin (200 mM Stock)	5 ml
Penicillin/Streptomycin (100x)	5 ml
gesamt	520 ml

2.9.2 Transfektion primärer Neuronenkulturen mit Lentivieren

Die Transfektion der primären hippocampalen Neuronenkultur mit lentiviralen Konstrukten erfolgte 24 h nach Präparation der Neurone. Je nach Virustiter bzw. Transfektionseffizienz wurden 1-6 µl der verwendeten Viruslösungen direkt in die einzelnen Wells der Platten gegeben. Ab dem Zeitpunkt der Viruszugabe wurden die Platten den Lentivieren entsprechend als Sicherheitsstufe „S2“ behandelt. Bei dem nach 4 Tagen anstehenden Medienwechsel wurde entgegen dem Standardprotokoll für die Neuronenkultur nicht 50% sondern das gesamte Medium abgenommen und die Zellen mit Phosphatpuffer (PBS) gewaschen. Fortan wurden die Zellen wieder als „S1“ behandelt (vgl. Abschnitt 2.7). Das abgenommene Medium und PBS wurden gesondert gesammelt und autoklaviert.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die rezeptoraktivierte Dynamik der PIP₂-Konzentration in der Plasmamembran hippocampaler Pyramidenneurone *in situ* zu messen. Zu diesem Zweck wurden spezifische fluoreszenzgekoppelte Sonden mit Hilfe viraler Vektoren in den Hippocampi lebender juveniler Wistar-Ratten exprimiert. Nach Anfertigung akuter Hirnschnitte wurde die rezeptorinduzierte Translokation der Sonden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gemessen.

Der vorliegende Ergebnisteil ist in sechs Abschnitte gegliedert. Der erste Teil beschreibt die Expression der PIP₂-Sonden *in vitro* und *in vivo* sowie die Ermittlung der stereotaktischen hippocampalen Zielkoordinaten in juvenilen Ratten. Der zweite Teil zeigt die mit der Tubby-Domäne gewonnenen Daten zur pyramidalen PIP₂-Dynamik nach pharmakologischer Aktivierung G α_q -gekoppelter Rezeptoren. Neben der Tubby-Domäne habe ich auch die PH-Domäne als PIP₂-Sonde eingesetzt, welche jedoch eine potentiell störende Affinität zu IP₃ besitzt. Die Ergebnisse dieser Experimente werden daher im dritten Abschnitt separat behandelt. Im vierten Teil sind die elektrophysiologischen Messungen aller G α_q -Agonisten zusammengefasst. Der fünfte Teil beschreibt die Untersuchung der synaptischen Induzierbarkeit der PIP₂-Dynamik nach elektrischer Stimulation endogener Transmitterausschüttung. Im sechsten Teil folgt schließlich die Analyse der PIP₂-Dynamik in Körnerzellen des *Gyrus dentatus*.

3.1 Heterologe Expression der PIP₂-Sonden in hippocampalen Pyramidenneuronen

3.1.1 Expressionseffizienz der viralen Konstrukte in primären hippocampalen Neuronenkulturen

Die Dynamik der PIP₂-Konzentration wurde über die Translokation spezifischer Sonden beurteilt, die mit Hilfe lentiviraler Konstrukte in die Neurone eingebracht wurden. Die nötige genetische Information zum Bau der jeweiligen Sonde war in den lentiviralen Expressionsvektor integriert. Auf eine Titerbestimmung der verwendeten Viruschargen wurde verzichtet. Um die Qualität der Viren vor Ihrer Verwendung *in vivo* zu testen, habe ich mit Proben jeder Charge primäre hippocampale Neuronenkulturen infiziert und die

Expression mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop überprüft. Dies erlaubt eine sehr anwendungsnahe Beurteilung der infektiösen Partikel. Als ungeeignet eingestuft wurden dabei nicht nur Chargen mit einer niedrigen Expressionsrate, sondern auch solche mit Hinweisen auf toxische Effekte für die Neurone. Die Neurone wurden in 24er Multiwellplatten mit 1 – 5 μl Virussuspension pro Well infiziert.

Schon die geringe Menge von 1 μl Virussuspension pro Well (mit 500 μl Medium) erwies sich regelmäßig als ausreichend, um eine Expressionsrate von $\geq 90\%$ zu erzielen. Die GFP-Fluoreszenz der Sonden konnte bereits nach 24 h nachgewiesen werden und steigerte sich in den folgenden Tagen nur noch geringfügig. Danach blieb sie über den Kultivierungszeitraum stabil (bis zu 3 Wochen). Abbildung 3.1 zeigt Beispiele der Expression der GFP-gekoppelten Tubby- (links) und PH-Domänen- (rechts) Sonden in den primären Neuronenkulturen. Die Stärke der Expression zeigte leichte Variationen sowohl zwischen verschiedenen Chargen als auch innerhalb einer Charge, war jedoch insgesamt gut reproduzierbar. Bei älteren Chargen (ca. 1 Jahr) wurde eine Abnahme der Expressionseffizienz festgestellt. Die Expressionsintensität war nicht chargenübergreifend zu Gunsten einer der beiden Sonden erhöht. Entsprechend der hohen Infektionsrate fanden sich auf den Glasplättchen in der Regel nur vereinzelte Neurone ohne erkennbare spezifische GFP-Fluoreszenz. Kontrollen ohne Viruszugabe zeigten bei gleichen Einstellungen keine Fluoreszenz (nicht gezeigt).

Die Mehrzahl der infizierten Zellen zeigte im konfokalen Mikroskopbild eine deutliche Membranlokalisation der GFP-Fluoreszenz, mit einer geringeren Intensität im zytoplasmatischen Areal (Abb. 3.1 unten). Dies galt sowohl für das Soma als auch für die Dendriten der Neurone. Tests mit den $G\alpha_q$ -Rezeptoragonisten Oxo-M und DHPG (je 10 μM) induzierten eine Translokation in einem Teil der getesteten Neurone (nicht gezeigt).

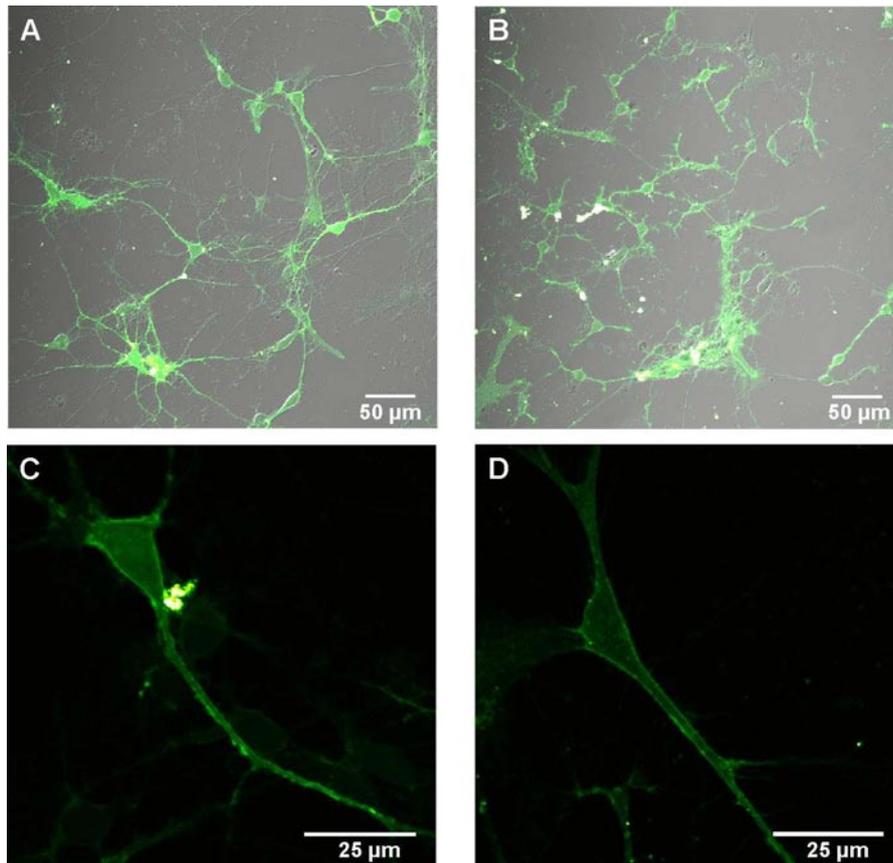


Abb. 3.1: Expression GFP-gekoppelter PIP_2 -Sonden in primären hippocampalen Neuronenkulturen. **A)** und **B)**: Kombination aus Durchlicht- und konfokaler Fluoreszenzaufnahme (links Tubby-, rechts PH-Domäne, Längenmaßstab 50 μm). **C)** und **D)** vergrößerte konfokale Aufnahmen morphologisch pyramidaler Neurone mit deutlicher Membranassoziation der Sonden (links Tubby-, rechts PH-Domäne, Längenmaßstab 25 μm).

3.1.2 Stereotaktische Koordinaten des hippocampalen Zielareals in P21-Wistar-Ratten

Die für den Referenzatlas von Paxinos und Watson (1996) verwendeten mittelgroßen Wistar-Ratten hatten ein durchschnittliches Gewicht von 290 g und eine Distanz von Bregma zu Lambda von 8,7 mm ($\pm 0,3$ mm Standardabweichung SD). Die in dieser Arbeit verwendeten juvenilen Wistar-Ratten wogen an P21 64 g (± 11 g; SD, n = 135) und die Distanz von Bregma zu Lambda betrug durchschnittlich 7,035 mm ($\pm 0,343$ mm). Dieser altersbedingte Größenunterschied wurde bei der Berechnung der Zielkoordinaten durch die Einbeziehung eines Faktors aus den Abständen von Bregma zu Lambda berücksichtigt (s. Abschnitt 2.7). Die Auswertung der ersten Injektionsversuche machte jedoch eine darüber hinausgehende Korrektur der adulten Referenzkoordinaten erforderlich.

Abbildung 3.2 veranschaulicht die Position der ursprünglich gewählten Zielkoordinaten anhand der Zeichnung eines Horizontalschnitts 6.1 mm ventral von Bregma ($Y = -6$, $X = \pm 5,4$

und $Z = -6,1$ mm). Erste Injektionsversuche an toten P21-Ratten ergaben eine grobe Übereinstimmung der Koordinaten relativ zu den Atlasratten (Injektion von Lebensmittelfarbe). Weder in diesen Versuchen noch in der überwiegenden Zahl der späteren Experimente an lebenden Tieren konnte der genaue Injektionsort anhand eines Stichkanals bestimmt werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Spitze der ausgezogenen Glaskapillare mit $\leq 10 \mu\text{m}$ in der Größenordnung eines einzelnen pyramidalen Zellkörpers liegt (vgl. Abb. 3.1). In der Regel waren Rückschlüsse auf den Verlauf des Stichkanals nur indirekt über die Expression möglich. Die stärksten Abweichungen der juvenilen Koordinaten von denen der Atlastiere ergaben sich in der medial-lateralen Achse. So konnte in den ersten mit Virus infizierten Ratten eine GFP-Fluoreszenz vor allem im *Gyrus dentatus* und medial des Hippocampus detektiert werden. In der Folge wurden die Referenzkoordinaten sukzessive weiter lateral gesetzt, bis eine reproduzierbare Expression in der CA1-Region erzielt wurde. In jedem späteren Experiment wurde der Verlauf der Expression in allen angefertigten Schnitten überprüft, um die Koordinaten zu verfeinern und den Injektionsprozess zu optimieren. Robuste Ergebnisse ergaben sich mit $Y = -6,15$, $X = \pm 6,125$ und $Z = -6,2$ mm (vgl. Abb. 3.2). Im besten Falle war eine GFP-Fluoreszenz in CA1 bei mehreren Schnitten entlang der dorsoventralen Achse vorhanden. In Hippocampi, in denen die Expression gemäß des anatomischen Verlaufs medial-lateral variierte, zeigten ventrale Schnitte eine zum *Gyrus dentatus* und dorsale Schnitte eine zum Cortex verschobene Fluoreszenz.

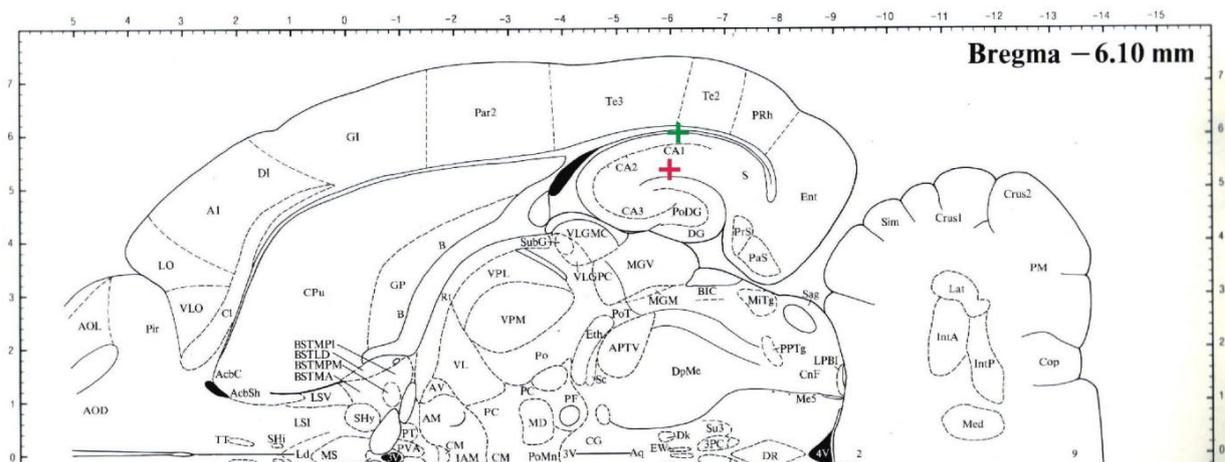


Abb. 3.2: Stereotaktische Koordinaten in P21-Wistar-Ratten. Position der ursprünglich gewählten (rot) und der experimentell optimierten Zielkoordinaten (grün) in einem horizontalen Hirnschnitt einer 290 g Ratte -6,1 mm ventral von Bregma (Skala in mm; Zeichnung modifiziert aus Paxinos & Watson, 1996).

3.1.3 *In vivo* Expression der PIP₂-Sonden

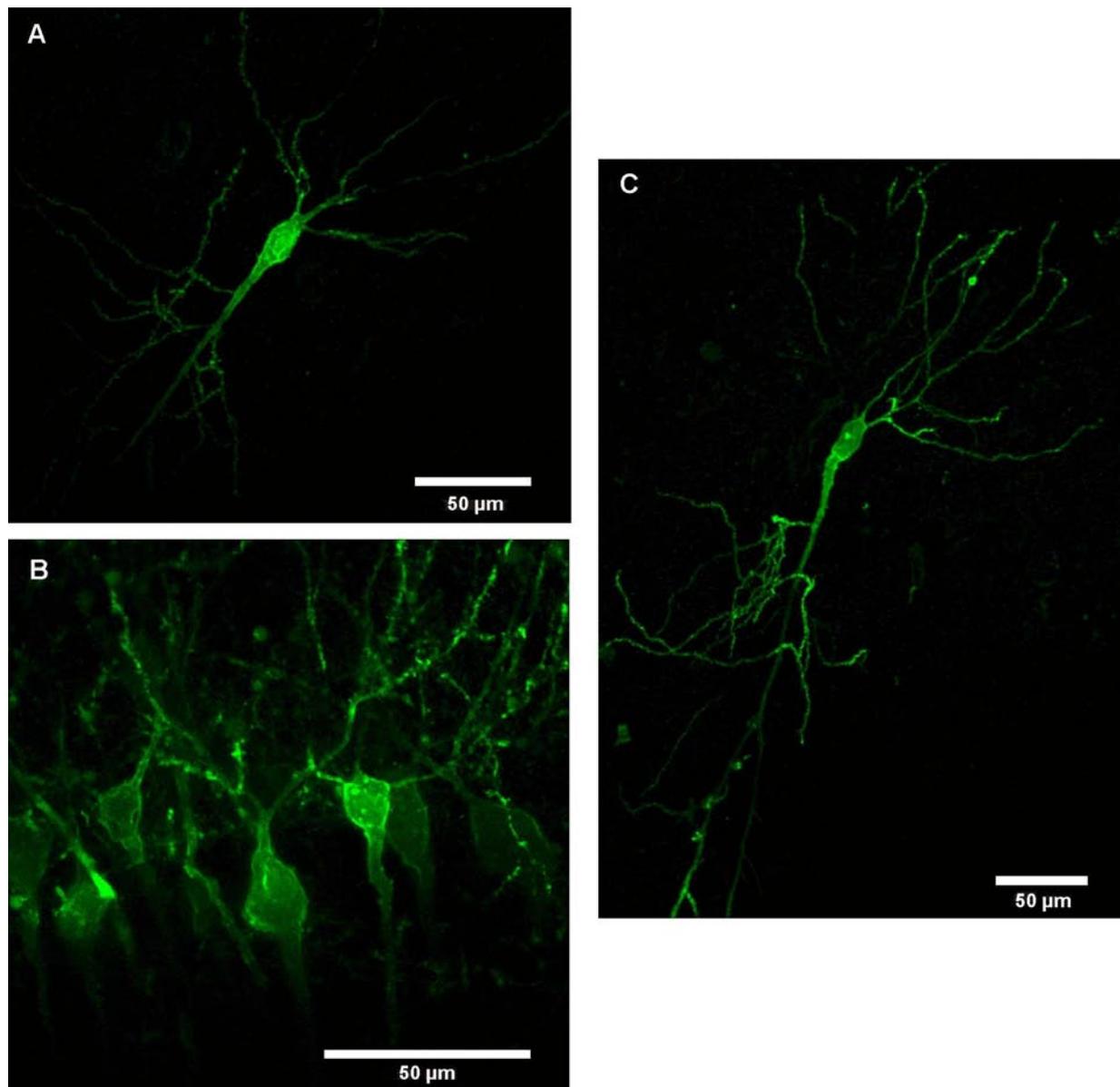


Abb. 3.3: Z-Projektionen pyramidaler CA1-Neurone mit PIP₂-Sondenexpression in akuten hippocampalen Hirnschnitten. Die Bilder wurden jeweils aus Z-Stapeln zusammengesetzt, welche in akuten Hirnschnitten eine Woche nach stereotaktischer Injektion der viralen Konstrukte aufgenommen wurden. Alle abgebildeten Neurone zeigen eine deutliche Membranassoziation der Fluoreszenz. **A)** und **B)** Tubby-Domäne, **C)** PH-Domäne (Längenmaßstab jeweils 50 µM).

Mittels stereotaktischer Injektion lentiviraler Konstrukte konnten GFP-gekoppelte PIP₂-Sonden sowohl der Tubby- als auch der PH-Domäne erfolgreich in den Hippocampi juveniler Ratten exprimiert werden. Je nach dem genauen Injektionsort und der Ausbreitung der Viren wurden sowohl vereinzelte Neurone mit spezifischer GFP-Fluoreszenz als auch Gruppen von infizierten Zellen gefunden (vgl. Abb. 3.3). Bei beiden Sonden konnten in der Regel ausreichend Pyramidenneurone mit membranassoziiierter GFP-Fluoreszenz gefunden werden, um mindestens eine gute Messung pro Tier durchführen zu können. Die Intensität

der *in vivo* Expression variierte zwischen den verwendeten Viruschargen. Zwar konnte eine besonders hohe Intensität nicht chargenübergreifend als Eigenschaft einer der Sonden festgestellt werden, jedoch bewirkten Viren der für die Mehrzahl der PH-Domänenexperimente verwendeten Charge eine relativ starke Expression. Neurone mit homogener (nicht-membranassoziierter) Fluoreszenz wurden für die Messungen nicht berücksichtigt. Die Zahl der Zellen mit fehlender Membranständigkeit der Fluoreszenz variierte zwischen den einzelnen Schnitten und Versuchstieren und wurde nicht quantifiziert.

Obwohl ich in meiner Arbeit hauptsächlich Viren mit dem ubiquitär exprimierenden Vektor FUGW (FU, Ubiquitin-Promoter) verwendet habe, konnte die Mehrzahl der infizierten Zellen morphologisch als Pyramidenneurone identifiziert werden. Die Zahl der spezifisch fluoreszierenden Gliazellen war gering und stellte kein Problem bei der Auswahl der Neurone für die Messungen dar. Vereinzelt wurden einige infizierte Astroglia und Epithelzellen von Blutgefäßen an der vermutlichen Einstichstelle gefunden. In diesem Zusammenhang habe ich anfänglich auch den neuronenspezifischen FC(1.3)GW- (FC, α -CamKII) Promoter getestet, konnte aber keinen offensichtlichen Vorteil aus dessen Expression in den Schnitten ableiten. Neben den primären Pyramidenneuronen exprimierten auch einzelne Interneurone die PIP₂-Sonden. Eine starke Expression der Konstrukte zeigten auch die *Gyrus dentatus*-Körnerzellen (Abschnitt 3.6).

In den untersuchten Zeiträumen konnte kein Zusammenhang zwischen dem Abstand von stereotaktischer Injektion und Anfertigung der Hirnschnitte mit der Expressionsintensität festgestellt werden. Die Schnitte wurden etwa 7 Tage nach der Injektion der Konstrukte angefertigt, wobei der kürzeste Abstand der beiden Methoden fünf Tage und der längste 11 Tage betrug. Bei einer Injektion an P21 entspricht dies einem finalen Alter der Tiere von P26 bis maximal P32. Auch die Expression entlang der Dendriten, welche einen Transport der Sonden in die Peripherie voraussetzt, zeigte an P26 keine über die allgemein beobachtete Variabilität hinausgehenden Unterschiede zu P28. Kürzere Zeiträume wurden jedoch nicht versucht, um den Neuronen genügend Zeit zur Expression und Regeneration zu geben.

3.2 Charakterisierung der PIP₂-Dynamik in hippocampalen CA1-Pyramidenneuronen nach pharmakologischer Aktivierung G α_q -gekoppelter Rezeptoren (Sonde: Tubby-Domäne)

3.2.1 PIP₂-Dynamik nach Aktivierung von mAChR: Soma

Im Fokus dieser Arbeit stand die Frage, ob die Aktivierung G α_q -gekoppelter Rezeptoren in CA1-Pyramideneuronen *in situ* einen messbaren Abbau der PIP₂-Konzentration bewirkt und wie sich der zeitliche Verlauf dieses putativen Signals verhält. Als zentrales Modellsystem diente die cholinerge Innervation der Neurone, deren muskarinische Rezeptoren zunächst mit dem spezifischen Agonisten Oxo-M aktiviert wurden. Dies führte zu einer robusten PIP₂-Depletion in den Pyramidenzellen. Die Abbildungen 3.4 A bis C zeigen exemplarisch den Verlauf einer solchen Messung am Soma (vgl. auch Abschnitt 2.6.1). Mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wurden serielle Aufnahmen einzelner Neurone angefertigt. Unter Ruhebedingungen sind die Sonden überwiegend an die PIP₂-Moleküle in der Plasmamembran gebunden, erkennbar an einer starken Fluoreszenz an der Membran (A). Unter Oxo-M-Applikation kommt es zu einer PIP₂-Reduktion in der Plasmamembran, die zu einer Abnahme der Fluoreszenz an der Membran und zu einer Zunahme im Bereich des Zytoplasmas führt (B). Die Fluoreszenzintensität im Bereich des Nukleus bleibt dabei weitgehend unverändert, wodurch dieser demaskiert wird. Nach Auswaschen des Agonisten regeneriert sich der PIP₂-Gehalt in der Membran, wodurch die fluoreszierenden Sonden wieder dorthin rekrutiert werden (C).

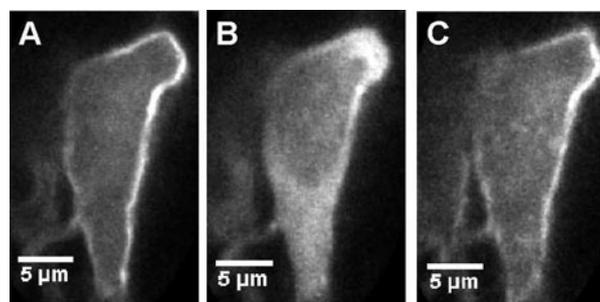


Abb. 3.4: Oxo-M-induzierte Translokation der PIP₂-Sonden (Tubby) im Soma. A-C: Originalkonfokalmikroskopische Aufnahmen einer Zeitserie am Soma. Zur besseren Darstellung wurde der Kontrast der Bilder nachträglich um 3% verstärkt. **A)** Unter Ruhebedingungen sind die fluoreszierenden Sonden an die Plasmamembran gebunden. **B)** Rezeptorinduzierte PIP₂-Depletion bewirkt die Translokation in das Zytoplasma mit Demaskierung des Zellkerns. **C)** Die Regeneration des PIP₂ rekrutiert die Sonden zurück zur Membran.

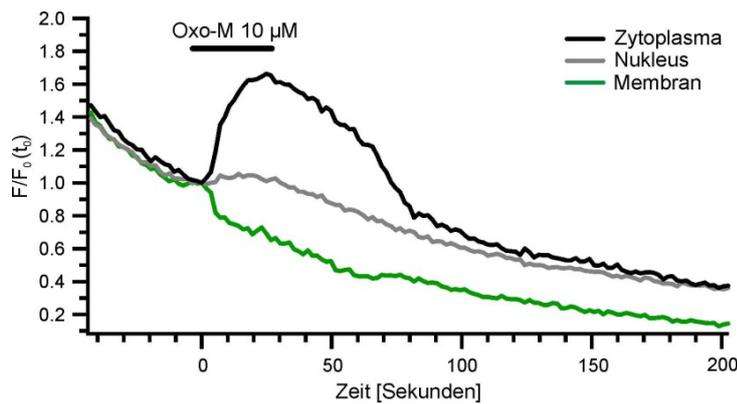


Abb. 3.5: Quantifizierung der PIP₂-Dynamik anhand der relativen Fluoreszenzintensität (F/F_0). Die Oxo-M induzierte PIP₂-Depletion führt zu einer Änderung der Fluoreszenzintensität in den *Regions of Interest* (ROI; Zytoplasma, Nukleus, Membran). Die Daten wurden auf den letzten Messpunkt vor Beginn der Antwort normiert (Zeitpunkt t_0). Der Balken zeigt die Applikationsdauer an und berücksichtigt die Latenz der Antwort.

Zur Quantifizierung der Effekte wurden in den verschiedenen Regionen der Neurone sogenannte ROIs (engl. *Regions of Interest*) definiert, aus denen der jeweilige Verlauf der Fluoreszenzintensität extrahiert und graphisch dargestellt wurde. Abbildung 3.5 zeigt ein repräsentatives Beispiel der so gewonnenen Daten von ROIs für Zytoplasma, Nukleus und Membran. Eine 30-sekündige Applikation von Oxo-M führt hier zu einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenz im Zytoplasma und einer simultanen Abnahme an der Membran, während es im Bereich des Nukleus zu einer schwachen Zunahme kommt, die in vielen Zellen auch ausblieb. Die über alle Bereiche gemessene Gesamtfluoreszenz blieb in der Regel stabil, da die verwendete Messmethode auf einer Translokation der Sonden ohne Intensitätssteigerung beruht. Eine schwache Zunahme der Gesamtfluoreszenz wurde nur in Einzelfällen beobachtet (nicht gezeigt). In Abb. 3.5 ist auch zu beobachten, dass es sowohl vor der Applikation als auch während der weiteren Messdauer zu einer exponentiell verlaufenden Abnahme der Fluoreszenzintensität kommt, die durch ein Ausbleichen des Fluorophors bedingt ist. Dies konnte auch durch Anpassung von Laserstärke und Scanzeit nicht gänzlich vermieden werden. Eine nachträgliche Korrektur des Fluoreszenzverlaufs durch Anpassung einer Kurvenfunktion führte nicht in allen Fällen zu einem zufriedenstellenden Ergebnis. Auch der aus Fluorophorspezifischer- und Hintergrundfluoreszenz zusammengesetzte Verlauf der Gesamtfluoreszenz entspricht nicht zwangsläufig dem der gemessenen Regionen. Aus diesem Grunde wurde in den in dieser Arbeit gezeigten Daten auf eine Korrektur des Bleichens allgemein verzichtet, sofern nicht ausdrücklich angegeben. Um eine gute Vergleichbarkeit der Amplituden zu gewährleisten, wurden alle Messungen nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz auf den letzten Datenpunkt vor dem erkennbaren Anfang der Reaktion normiert (Fluoreszenz F /Ausgangsfluoreszenz F_0). Soweit nicht anders angegeben, entspricht der Zeitpunkt der Normierung dem Zeitpunkt 0 in den Abbildungen (t_0 , vergleiche Abb. 3.5).

Quantitative Daten über die Translokation der Sonden können sowohl über die Abnahme der Fluoreszenz an der Membran als auch aus der Zunahme im Zytoplasma gewonnen

werden. Um die Dynamik an der Membran analysieren und von anderen Regionen abgrenzen zu können, wurden die ROIs auf einen sehr engen Bereich eingegrenzt, der sehr sensitiv auf kleine Verschiebungen des Präparats reagiert. Die Auswertung der zytoplasmatischen ROIs erwies sich hingegen als die robustere Methode, weshalb alle folgenden Vergleiche zwischen verschiedenen Neuronen auf Messung der zytoplasmatischen Fluoreszenzintensität beruhen. Alle Mittelwerte sind soweit nicht anders ausgewiesen \pm Standardfehler angegeben. In einzelnen Fällen, in denen die Scanzeit bzw. Sampling-Rate leicht vom Standardprotokoll abwich, wurde für die betroffenen Daten eine neue Rate berechnet und die Ergebnisse vor der Verwendung in gemittelten Kurven mit den Originalen überlagert. Signifikanzen wurden soweit nicht anders angegeben mit gepaarten und ungepaarten t-Tests überprüft (mit Fehlerwahrscheinlichkeit p).

Abb. 3.6 zeigt die durchschnittliche somatische Reaktion von 28 Neuronen auf eine 30 s Applikation von 10 μ M Oxo-M (26 Hirnschnitte, 16 Ratten). Die Angabe des Applikationszeitpunkts berücksichtigt die durchschnittliche Latenz der Antworten von $8,77 \pm 2,54$ s. Die über eine monoexponentielle Kurvenfunktion ermittelte Zeitkonstante τ des Fluoreszenzanstiegs bzw. der apparenten PIP_2 -Depletion betrug $6,64 \pm 0,42$ s. Zusätzlich wurde für alle Messungen die Zeit ermittelt, die zum Erreichen von 90% der maximalen Amplitude benötigt wurde (t_{90} , hier $19,92 \pm 2,38$ s). Die t_{90} -Werte zeigten sich als besser geeignet, um die Kinetik aller Daten miteinander vergleichen zu können (vgl. Abschnitt 3.2.3 und 3.2.7). Die Translokation der Sonden erreichte im Zytoplasma im Mittel eine Amplitude von $1,73 \pm 0,06$, d.h. +73% relativ zur Ausgangsfluoreszenz. Dem Auswaschen des Agonisten folgte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität und damit eine Regeneration der PIP_2 -Level in der Membran mit einer Zeitkonstante τ von $54,46 \pm 8,44$ s. Die Zeit, welche bis zu einem Abfall auf 10 % der Amplitude benötigt wird (t_{10} , d.h. 90 % Regeneration), betrug $65,08 \pm 7,57$ s. Alle Werte wurden aus den Einzelmessungen ermittelt (zur graphischen Darstellung der Zeitkonstanten siehe Abb. 3.11 Abschnitt 3.2.2).

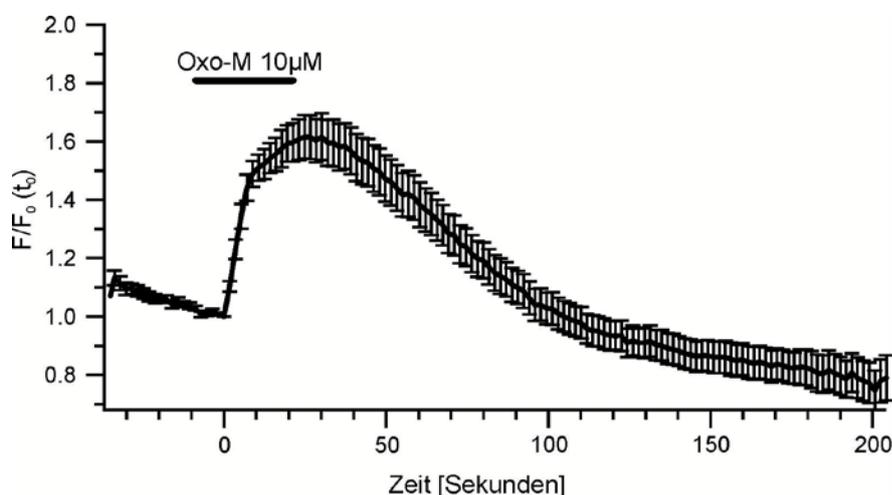


Abb. 3.6: Mittlere mAChR-induzierte PIP_2 -Dynamik auf eine 30 s-Applikation des Agonisten Oxo-M am Soma von CA1-Pyramidenneuronen. Angegeben ist die relative Fluoreszenz $F/F_0 \pm$ Standardfehler ($n = 28$). Der Balken für die Applikation berücksichtigt die mittlere Latenz der Antworten.

Anhand von Abb. 3.7 A wird deutlich, dass die Latenzzeit der Antworten nicht nur von der Lage des Neurons im Hirnschnitt und dem Abstand der Applikationskapillare von der Zelle beeinflusst wurde, sondern auch zwischen bezüglich der Lage sehr ähnlichen Neuronen variieren konnte. Zur besseren Darstellung der zeitlichen Differenz entspricht der Zeitpunkt 0 hier dem Start der Applikation. In diesem Beispiel von zwei ca. 8 μm auseinander liegenden und simultan gemessenen Zellen zeigt (das Näher zur Applikationskapillare liegende) Neuron 2 eine ausgeprägte Latenz von mehr als 30 Sekunden. Auch die Kinetik der beiden Neurone ist stark unterschiedlich.

Bei 11 Pyramidenzellen wurde eine Wiederholung der Applikation durchgeführt (Abb. 3.7 B), die nach vollständiger Regeneration der Fluoreszenz und mindestens 10 Minuten Abstand zur vorausgegangenen Applikation erfolgte. Die Neurone wiesen bei der ersten Applikation eine mittlere Amplitude von $1,76 \pm 0,13$ auf, die in der zweiten Applikation auf $1,60 \pm 0,09$ erniedrigt war. Für weitere Applikationen ergaben sich Amplituden von $1,57 \pm 0,09$ (3. Applikation; n=11), $1,55 \pm 0,08$ (4. Applikation; n=5), $1,32 \pm 0,06$ (5. Applikation; n=4) und $1,43 \pm 0,03$ (6. Applikation; n=3). Eine Zelle, die in der 1. Applikation eine Amplitude von 2,19 erreichte, wurde 12-mal gemessen und Antwortete bis zum Schluss mit einer Translokation der Sonden (Applikation 7-12 in Abb. 3.7 B). Zusammenfassend zeigen die Antworten der Pyramidenzellen also eine leichte Desensitisierung. Zwei der Neurone zeigten jedoch in der zweiten und dritten Applikation eine gegenüber der ersten verstärkte PIP₂-Depletion.

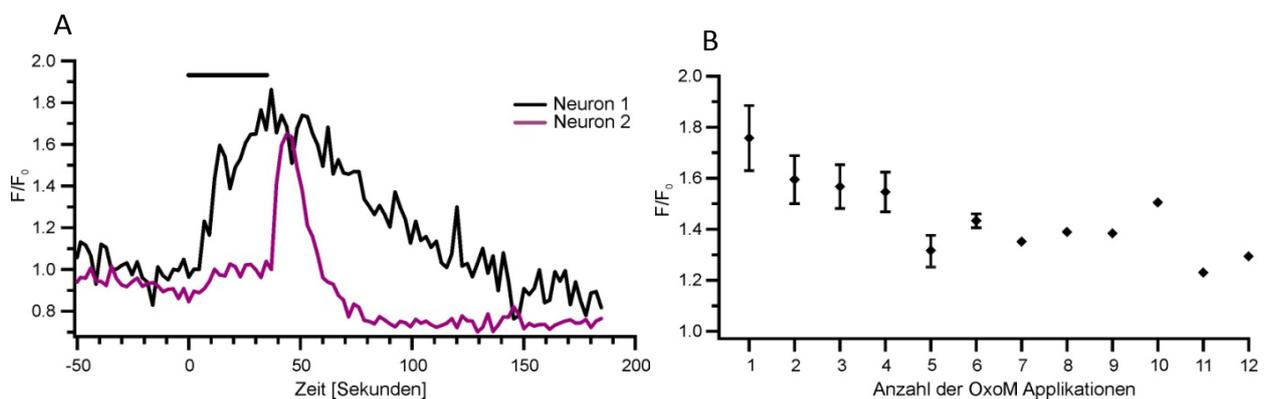


Abb. 3.7: Variabilität der Latenzzeiten zwischen Neuronen und Amplituden wiederholter mAChR-Aktivierung im Soma. A) Latenzzeitunterschied zwischen 2 simultan gemessenen Neuronen. Der Zeitpunkt t_0 gibt den Start der Applikation an (Balken; F ist normiert auf den Beginn der Antwort). B) Amplituden der apparenten PIP₂-Depletion bei wiederholter Rezeptoraktivierung mit Oxo-M (Applikation 1 – 3: n = 11; 4: n = 5; 5: n = 4; 6: n = 3; 7 – 12: n = 1).

Die bereits erwähnte Zelle mit 12 Applikationen zeigte ab der 2. Applikation die Neigung zu einem 2. Maximum (engl. *Peak*), ein Verhalten, das unabhängig von der Zahl der Applikationen in einzelnen Messungen zu beobachten war (Abb. 3.8). Die Auswertung der

verschiedenen ROIs zeigt, dass es sich hierbei um ein spezifisches Translokationssignal handelt, mit einem gespiegeltem Verlauf der Membranfluoreszenz (s. Abb. 3.8) und einem konstant bleibenden Signal im Nukleus (nicht gezeigt). In der 12. Applikation erreichte die Zelle bei anhaltender Applikation 4 Peaks in 160 s (Gewertet wurde hier für die Amplitude nur der erste *Peak*).

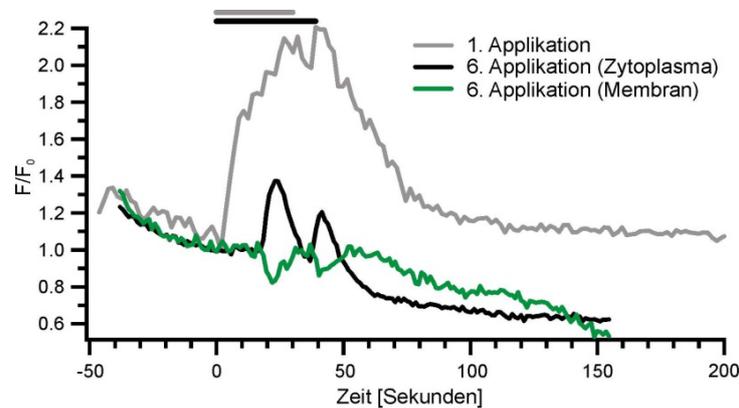


Abb. 3.8: mACh-Rezeptor-induzierte Oszillationen des PIP₂-Levels. t_0 gibt jeweils den Start der Applikation an. **A)** Oszillation des PIP₂-Levels eines Neurons unter Oxo-M Wirkung (in der 6. Applikation). Die Dynamik des zytoplasmatischen Fluoreszenzsignals (schwarz) wird im Membranbereich (grün) gespiegelt. In der 1. Applikation (grau) zeigt das Neuron keine Oszillation, außerdem verändert sich die Latenz (F ist auf den Start der Antworten normiert).

3.2.2 Dendritische PIP₂-Dynamik nach Aktivierung von mAChR

Die optische Messbarkeit der PIP₂-Dynamik hängt von der optischen Auflösung einerseits sowie andererseits dem Durchmesser und der Lage der zu analysierenden Struktur im Gewebe ab. Voraussetzung für die Analyse der Sondentranslokation ist die Unterscheidbarkeit zwischen Membran und Zytoplasma. Für die Praxis bedeutete dies, dass ein zu messender Dendrit einen Durchmesser $> 1 \mu\text{m}$ haben und möglichst parallel zur Schnittoberfläche verlaufen sollte. (Für die Vitalität der Neurone ist es hingegen besser, wenn die apikalen Dendriten tendenziell in den Schnitt hinein laufen, um nicht verletzt zu werden). Mit diesen Voraussetzungen konnten Dendriten etwa $20 \mu\text{m}$ vom Soma in basaler Richtung und $300 \mu\text{m}$ entlang des apikalen Hauptdendriten und seiner ersten Abzweigungen erfolgreich gemessen werden. (Die Distanz vom *Stratum pyramidale* zur *Fissura hippocampi* betrug bei den verwendeten Ratten ca. $400 \mu\text{m}$).

Die Abb. 3.9 A-C zeigen exemplarisch die Oxo-M-induzierte Sondentranslokation an Originalbildern eines apikalen Dendriten ca. $60 \mu\text{m}$ vom Soma. Unter Ruhebedingungen ist die GFP-Fluoreszenz auf die Membran konzentriert (A). Aktivierung der muskarinischen Rezeptoren induziert eine PIP₂-Depletion und die Dissoziation der Sonden von der

Membran (B). Nach Auswaschen des Agonisten und Regeneration der PIP₂-Level erfolgt die Relokation der Sonden vom Zytoplasma zur Membran (C). Der Verlauf der Dynamik ist in Abb. 3.9 D rekonstruiert. Bei der Grafik handelt es sich um eine Aneinanderreihung von optischen Schnitten der Zeitserie von A-C (*engl. Linestack*). Dabei werden Linienprofile durch die Bilder der Neurone (hier Dendriten) gelegt und diese dann entsprechend der zeitlichen Abfolge zusammengesetzt. Der Zeitpunkt 0 markiert auch hier die spätere Normierung und somit den Start der gemessenen PIP₂-Depletion, erkennbar an der Erhöhung der Fluoreszenz im zytoplasmatischen Bereich.

Abb. 3.9 E zeigt ein repräsentatives Beispiel der Auswertung von ROIs in Zytoplasma und Membran. Auf 30s Oxo-M-Applikation antwortet die Zelle mit einer Zunahme der Fluoreszenz im Zytoplasma und einer simultanen Abnahme an der Membran. Auch hier ist ein Bleichen des Fluorophors zu verzeichnen, das bei einigen eher tief gelegenen und schwach fluoreszierenden Dendriten das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verschlechterte.

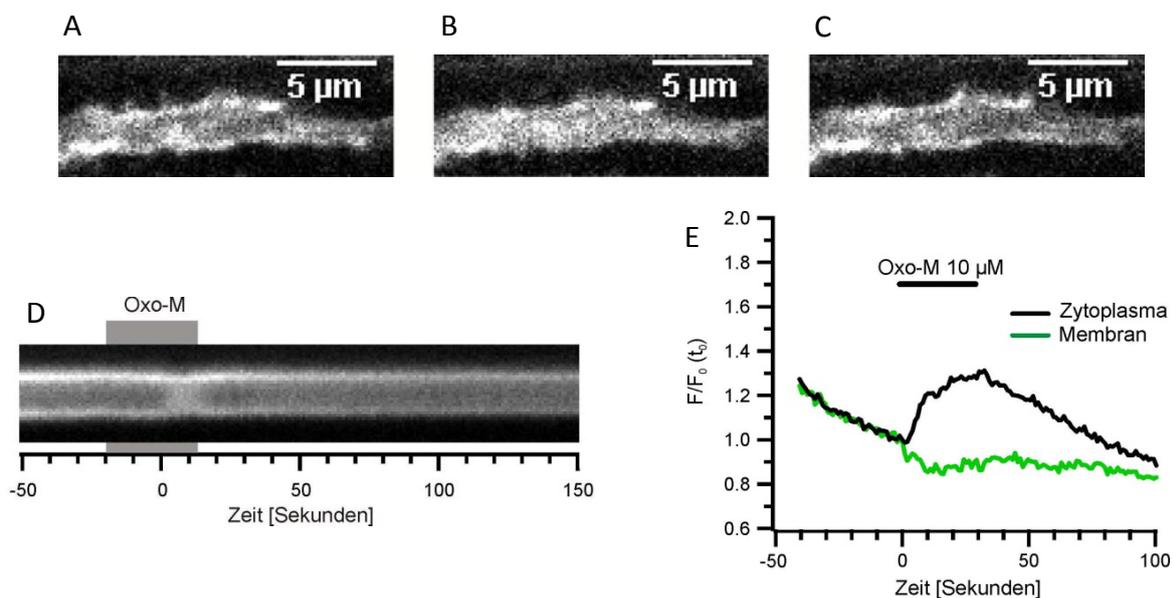


Abb. 3.9: Oxo-M-induzierte Translokation der PIP₂-Sonden (Tubby) in Dendriten. A-C: Konfokale Originalaufnahmen einer Zeitserie; Kontrastverstärkung 10%. **A)** Ruhebedingungen **B)** Rezeptorinduzierte PIP₂-Depletion bewirkt die Translokation in das Zytoplasma **C)** Die Regeneration des PIP₂ rekrutiert die Sonden zurück zur Membran. **D)** *Linestack*-Rekonstruktion des Zeitverlaufs der Serie aus A-C (erstellt aus über 20 Pixeln gemittelten Linienprofilen der Einzelbilder, Kontrastverstärkung 2%). **E)** Quantifizierung/Verlauf der Dynamik in den ROI Zytoplasma und Membran eines Dendriten.

Die Auswertung von 12 Dendriten separater Neurone (Abb. 3.10) ergab eine mittlere Latenz der Reaktionen von $14,29 \pm 5,26$ s und eine mittlere Amplitude von $1,57 \pm 0,06$ der Ausgangsfluoreszenz (F/F_0 ; 13 Hirnschnitte, 10 Ratten). Ein weiterer apikaler Dendrit 190 μm vom Soma zeigte bei gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis keine Reaktion und ist separat eingezeichnet (graue Line in Abb. 3.10). Der Verlauf der Fluoreszenz des Dendriten ohne Reaktion zeigt eine gute Übereinstimmung mit den gemittelten Kurven.

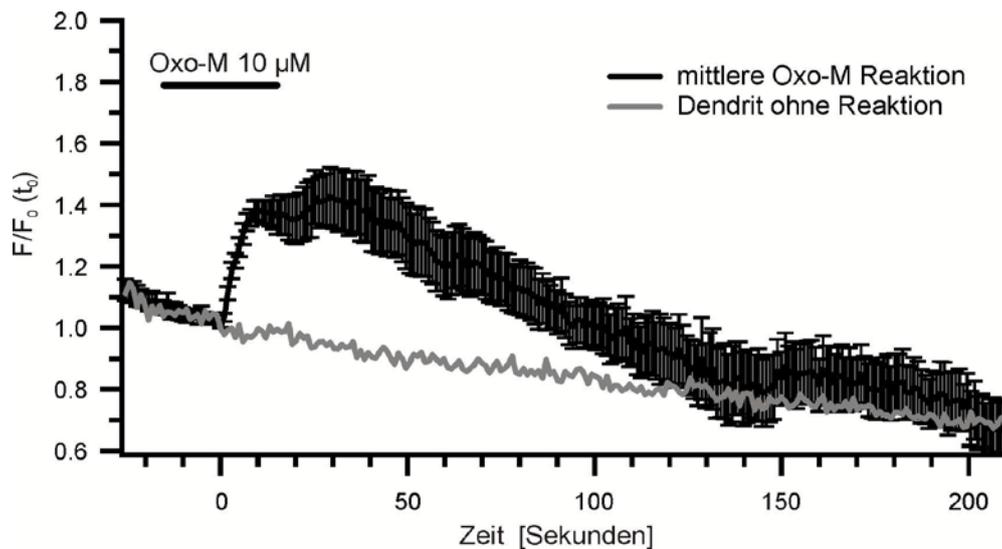


Abb. 3.10: Mittlere mAChR-induzierte PIP_2 -Dynamik auf eine 30 s Applikation des Agonisten Oxo-M in Dendriten von CA1-Pyramidenneuronen. Angegeben ist die relative Fluoreszenz $F/F_0 \pm$ Standardfehler ($n = 12$, schwarz). Der Balken für die Applikation berücksichtigt die mittlere Latenz der Antworten (vgl. Text). Ein weiterer Dendrit zeigte keine Reaktion auf Oxo-M (grau).

Die Mittelwerte der einzeln analysierten Zeitkonstanten waren $7,43 \pm 1,36$ s für den zytoplasmatischen Fluoreszenzanstieg (PIP_2 -Depletion) und $40,69 \pm 7,57$ s für die Regeneration. Im Vergleich zum Soma (Abb. 3.11 A) ergibt sich für die Dendriten eine stärkere Streuung der Depletions-Zeitkonstante mit einem nicht signifikant erhöhten Mittelwert. (Ein direkter Fit der gemittelten Graphen ergab eine leicht kleinere Zeitkonstante der Dendriten). Die Regeneration erfolgt in den Dendriten im Mittel etwas schneller als im Soma (Abb. 3.11 B), dieser Unterschied ist aber bei vergleichbarem Standardfehler ebenfalls nicht signifikant.

Um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen den Eigenschaften der PIP_2 -Dynamik und dem Ort der Messung entlang der Längsachse des Dendritenbaums gibt, wurden die Werte gegen die Distanz zum Soma aufgetragen (Abb. 3.11 C). Sowohl die Amplitude als auch die Zeitkonstante des gemessenen Fluoreszenzanstiegs zeigen über den proximal-distalen Bereich eine Streuung, die keine Korrelation mit dem Ort der Messung erkennen lässt.

Bei 9 Dendriten wurde die Oxo-M Applikation wiederholt. In Abb. 3.11 D sind die Amplituden der Antworten auf Oxo-M von Dendrit und Soma gegen die Anzahl der Applikationen aufgetragen. Wie bereits am Soma beobachtet, sind die Amplituden der zweiten Applikation ($1,42 \pm 0,08$, $n = 9$) im Mittel etwas kleiner als die der ersten ($1,59 \pm 0,08$, $n = 9$). Weitere gemessene Amplituden waren $1,33 \pm 0,14$ (3. Applikation, $n=5$), $1,43$ (4. Applikation, $n = 2$) und $1,32$ (5. Applikation, $n = 2$). Ein Dendrit, der 8-mal gemessen wurde, zeigte in der 7. Applikation keine messbare Translokation, reagierte aber in der 8. Applikation wieder. Zwei Dendriten erreichten in der zweiten Applikation eine höhere

Amplitude als in der ersten. Prinzipiell antworten die Neurone also auch in den Dendriten mit PIP_2 -Depletion auf eine wiederholte Rezeptoraktivierung und zeigen dabei wie im Soma einen Trend zu verringerten Amplituden bzw. einer Desensitisierung.

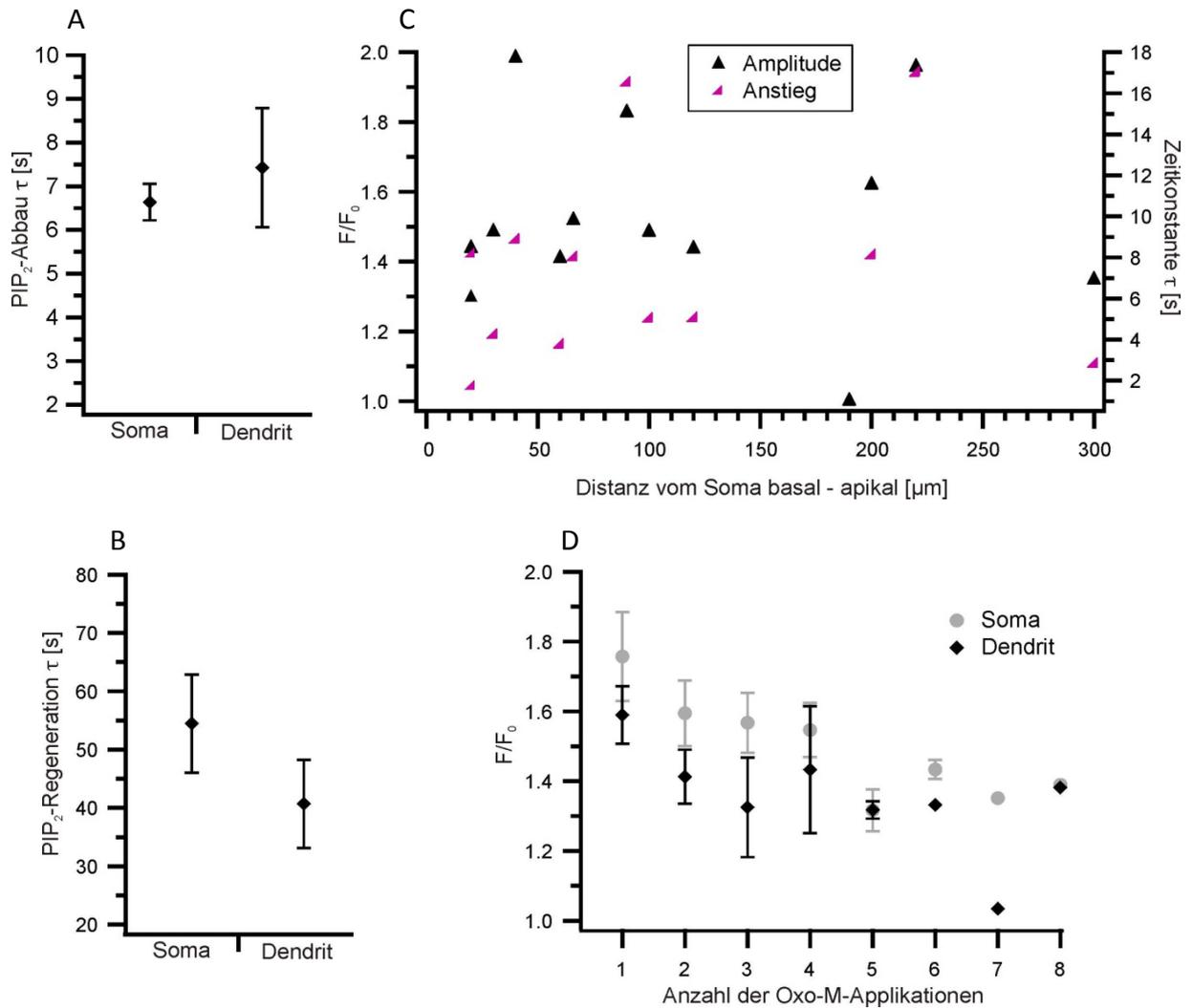


Abb. 3.11: Zeitkonstanten und Amplituden der mAChR-induzierten PIP_2 -Dynamik in Soma und Dendriten. A-B) Mittlere Zeitkonstanten τ (Soma $n = 28$, Dendrit $n = 12$). **A)** PIP_2 -Abbau **B)** PIP_2 -Regeneration. **C)** Verteilung der Dendriten Einzelamplituden (linke y-Achse, schwarz) und -Zeitkonstanten (rechte y-Achse, lila) bezogen auf die Entfernung der Messung zum Soma. **D)** Amplituden der apparenten PIP_2 -Depletion bei wiederholter Rezeptoraktivierung mit Oxo-M (Dendrit Applikation 1 – 2: $n = 9$; 3: $n = 5$; 4-5: $n = 2$; 6-8: $n = 1$, Soma Applikation 1 – 3: $n = 11$; 4: $n = 5$; 5: $n = 4$; 6: $n = 3$; 7 – 8: $n = 1$).

3.2.3 PIP₂-Dynamik nach Aktivierung von mGluRI: Soma

In CA1-Pyramidenneuronen führte auch die Aktivierung von metabotropen TypI-Glutamatrezeptoren mit 10 μ M des spezifischen Agonisten DHPG zu einer PIP₂-Depletion. Die Messungen erfolgten bis auf 4 Neurone alternierend mit Oxo-M Applikationen, wobei DHPG immer zuerst appliziert wurde. Die Abb. 3.12 A bis C zeigen die durch DHPG induzierte Translokation der PIP₂-Sonden anhand von repräsentativen Originalbildern einer Zeitserie am Soma. Abb. 3.12 D zeigt eine Rekonstruktion (*Linestack*) der somatischen Sondentranslokation der Zelle aus A bis C. Unter Ruhebedingungen sind die Sonden überwiegend an das PIP₂ in der Membran gebunden (A). Die Verringerung der PIP₂-Konzentration durch mGluRI bewirkt die Translokation der Sonden ins Zytoplasma und erhöht dort die gemessene Fluoreszenz (B). Die simultane Abnahme der Membranfluoreszenz ist in D (unten) nur schwach erkennbar. Nach Auswaschen des Agonisten erfolgt eine Regeneration des PIP₂ und folglich der Fluoreszenz an der Membran (C). Die Fluoreszenz im Bereich des Nukleus (D oben im Bild) bleibt über die Zeit stabil.

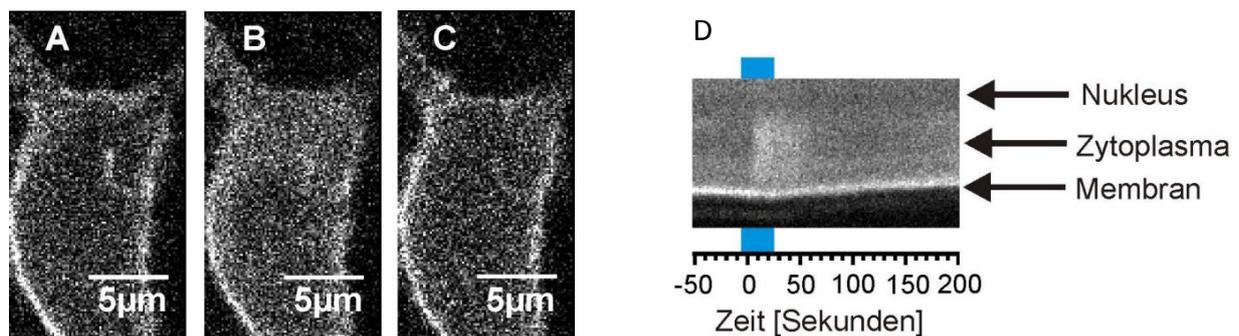


Abb. 3.12: DHPG-induzierte Translokation der PIP₂-Sonden (Tubby) im Soma. A-C: Konfokale Originalaufnahmen einer Zeitserie; Kontrastverstärkung 4%. A) Ruhebedingungen B) Rezeptorinduzierte PIP₂-Depletion bewirkt die Translokation in das Zytoplasma C) Die Regeneration des PIP₂ rekrutiert die Sonden zurück zur Membran. D) *Linestack*-Rekonstruktion des Zeitverlaufs der Serie aus A-C (erstellt aus über 20 Pixeln gemittelten Linienprofilen der Einzelbilder, Kontrastverstärkung 2%).

Abb. 3.13 A zeigt den gemittelten Verlauf der mGluRI-induzierten PIP₂-Dynamik nach 30s Applikation von DHPG (n = 15, 14 Hirnschnitte, 11 Ratten). Zum Vergleich ist der Verlauf der mittleren Oxo-M-induzierten Dynamik mit eingezeichnet. Die Translokation nach DHPG-Applikation erfolgte mit einer Latenz von $6,81 \pm 0,89$ s und erreichte eine Amplitude von $1,37 \pm 0,05$ bezogen auf die zytoplasmatische Ausgangsfluoreszenz (F/F_0). Auffallend in Grafik 3.13 A ist, dass die Regeneration der PIP₂-Level schon vor dem Auswaschen des Agonisten einsetzt. Tatsächlich zeigten drei der Neurone eine transiente Reaktion auf DHPG mit dem Einsetzen der Regeneration vor dem Ablauf von 30 s. Da dies schon während der Messung auffiel, wurde die Applikationsdauer bei diesen Zellen auf eine Minute ausgeweitet. Die verlängerte Applikation führte nicht zu einem weiteren Anstieg der zytoplasmatischen

Fluoreszenz. Zwei dieser Neurone wurden simultan im gleichen Hirnschnitt gemessen. Ein Beispiel für einen solchen Verlauf ist in Abb. 3.13 B gezeigt (Neuron 1). Bei einer weiteren (separat gemessenen) Zelle trat nach der Ausweitung der Applikation auf 47 s ein zweiter Peak auf (Neuron 2 in Abb. 3.13 B). Da alle vier Zellen das Maximum der Translokation innerhalb von 30 s erreichten, wurden Sie in den gemittelten Graph mit einbezogen. Das Herausnehmen des Neurons mit zweitem *Peak* verursacht im betroffenen Bereich eine Änderung von $\leq 1,2\%$.

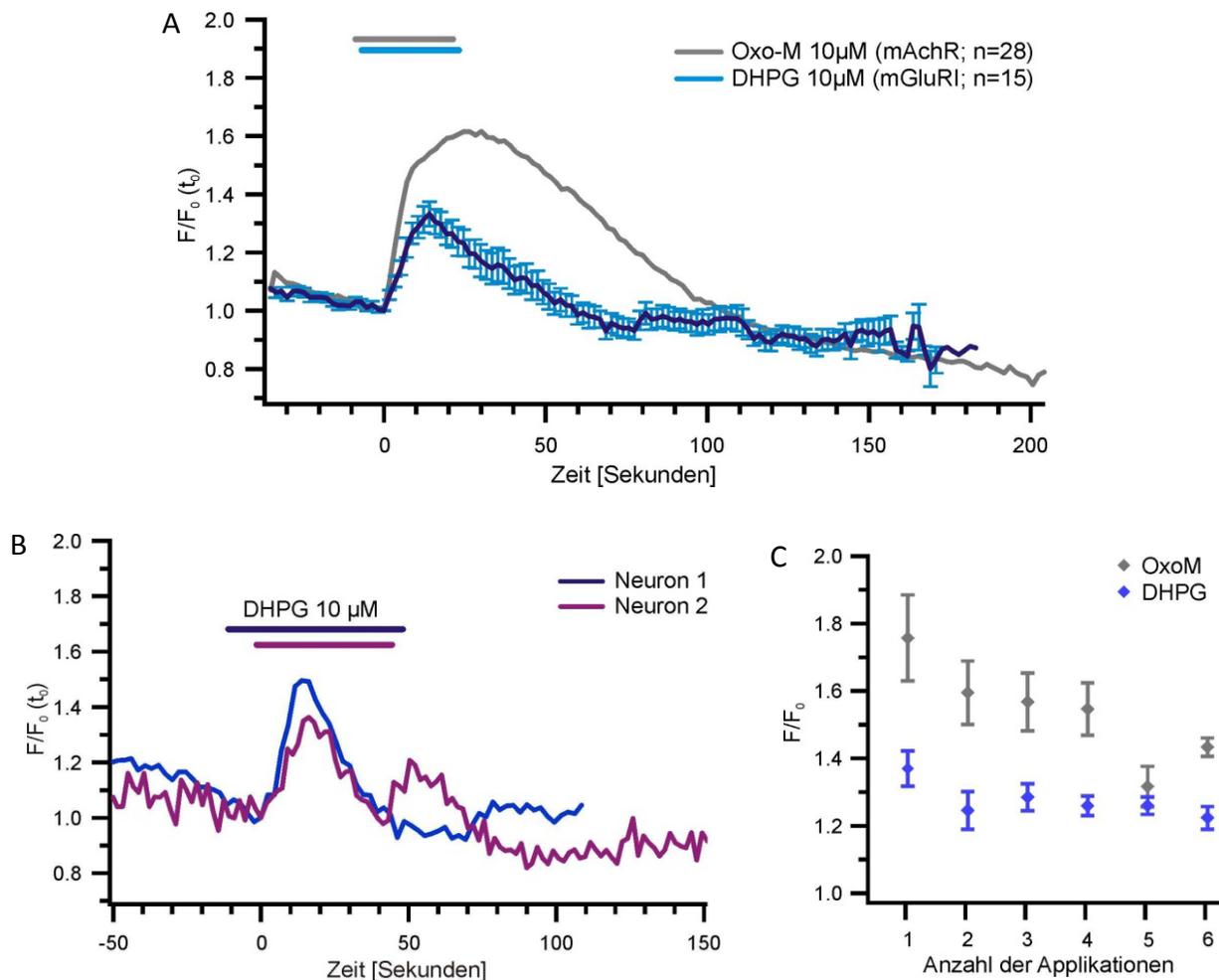


Abb. 3.13: Somatische mGluRI-induzierte PIP_2 -Dynamik bei 30 s Applikation des Agonisten DHPG. **A)** Mittlere mGluRI-induzierte PIP_2 -Dynamik (Mit Oxo-M Antwort zum Vergleich; DHPG $F/F_0 \pm$ Standardfehler). **B)** Beispiel für zwei separat gemessene Neurone, deren transiente bzw. oszillierende PIP_2 -Dynamik zu einer Abnahme der zytoplasmatischen Fluoreszenz vor Ende der DHPG-Applikation führt. **C)** Amplituden bei wiederholter Rezeptoraktivierung (DHPG 1-2: n = 11, 3: n = 8, 4-5: n = 3, 6: n = 2; Oxo-M-Daten zum Vergleich mit aufgetragen, 1 - 3: n = 11; 4: n = 5; 5: n = 4; 6: n = 3). Die Applikations-Balken berücksichtigen die mittlere Latenz der Antworten.

Die Amplituden der vier Neurone mit einem vorzeitigem Abfall der zytoplasmatischen Fluoreszenz sowie von zwei weiteren Neuronen (d.h. insgesamt 6 von 15) erreichten keine Plateauphase, die für eine zuverlässige Bestimmung einer Zeitkonstante für den Fluoreszenzanstieg erforderlich gewesen wäre. Dies gilt auch für den gemittelten Graph

aller 15 Neurone. Die apparente Depletions-Zeitkonstante der übrigen 9 Neurone betrug $6,4 \pm 0,86$ s. Die Zeit bis zum Erreichen von 90% der maximalen Amplitude ergab einen mittleren t_{90} -Wert von $12,68 \text{ s} \pm 1,15 \text{ s}$ ($n = 15$). Die Regeneration aller 15 Neurone erfolgte mit einer Zeitkonstante τ von $18,18 \text{ s} \pm 2,14 \text{ s}$ und einer t_{10} von $28,38 \pm 3,57$ s.

Wie bereits bei den Oxo-M-Messungen beobachtet, so waren auch die Amplituden der DHPG-induzierten Sondentranslokation in wiederholten Applikationen tendenziell kleiner als bei der ersten (Abb. 3.13 C). Die gemessenen Amplituden waren im Einzelnen: $1,37 \pm 0,05$, (1. Applikation, $n = 11$), $1,25 \pm 0,06$ (2. Applikation, $n = 11$), $1,29 \pm 0,04$ (3. Applikation, $n = 8$), $1,26 \pm 0,03$ (4. Applikation, $n = 3$), $1,26 \pm 0,03$ (5. Applikation, $n = 3$) und $1,22$ (6. Applikation, $n = 2$). Bei 2 Neuronen traten in der dritten Applikation leicht höhere Werte auf als in der ersten.

3.2.4 Dendritische PIP₂-Dynamik nach Aktivierung von mGluRI

Abb. 3.14 A zeigt die *Linestack*-Rekonstruktion einer DHPG-induzierten Sondentranslokation in einem proximalen apikalen Dendriten. Ab dem Zeitpunkt 0 ist eine schwache Erhöhung der zytoplasmatischen Fluoreszenz zu erkennen, die nach Auswaschen des Agonisten wieder verschwindet. Deutlicher wird der Verlauf der PIP₂-Dynamik nach Auswertung der Intensitätsunterschiede in den ROIs (Abb. 3.14 B). Hier lässt die Messung auch die simultan zur zytoplasmatischen Fluoreszenzzunahme verlaufende Abnahme in der Membranregion erkennen.

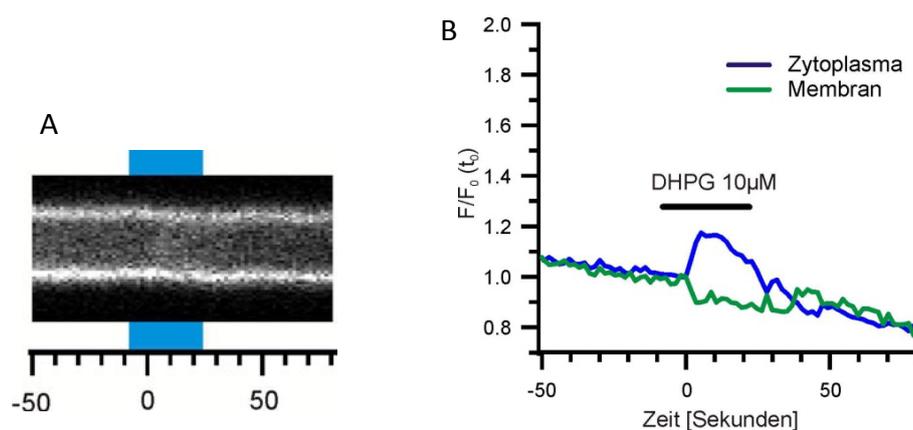


Abb. 3.14: DHPG-induzierte Translokation der PIP₂-Sonden (Tubby) in Dendriten. A) *Linestack*-Rekonstruktion des Zeitverlaufs der relativen Fluoreszenzintensität (erstellt aus über 10 Pixeln gemittelten Linienprofilen der Einzelbilder, Kontrastverstärkung 3%). **B)** Quantifizierung/Verlauf der Dynamik in den ROI Zytoplasma und Membran des Dendriten aus A.

Mit der Tubby-Domäne wurden Daten von drei Dendriten erhalten, deren einzelne zytoplasmatische ROI-Messungen in Abb. 3.15 dargestellt sind (Neuron 1 entspricht der

Zelle aus Abb. 3.14). Auf eine Mittelung der Graphen wurde hier verzichtet. Die drei Messungen wurden in einer Distanz vom Soma von 20, 100 und 300 μm gemessen. Alle drei Dendriten zeigten mit DHPG kleinere Amplituden als mit der anschließend durchgeführten Applikation von Oxo-M. Die Auflösung des Zeitverlaufs ist in den beiden distal gemessenen Dendriten aufgrund der schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnisse etwas geringer. Die Messungen zeigten allerdings keine Artefakte und ließen ein schwaches, aber typisches Muster der Sondentranslokation erkennen. Daher sind die Signale als spezifische Messungen einer zugrunde liegenden PIP_2 -Depletion einzustufen. Weitere Messungen einer DHPG-induzierten Sondentranslokation in Dendriten wurden mit der PH-Domäne durchgeführt (s. Abschnitt 3.3.3).

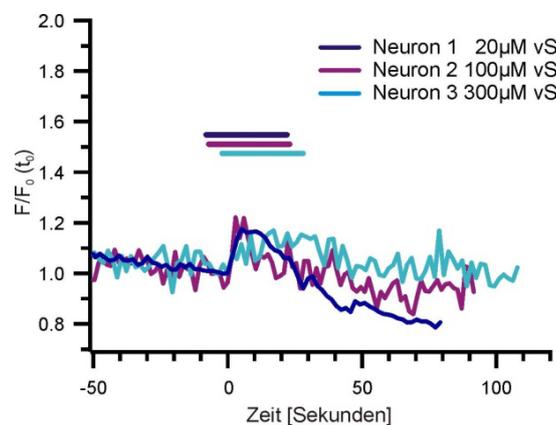


Abb. 3.15: Vergleich der in verschiedener Entfernung vom Soma gemessenen mGluRI-induzierten PIP_2 -Dynamik in Dendriten nach 30 s DHPG-Applikation. (Balken \equiv Zeitpunkt der DHPG Applikation).

3.2.5 PIP_2 -Dynamik nach verlängerter Aktivierung von mAChR und mGluRI (Soma)

Die teilweise transiente Antwort der Pyramidenzellen auf DHPG und das Auftreten von einem zweiten *Peak* sowohl bei DHPG- als auch bei Oxo-M-Applikation wies darauf hin, dass die PIP_2 -Dynamik in diesen Zellen sowohl zeitlich variabel als auch transmitterspezifisch ist. Zudem ergab sich aus der zwischen beiden Agonisten signifikant unterschiedlichen Amplitude die Frage, ob sich insbesondere die mGluRI-induzierte PIP_2 -Depletion im Zeitverlauf noch verstärken kann. Dazu wurden weitere Experimente mit einer verlängerten (ca. fünfminütigen) pharmakologischen Aktivierung von mAChR und mGluRI durchgeführt. Die Antworten beider Agonisten wurden an denselben Zellen gemessen, wobei die DHPG-Applikation in der Regel zuerst erfolgte. Die Oxo-M-Applikation wurde nach vollständiger Regeneration der DHPG-induzierten PIP_2 -Depletion und mindestens 10 Minuten Abstand durchgeführt.

Wie Abb. 3.16 zeigt, verläuft die Kinetik der gemittelten PIP₂-Depletion bei beiden Rezeptoren anfangs recht ähnlich und neigt dann bei mGluRI bis zur maximalen Amplitude zu einer stärkeren Abflachung. Die Fluoreszenz benötigt bis zum Erreichen von 90% der maximalen Amplitude (t_{90}) bei Oxo-M $39,3 \pm 5,27$ s ($n = 17$, Latenz $7,65 \pm 1,54$ s) und bei DHPG $43,29 \pm 8,81$ s ($n = 16$, Latenz $14,07 \pm 7,03$ s; jeweils ermittelt aus Einzeldaten). Bei beiden Rezeptortypen verläuft die mittlere PIP₂-Dynamik phasisch-tonisch. Bei der Oxo-M-induzierten Antwort ist die phasische Komponente stärker ausgeprägt und die apparente Depletion erreicht eine höhere Anfangsamplitude ($F/F_0 = 1,55 \pm 0,07$ bei DHPG; Oxo-M $F/F_0 = 1,82 \pm 0,08$). Zum Ende der Applikation hin nähern sich die Werte der gemittelten Amplituden dagegen an. Die Zeit bis 90 % der Regeneration (t_{10}) beträgt bei Oxo-M $243,2 \pm 43,92$ s und bei DHPG $167,8 \pm 41,54$ s. Die Regeneration nach DHPG und Oxo-M ist in einigen Fällen ebenso wie der Anstieg der gemittelten Daten der DHPG-induzierten PIP₂-Depletion besser mit einer biexponentiellen Funktion zu beschreiben.

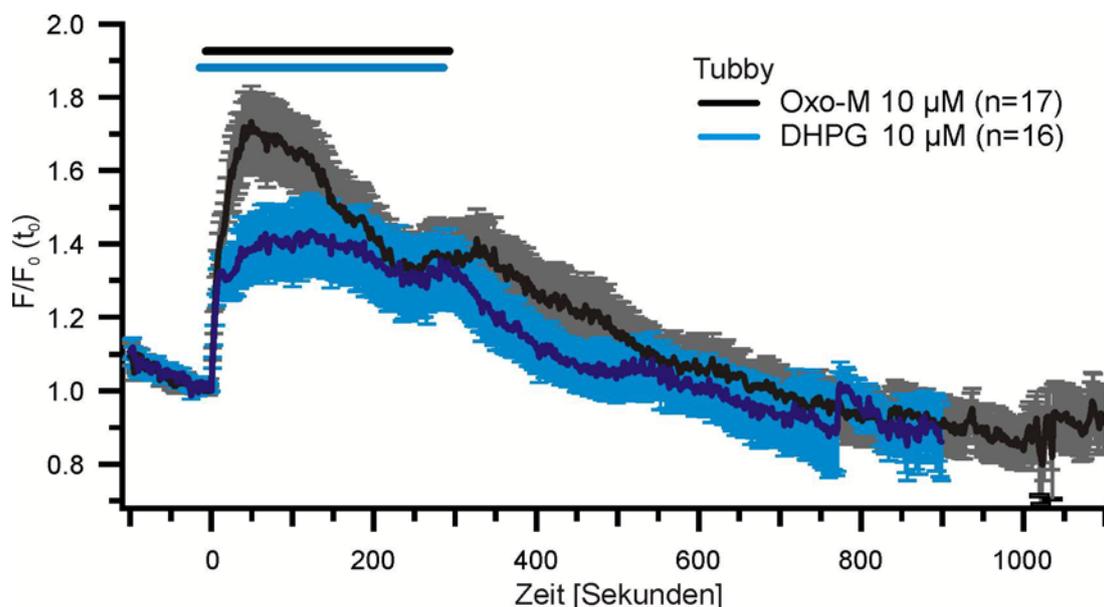


Abb. 3.16: mAChR- und mGluRI-induzierte Dynamik bei 5-minütiger Applikation der Agonisten. Angegeben ist die relative Fluoreszenz $F/F_0 \pm$ Standardfehler. Der Balken für die Applikation berücksichtigt die mittlere Latenz der Antworten.

Die Betrachtung der individuellen Kurven ergibt, dass die PIP₂-Dynamik in einzelnen Zellen stark vom durchschnittlichen Verhalten abweicht. In Abb. 3.17 sind die einzelnen Messungen ihrem Verlauf nach in vier Gruppen eingeordnet. Nach dieser Einteilung folgen nur jeweils drei Neurone tatsächlich dem durchschnittlichen phasisch-tonischen Verlauf. Bei beiden Agonisten sind zudem über die Messdauer rein tonische und transiente Zeitverläufe zu beobachten. Interessant ist das Auftreten von Oszillationen bei beiden Rezeptortypen, welches sich in den kürzeren Applikationen angedeutet hatte. Die DHPG-induzierten Oszillationen lassen hier ebenfalls keine zuverlässige Anpassung einer Kurvenfunktion zu.

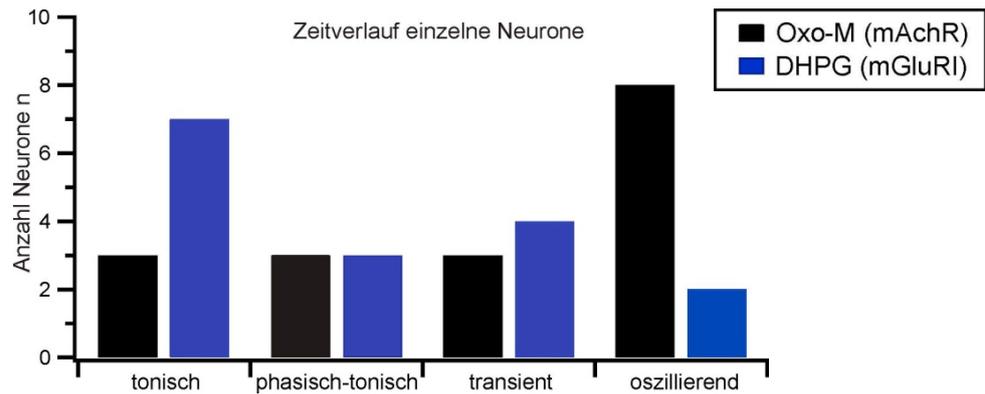


Abb. 3.17: Zusammensetzung der Zeitverläufe der mAChR- und mGluRI-induzierten PIP₂-Dynamik.

Die Abb. 3.18 A und B zeigen jeweils ein Beispiel für eine DHPG- und Oxo-M-induzierte oszillierende PIP₂-Dynamik. Die zeitliche Skalierung ist in beiden Graphen einheitlich. Die Abb. C und D zeigen *Linestack*-Rekonstruktionen der Messungen, die den Verlauf der spezifischen Sondentranslokation verdeutlichen. In Abb. 3.18 A handelt es sich um das Neuron 2 aus Abb. 3.13, das bei der ersten 47s-Applikation den Ansatz zu einem zweiten *Peak* gezeigt hatte. Hier zeigt es in 222s Applikation eine oszillierende PIP₂-Dynamik mit vier Maxima. In Abb. 3.18 C sind die Zeitpunkte der Sondentranslokation durch Pfeile hervorgehoben. Die *Peaks* der zu Grunde liegenden PIP₂-Depletion sind durch Erhöhungen der Fluoreszenzintensität bzw. Aufhellungen im zytoplasmatischen Bereich (Mitte) zu erkennen. Zur besseren Darstellung wurde der Kontrast der Abbildung nachträglich zu Gunsten des zytoplasmatischen Signals erhöht, weshalb die Membran überbelichtet erscheint (vgl. Legende). Das Neuron zeigte auch in einer dritten Applikation eine oszillierende Antwort, die spezifisch für DHPG war. In verlängerten Oxo-M-Applikationen zeigte es jeweils einen schnellen initialen Anstieg und eine bis zur finalen Amplitude langsamere konstante Zunahme (nicht gezeigt). Aufgrund der bereits 2. Applikation sowie der kürzeren Messdauer wurde die Zelle aus 3.18 A nicht in den Datensatz von Abb. 3.16 eingerechnet, wohl aber für die Auswertung der Frequenzen (s.u.) mit einbezogen.

Auch die Oszillation der PIP₂-Level des Neurons in Abb. 3.18 B war Rezeptorspezifisch. Die DHPG-Antwort der Zelle ist dem Verlauf der gemittelten Ergebnisse mit diesem Agonisten sehr ähnlich (vgl. Abb. 3.16). Unter Oxo-M-Wirkung erreicht die PIP₂-Depletion trotz der ausgeprägten Dynamik eine vergleichsweise hohe Amplitude vom 2,4-fachen der Ausgangsfluoreszenz. Bemerkenswert ist auch die rapide und vollständige Abnahme der Fluoreszenz nach dem ersten *Peak* (31,4 s bis 10% des Maximums vom letzten Plateauwert aus), die nur wenig langsamer verläuft als der Anstieg (26,6 s bis 90% der maximalen Amplitude). Etwa eine Minute nach der vorläufigen Regeneration erfolgt ein erneuter deutlicher Abfall der PIP₂-Level (bzw. Fluoreszenzanstieg im Zytoplasma), der diesmal bis

zum Ende der Oxo-M-Applikation anhält. Aufgrund der relativ hohen Amplitude der PIP₂-Dynamik ist die Sondentranslokation in der *Linestack*-Rekonstruktion nicht nur im Zytoplasma, sondern auch an der Membran sehr gut nachzuvollziehen (Abb. 3.18 D). Auch in dieser Abbildung sind die Zeitpunkte der Sondentranslokationen in das Zytoplasma mit Pfeilen hervorgehoben. Deutlich erkennbar ist die jeweils simultan verlaufende Abnahme der Fluoreszenz an der Membran und die transiente Regeneration der Signale in beiden untersuchten Bereichen während anhaltender Oxo-M Applikation. Nach Auswaschen des Agonisten kommt es zu einer im Vergleich zur ersten deutlich langsamer verlaufenden Regeneration der PIP₂-Level, in deren Folge die fluoreszierenden Sonden wieder zur Membran rekrutiert werden (grüner Pfeil).

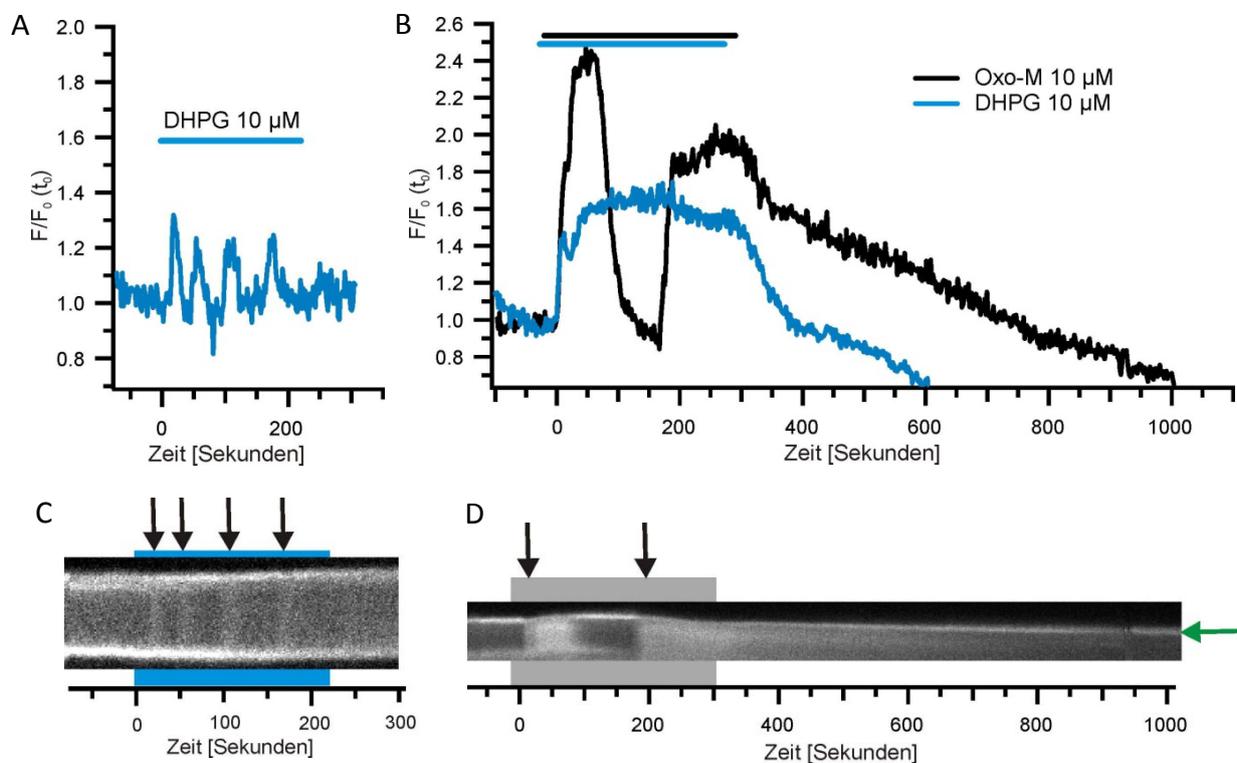


Abb. 3.18: Oszillationen der PIP₂-Level nach mGluRI- und mAChR-Aktivierung. **A)** Beispiel für eine Oszillation des zytoplasmatischen Fluoreszenzsignals bei mGluRI-Aktivierung. **B)** Oszillation bei mAChR-Aktivierung. Dieselbe Zelle zeigt mit dem mGluRI-Agonisten DHPG keine Oszillation. **C)** und **D)** *Linestack*-Rekonstruktionen des Fluoreszenzverlaufs, **C)** DHPG, **D)** Oxo-M (erstellt aus je über 20 Pixeln gemittelten Linienprofilen der Einzelbilder, Kontrastverstärkung 5% in **C** und 0,4% in **D**). Schwarze Pfeile deuten die Translokation in das Zytosol an; grüner Pfeil in **D** -> Membran).

Das Neuron aus Abb. 3.18 B und D hielt auch in einer zweiten (achtminütigen) Applikation eine oszillierende PIP₂-Dynamik mit Oxo-M und eine konstant verlaufende Antwort auf DHPG bei (Neuron 3/lila in Abb. 3.19). Eine Konstanz der Verlaufscharakteristik über wiederholte Applikationen war allerdings nicht in allen Neuronen gegeben. Die Abbildungen 3.19 A (Oxo-M) und B (DHPG) zeigen außerdem zwei weitere, simultan im gleichen Hirnschnitt gemessene Neurone. Der Zeitpunkt 0 gibt hier den Start der jeweiligen

Applikation an. Ein Vergleich der Neurone zeigt, dass der Verlauf der PIP₂-Dynamik nicht nur receptorspezifisch ist, sondern auch zwischen benachbarten Neuronen individuelle Unterschiede aufweist. Auffallend in B ist die im Vergleich sehr hohe Amplitude der DHPG-induzierten Antwort von Neuron 3, wohingegen Neuron 1 und 2 in derselben Messung eher für diesen Agonisten typische Amplituden aufweisen. Während die Amplitude von Neuron 3 in der ersten Applikation mit einem Wert von 1,65 noch im oberen Rahmen der mittleren DHPG Antworten liegt, erreicht es in der 2. Applikation mit einer Steigerung der Fluoreszenz um das 2,5-fache die Dimension der höchsten Oxo-M Amplituden. Dies zeigt, dass die Aktivierung von mGluRI durchaus eine mit mACh-Rezeptoren vergleichbare PIP₂-Depletion bewirken kann.

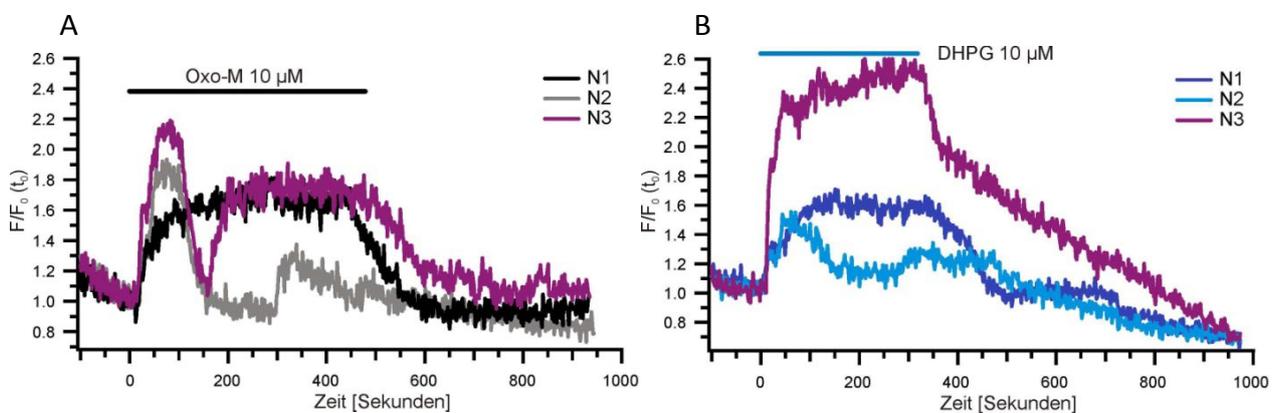


Abb. 3.19: Oxo-M- (A) und DHPG- (B) Antworten dreier simultan gemessener Neurone.

Abb. 3.20 gibt einen Überblick über die Amplituden und Frequenzen der Zellen mit einer oszillierenden PIP₂-Dynamik (mindestens zwei *Peaks*). Die Grafiken berücksichtigen die Daten der ersten fünfminütigen Applikation sowie zusätzlich die DHPG-Messung aus Abb. 3.18 A. Jedem Neuron ist eine eigene Farbe und Nummer zugeteilt. Daraus ist zu erkennen, dass in der ersten Applikation nur Neuron 3 mit beiden Agonisten eine oszillierende PIP₂-Dynamik zeigt. (Nicht zu verwechseln mit dem 3. Neuron aus den Abb. 3.19, dies ist in 3.20 Neuron 4). Alle übrigen 9 Neurone zeigen über den Zeitraum von fünf Minuten entweder eine PIP₂-Oszillation nach mAChR- oder mGluRI-Aktivierung. Während in der Gruppe der durch DHPG induzierten PIP₂-Oszillationen mindestens vier *Peaks* erreicht werden, sind unter Oxo-M-Wirkung am häufigsten zwei *Peaks* zu beobachten (6 von 8). Dies gilt auch für Neuron 4. Wie bereits für Neuron 4 gezeigt (s.o.), so erreicht auch Neuron 2 in den Intervallen annähernd Werte der Ausgangsfluoreszenz F₀ (nicht gezeigt). Bei Neuron 1 sind die Oszillationen auf eine durchgehend erniedrigte PIP₂-Konzentration aufgelagert. Unter DHPG-Wirkung erreichen die PIP₂-Level während der Intervalle zumeist etwa Ausgangswerte, ebenso bei der Mehrzahl der Oxo-M-Oszillationen mit 2 Peaks. Insgesamt

lässt sich bei den mGluRI-vermittelten PIP_2 -Oszillationen ein Trend zu kleineren und höherfrequenten *Peaks* erkennen, während die mAChR-vermittelte Dynamik eher zu größeren Amplituden mit vergleichsweise niedrigeren Frequenzen neigt.

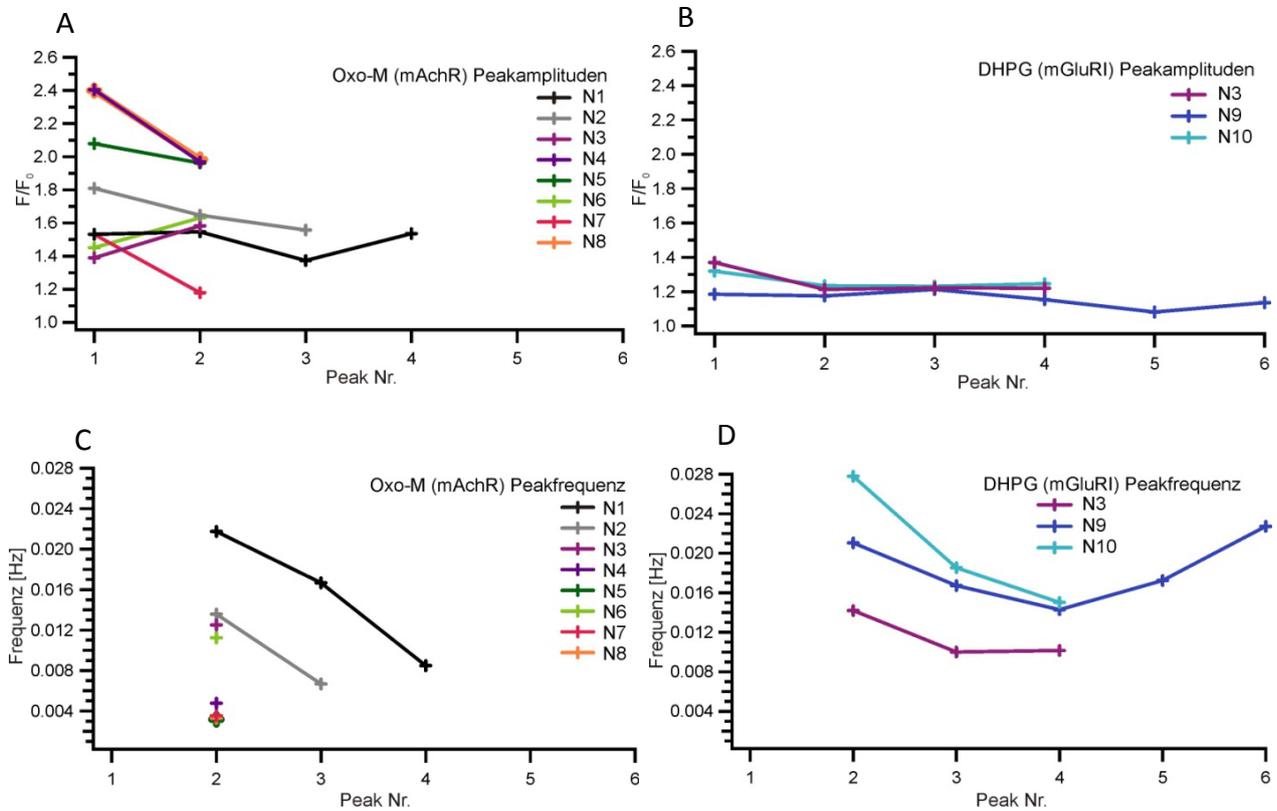


Abb. 3.20: Übersicht der Amplituden und Frequenzen $G\alpha_q$ -rezeptorinduzierter PIP_2 -Oszillationen (1. Applikation). **A)** Oxo-M und **B)** DHPG: Amplituden der aufeinanderfolgenden Maxima (engl. *Peaks*) einzelner Neurone (N) bezogen auf die Ausgangsfluoreszenz F_0 . **C)** Oxo-M und **D)** DHPG: Frequenzen der PIP_2 -Oszillationen in Hz. (Oxo-M, 8 von 17 oszillieren; DHPG, 2 von 16 oszillieren, + 1 N s. Text, identische Neurone sind mit gleicher Zahl und Farbe markiert).

3.2.6 Amplituden der apparenten PIP_2 -Depletion mit 100 μ M DHPG

Sowohl der mAChR-Agonist Oxo-M als auch der mGluRI-Agonist DHPG wurde primär in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt. Die Auswahl der Konzentration basierte auf der Annahme, dass beide Agonisten mit einer Affinität von etwa 5 μ M an ihre Rezeptoren binden (vgl. Einleitung und Diskussion). Um abzuschätzen, ob die in Relation zu den Oxo-M-Experimenten geringeren Amplituden der DHPG-induzierten PIP_2 -Depletion durch Unterschiede in der Rezeptoraktivierung der Agonisten beruhen, wurden in den verlängerten Applikationen zusätzlich auch Messungen mit 100 μ M DHPG durchgeführt.

Bei allen getesteten Neuronen war die Amplitude mit 100 μ M DHPG kleiner als in den Oxo-M-Messungen. Die mittlere Amplitude der zytoplasmatischen Fluoreszenz von sechs Zellen

erreichte mit Oxo-M das 1,76-fache ($\pm 0,09$) und mit 100 μM DHPG das 1,36-fache ($\pm 0,13$) der Ausgangsfluoreszenz.

Bei der Auswertung der Daten ist allerdings zu beachten, dass die Messungen mit der erhöhten DHPG-Konzentration immer nach einer Messung mit jeweils 10 μM DHPG und Oxo-M durchgeführt wurden. Die Messung mit 100 μM DHPG entsprach also bereits der zweiten Aktivierung von mGluRI in den Hirnschnitten. Dabei wurde nach beiden vorangegangenen Applikationen jeweils die vollständige Regeneration der Zellen abgewartet und ein Abstand von mindestens 10 Minuten zu der vorausgegangenen Applikation gewahrt. In der ersten Applikation mit 10 μM DHPG erreichten die sechs Zellen eine Amplitude von $1,43 \pm 0,07$. Zur besseren Einordnung der Ergebnisse sind die Amplituden der mGluRI-induzierten PIP_2 -Depletion aus erster (10 μM DHPG) und zweiter (100 μM DHPG) Applikation in Abb. 3.21 den Ergebnissen von Zellen gegenübergestellt, auf die zweimal 10 μM DHPG appliziert wurde. Die Amplituden der 100 μM -Messungen fallen insgesamt nicht höher aus als die mit 10 μM . Ebenso wie in der Gruppe der mit 100 μM gemessenen Zellen kam es auch bei den Experimenten mit 30s Applikation von 10 μM DHPG zu einer nicht signifikanten Abnahme der mittleren Amplitude (vgl. Abschnitt 3.2.3, $n = 11$). Die drei Zellen mit einer Applikation von zweimal fünf Minuten 10 μM DHPG zeigen im Mittel eine (nicht signifikante) Zunahme der Amplituden der 2. Applikation ($1,78 \pm 0,32$) im Vergleich zur 1. ($1,66 \pm 0,12$). Der Anstieg wird hier allerdings durch die bereits in Abschnitt 3.2.5 beschriebene Zelle mit einer außerordentlich hohen Amplitude verursacht. Die anderen zwei Zellen dieser Gruppe zeigen eine Abnahme der PIP_2 -Depletion in der zweiten Messung.

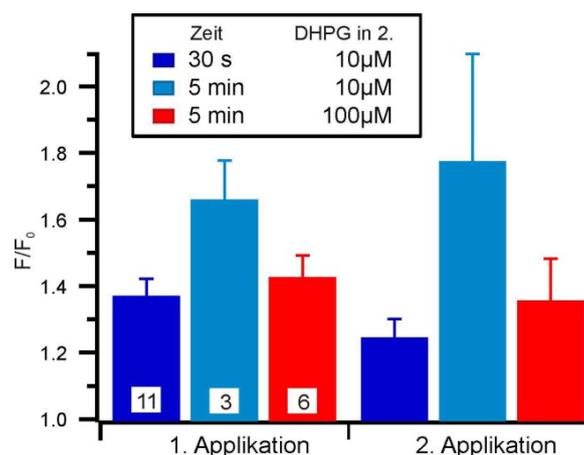


Abb. 3.21: Amplituden der PIP_2 -Dynamik mit erhöhter Konzentration des mGluRI-Agonisten DHPG (100 μM). Auch mit der 10-fach erhöhten Konzentration des Agonisten DHPG zeigten die Pyramidenneurone eine deutlich kleinere Depletion der PIP_2 -Level als mit dem mAChR-Agonisten Oxo-M. Gegenüberstellung der 1. Applikationen mit DHPG (alle 10 μM) mit den Amplituden der 2. Applikation (Konzentrationen siehe Legende; $F/F_0 \pm$ Standardfehler, n : siehe Balkenboden).

3.2.7 Zusammenfassung der mAChR- und mGluRI-induzierten PIP₂-Depletion

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Aktivierung von mACh- als auch von mGluRI-Rezeptoren zu einer PIP₂-Depletion in der Plasmamembran von CA1-Pyramidenneuronen in akuten Hirnschnitten führt. Der durch den mAChR-Agonisten Oxo-M induzierte Abbau des PIP₂ erreicht in der Regel ein stärkeres Ausmaß im Vergleich zum mGluRI-Agonisten DHPG. Die PIP₂-Reduktion zeigte im Mittel bei beiden Rezeptortypen einen unterschiedlich stark ausgeprägten phasisch-tonischen Zeitverlauf, entsprechend einer Desensibilisierung. Bei genauerer Betrachtung zeigen die Ergebnisse beider Rezeptortypen, dass der Verlauf der Dynamik über ein simples an-aus-Verhalten hinausgeht. So traten über den Messzeitraum neben Zellen mit einem durchschnittlichen phasisch-tonischen Verlauf auch solche mit rein tonischen und transienten Antworten sowie ausgeprägten PIP₂-Oszillationen auf.

Ein Vergleich der gemittelten Daten der 30 s und 5 min Applikationen zeigt eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse (Abb. 2.22 A: mAChR; B: mGluRI). Gemessen an den Amplituden der längeren Applikation erreichte die PIP₂-Depletion (im Soma) nach 30 s nicht immer ihr Maximum (signifikant ist der Unterschied nur bei DHPG mit $p < 0,05$; die höchste Oxo-M Amplitude von 2,62 trat bei den 30 s Messungen auf). Die 30 s-Daten erlauben aber dennoch eine Beurteilung des relativen PIP₂-Abbaus über die Rezeptortypen. Dementsprechend ergeben sich in beiden Datensätzen jeweils signifikante Unterschiede der Amplituden von mAChR- und mGluRI-induzierter PIP₂-Depletion (vgl. Abb. 3.23 A; 30 s: $p < 0,001$, 5 min: $p < 0,01$). Auch in den Dendriten fallen die Antworten der DHPG-Messungen deutlich kleiner aus als bei Oxo-M.

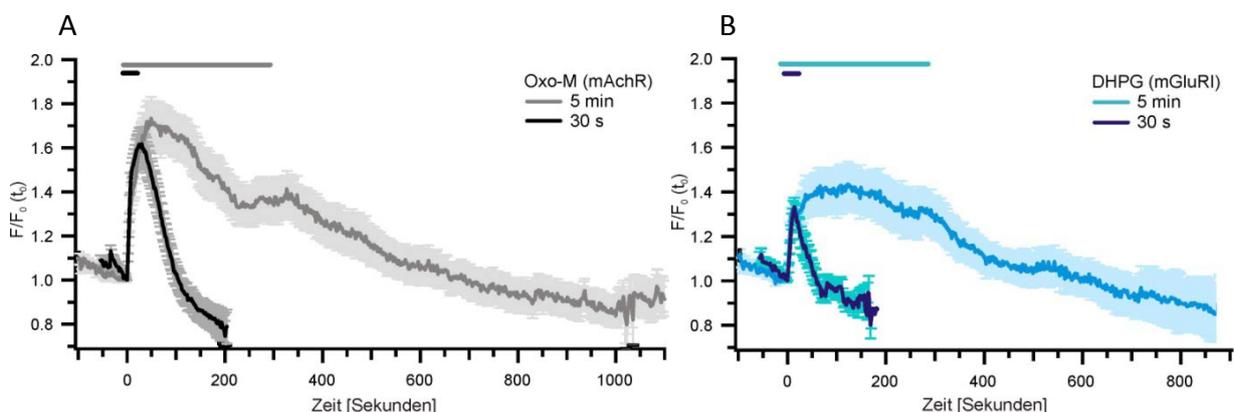


Abb. 3.22: Vergleich der gemittelten Kurven von 30 s und 5 min Applikationen. A) mAChR (30 s: $n = 28$, 5 min: $n = 17$) **B)** mGluRI (30 s: $n = 15$; 5 min: $n = 16$). Relative Fluoreszenz $F/F_0 \pm$ Standardfehler.

Die Kinetik der PIP₂-Depletion ist bei den Rezeptoren insbesondere am Anfang recht ähnlich und ergibt keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 3.22 und 3.23 B). Die Tendenz zu einer im Verlauf etwas stärkeren Abflachung bei mGluRI-Aktivierung ergibt bei den fünfminütigen

Agonistenapplikationen etwas niedrigere t_{90} -Werte bei Oxo-M. Dieser Trend verdeutlicht sich, wenn man statt der maximalen Amplitude den in einigen Fällen kleiner ausfallenden ersten *Peak* der Dynamik zur Auswertung heranzieht.

Die Regeneration dauert bei den 5 min Applikationen bei beiden Rezeptortypen deutlich länger als beim Datensatz der 30 s Applikationen (Abb. 3.22 und 3.23 C). Folglich hängt die Regeneration auch von der Dauer der Rezeptoraktivierung bzw. der PIP₂-Depletion ab.

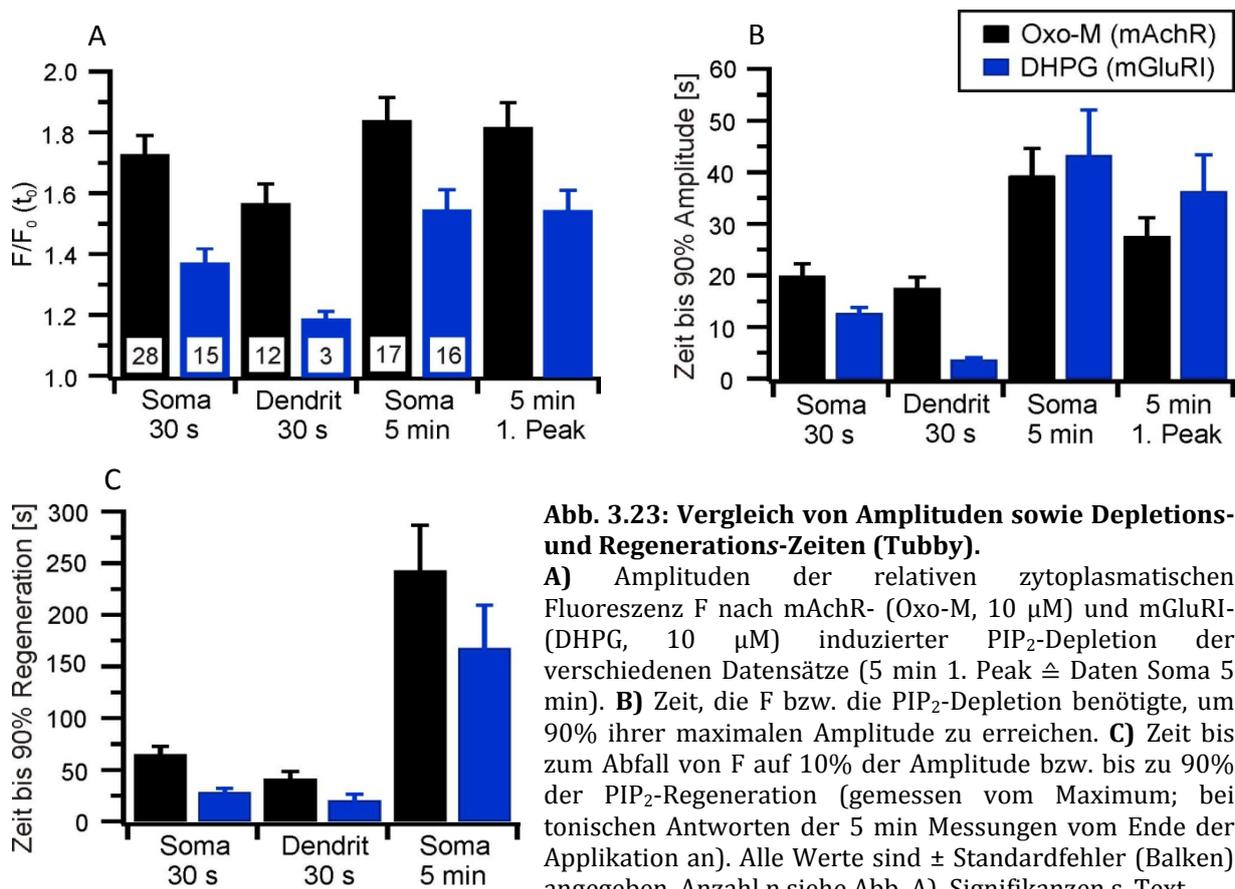


Abb. 3.23: Vergleich von Amplituden sowie Depletions- und Regenerations-Zeiten (Tubby).

A) Amplituden der relativen zytoplasmatischen Fluoreszenz F nach mAChR- (Oxo-M, 10 μ M) und mGluRI- (DHPG, 10 μ M) induzierter PIP₂-Depletion der verschiedenen Datensätze (5 min 1. Peak \triangleq Daten Soma 5 min). **B)** Zeit, die F bzw. die PIP₂-Depletion benötigte, um 90% ihrer maximalen Amplitude zu erreichen. **C)** Zeit bis zum Abfall von F auf 10% der Amplitude bzw. bis zu 90% der PIP₂-Regeneration (gemessen vom Maximum; bei tonischen Antworten der 5 min Messungen vom Ende der Applikation an). Alle Werte sind \pm Standardfehler (Balken) angegeben. Anzahl n siehe Abb. A), Signifikanzen s. Text.

3.2.8 Die Applikation weiterer $G\alpha_q$ -Rezeptoragonisten induziert keine messbare Sondentranslokation

Die Applikation von Agonisten der $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptoren α_{1A} -Adrenorezeptor (Methoxamin, 10-20 μ M, $n = 15$), Bradykinin (Bradykinin, 10-20 μ M, $n = 12$), Dopamin_{D1-like} (SKF 83959, 10-20 μ M, $n = 6$), Histamin-H₁ (2-Pyridylethylamin, 10-50 μ M, $n = 11$), P2Y₁ (ADP β S, 10-20 μ M, $n = 15$) und 5-HT_{2A/2C} (DOI, 10-20 μ M, $n = 15$) induzierte keine messbare Sondentranslokation bzw. PIP₂-Depletion in den CA1-Pyramidenneuronen (Abb. 3.24 A). Die Daten umfassen Messungen am Soma und in den Dendriten, mit einer Entfernung von - 50 μ m (basal) und + 300 μ m (apikal). Die maximale Entfernung betrug bei allen Agonisten +

300 μm vom Soma. Alle Neurone, die in die Auswertung einbezogen wurden, zeigten nachfolgend eine Antwort auf Oxo-M (und DHPG; positiv Kontrolle). Die Applikation erfolgte in alternierender Reihenfolge mit einem Intervall von mindestens einer Minute. Die Applikationsdauer betrug in der Regel 30 s. In einigen Fällen wurden die Agonisten 60 bis 120 s auf den Zellen belassen, dies resultierte aber in keinem abweichenden Ergebnis.

Im Rahmen der Experimente mit verlängerten Applikationen wurden zusätzlich 7 Zellen auf eine Reaktion auf die Transmitter Dopamin und Serotonin getestet (je 100 μM). Auch in diesen Zellen war keine durch die betreffenden Rezeptoren induzierte PIP_2 -Depletion nachzuweisen. Am Soma betrug die Applikationsdauer hier ebenfalls fünf Minuten, am Dendriten 1 $\frac{1}{2}$ bis 2 Minuten. Dabei konnte auch ein Dendrit in einer Entfernung von etwa 300 – 350 μm vom Soma und einem Durchmesser von nur ca. 1 μm gemessen werden. Die Abbildungen 3.24 B (ROI Auswertung) und C (*Linestack*) zeigen, dass eine Reaktion des Dendriten auf Oxo-M eindeutig erfolgt, während bei Dopamin (und Serotonin) keine Antwort zu erkennen ist.

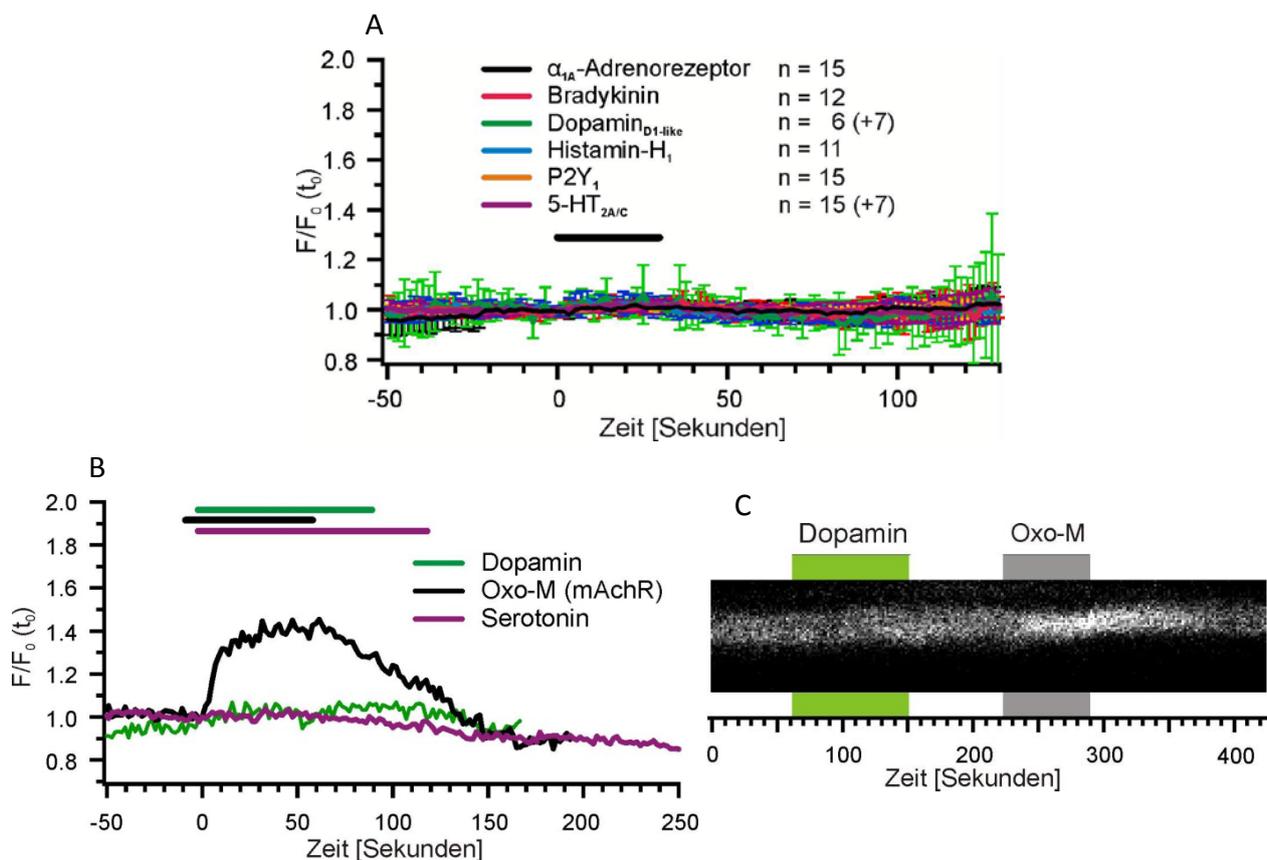


Abb. 3.24: Hippocampale $\text{G}\alpha_q$ -Rezeptoren ohne messbare PIP_2 -Depletion. **A)** Die Applikation spezifischer Agonisten von α_{1A} -Adrenorezeptor (Agonist: Methoxamin), Bradykinin (Bradykinin), Dopamin_{D1-like} (SKF 83959), Histamin-H₁ (2-Pyridylethylamin), P2Y₁ (ADP β S) und 5-HT_{2A/C} (DOI), induzierte keine nachweisbare PIP_2 -Depletion in den CA1-Pyramidenneuronen (Kurven *Bleaching* korrigiert). **B)** Applikation von Oxo-M, aber nicht Dopamin und Serotonin, induziert PIP_2 -Depletion in einem distalen apikalen Dendriten >300 μm vom Soma. **C)** *Linestack*-Rekonstruktion der Messung aus B) (Durchmesser des Dendriten ca. 1 μm ; erstellt aus je über 10 Pixeln summierten Linienprofilen der Einzelbilder, Kontrastverstärkung 1%).

3.3 Analyse der PH-Domänen-Translokation in CA1-Pyramidenneuronen nach pharmakologischer $G\alpha_q$ -Aktivierung und Vergleich zur Tubby-Domäne

Wie in Abschnitt 2.6.2 ausgeführt, ist die Kausalität der PH-Domänen-Translokation bei Prozessen mit IP_3 -Bildung aufgrund der im Verhältnis zu PIP_2 höheren Affinität in der Literatur umstritten. Dennoch wurde und wird die PH-Domäne auch unter diesen Bedingungen häufig als PIP_2 -Sensor eingesetzt. Aus diesem Grunde habe ich in meiner Arbeit neben der Tubby-Domäne auch die PH-Domäne für Messungen der CA1-Pyramidenneurone *in situ* eingesetzt. Ziel war es zum Einen, einen besseren Vergleich der Daten mit der vorliegenden Literatur aus *in vitro* Messungen zu ermöglichen (einschließlich der Daten von dissoziierten Neuronen). Zum anderen war interessant, ob *per se* Unterschiede der Translokation zwischen den beiden Sonden bei *in situ* Messungen der Pyramidenneurone festzustellen sind. Aufgrund der dargestellten Problematik beschränke ich mich zunächst nur auf die Beschreibung der PH-Domänen Translokation, ohne sie als PIP_2 -Depletion zu behandeln.

3.3.1 Translokation nach mAChR- und mGluRI-Aktivierung: Soma

Die Aktivierung von mAChR und mGluRI führte auch bei der PH-Domäne zu einer robusten Translokation. Abb. 3.25 zeigt den mittleren Verlauf der Translokation der PH-Domäne nach 30 s und 5 min Applikation der mAChR- und mGluRI-Agonisten. Die Ergebnisse sind für die beiden Rezeptoren jeweils weitgehend ähnlich. Die Antworten auf eine 5-minütige Applikation des mAChR-Agonisten Oxo-M weisen allerdings eine leicht größere Latenzzeit, niedrigere Amplitude und eine größere Zeitkonstante auf als die des 30 s Datensatzes (jeweils aus separaten Experimenten/Neuronen; s. Abb. 3.25 A). Die mittleren Kurven der DHPG-Messungen weisen im Überschneidungsbereich eine sehr gute Übereinstimmung der Anfangskinetik auf (Abb. 3.25 B). Die längere Aktivierung der mGluI-Rezeptoren durch die 5-minütige Applikation des Agonisten führt zu einer höheren maximalen Sondentranslokation. Die Regeneration ist bei den längeren Applikationen bei beiden Rezeptoren verlangsamt. Die Infektion der Neurone mit den PH-Domänenkonstrukten hatte im Allgemeinen verglichen zu den Messungen mit der Tubby-Domäne eine relativ hohe Expression zur Folge. Die Laserleistung konnte bzw. musste daher leicht verringert werden. Als Konsequenz fiel das Bleichen in diesen Messungen etwas geringer aus.

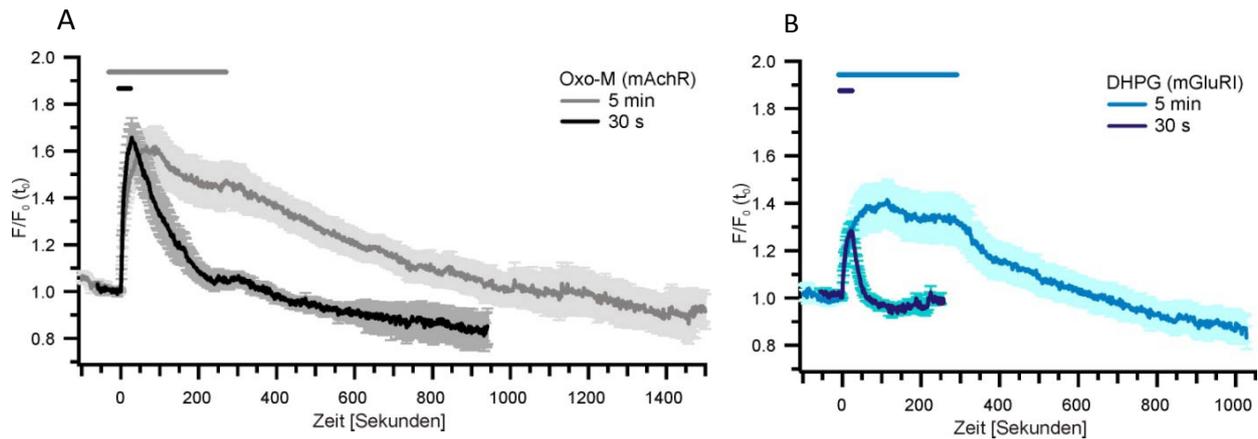


Abb. 3.25: Vergleich der gemittelten Kurven von 30 s und 5 min Applikationen (PH-Domäne). A) mAChR (30 s: n = 16; 5 min: n = 18) B) mGluRI (30 s: n = 15; 5 min: n = 18). Relative Fluoreszenz $F/F_0 \pm$ Standardfehler. Die Applikationsbalken geben die mittlere Latenzzeit an.

In Übereinstimmung mit den Tubby-Daten zeigt die gemittelte Translokation der PH-Domäne nach ca. 5-minütiger Aktivierung beider Rezeptoren einen phasisch-tonischen Verlauf, bei dem die Desensibilisierung für die Antworten über mAChR stärker ausgeprägt ist (vgl. Abb. 3.25). Bei der PH-Domäne kommt es im Verlauf der Dynamik zu keiner Überschneidung der Kurven (von mAChR und mGluRI) vor der Regeneration, die Amplituden nähern sich also im Vergleich zu den Tubby-Daten weniger stark an.

Die Latenz der mAChR-induzierten Reaktionen betrug $4,93 \pm 1,18$ s (30 s Oxo-M, n = 16) und $40,75 \pm 15,38$ s (5 min Oxo-M, n = 19), die von mGluRI $6,10 \pm 1,05$ s (30 s DHPG, n = 15) und $9,04 \pm 3,56$ s (5 min DHPG, n = 18). Die starken Unterschiede in den Werten sind vor allem in den heterogenen Reaktionszeiten der Neurone begründet. Dass dies kein Problem des Applikationssystems war, belegen Messungen von Neuronen im selben Hirnschnitt. So reagierten bei vier simultan gemessenen Neuronen zwei knapp 2 s nach Start der Oxo-M-Applikation, während die anderen Neurone erst nach 16 und 58 s antworteten. In den DHPG-Applikationen zeigten dieselben Neurone eine vergleichbare Reaktionszeit von ca. 3,5 (2 Neurone), 7 und 58 s Latenz. Da die anderen Parameter der Neurone mit längeren Latenzzeiten ansonsten unauffällig waren, wurden sie in die Statistik mit eingeschlossen. Nur für die Berechnung der mittleren Antwort auf 5 min Oxo-M in Abb. 3.25 wurde ein Neuron mit einer Latenzzeit von 225 s ausgeschlossen, da aufgrund der späten Reaktion des Neurons der weitere Verlauf der PIP_2 -Depletion nicht zu beurteilen war.

Auch für die Daten der PH-Domäne wurden die Dauer bis zu 90% (t_{90} , Anstieg) und 10% (t_{10} , bzw. 90 % Regeneration) der Amplitude bestimmt. Die Ergebnisse der Auswertung des Fluoreszenzanstiegs (hellgrau bzw. -blau) sind in Abb. 3.26 A den Tubby-Daten (schwarz und dunkelblau) gegenübergestellt. Die Kinetik der Translokation (Anstieg) zeigt weder in den 30 s Applikationen (PH-Domäne mAChR- $t_{90} = 22,26 \pm 1,92$ s; mGluRI $17,27 \pm 1,71$ s)

noch im Datensatz der 5-minütigen Applikation (PH-Domäne mAch- t_{90} = $43,88 \pm 5,36$ s; mGluRI $58,09 \pm 12,76$ s) signifikante Unterschiede zu den Tubby-Daten. Allerdings erreicht die Translokation bei Tubby im Mittel stets schneller ihr Maximum.

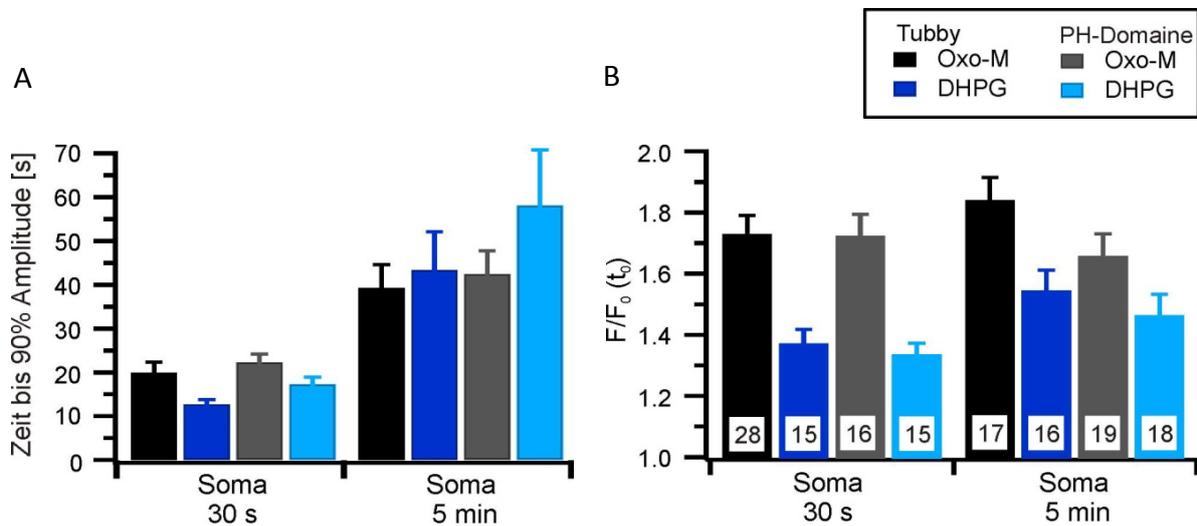


Abb. 3.26: Vergleich von Kinetik und Amplitude der Translokation von Tubby- und PH-Domäne.

A) Zeit bis zum Anstieg der relativen zytoplasmatischen Fluoreszenz F auf 90% ihrer maximalen Amplitude bei 30 s und 5 min Applikationen der Agonisten für mAChR (Oxo-M, 10 μ M) und mGluRI (DHPG, 10 μ M) **B)** Maximale Amplituden von F . Alle Werte sind \pm Standardfehler (Balken) angegeben. Anzahl n siehe Abb. B, Signifikanzen s. Text.

Die Amplituden der PH-Domänenendaten stimmen insgesamt gut mit den Werten aus den Tubby-Messungen überein (Abb. 3.26 B). In den 30 s Applikationen der Agonisten ergeben sich hochsignifikante Unterschiede für die Amplituden der mGluI- und mACh-Rezeptoren ($p < 0,001$, ungepaarter t-Test; mGluRI $F/F_0 = 1,34 \pm 0,04$ und mAChR $F/F_0 = 1,72 \pm 0,07$). Wie in den Messungen mit der Tubby-Domäne steigt die Fluoreszenz nach verlängerter DHPG-Applikation stärker an ($F/F_0 = 1,46 \pm 0,07$) als in den kurzen Applikationen. Da die Maxima nach verlängerter Oxo-M-Applikation niedrigere Werte erreichen ($F/F_0 = 1,66 \pm 0,07$) als bei den kurzen Applikationen, ergeben sich in den 5 min Applikationen etwas geringere Unterschiede in den Amplituden. Ein Vergleich von Neuronen mit beiden Applikationen zeigt aber auch hier signifikante Unterschiede zwischen den beiden Rezeptoren (gepaarter t-Test, $n = 18$, $p < 0,05$).

Auch mit der PH-Domäne wurden Messungen mit 100 μ M DHPG durchgeführt, um den Einfluss der Agonistenkonzentration auf die relativen Amplituden der rezeptorinduzierten Dynamik zu prüfen. Neun Zellen erreichten in der ersten Applikation mit 10 μ M DHPG eine durchschnittliche Amplitude von $1,58 \pm 0,12$ und in der zweiten Applikation mit 100 μ M eine Amplitude von $1,44 \pm 0,06$ (je 5 Minuten Applikation). Dieselben Zellen erreichten nach Oxo-M Applikation eine Amplitude von $1,81 \pm 0,11$. Bei vier Neuronen trat in der zweiten DHPG-Applikation eine Steigerung gegenüber der ersten Messung ein, bei fünf Zellen nahm

die Amplitude ab. Diesen Ergebnissen zufolge sind die unterschiedlichen mittleren Amplituden der Daten beider Rezeptortypen nicht auf eine unterschiedliche Aktivierung durch eine unverhältnismäßige Konzentration der Agonisten zurückzuführen.

Die Kinetik der Regeneration kann bei der PH-Domäne prinzipiell sowohl von der Regeneration des zuvor (mutmaßlich) verringerten PIP_2 -Levels in der Membran als auch vom IP_3 -Abbau abhängen. Während die mit der Tubby-Domäne gemessenen Neurone im Soma nach 30 s Oxo-M durchschnittlich $65,08 \pm 7,56$ s für eine Regeneration auf 10 % der maximalen Amplitude benötigten, erfolgte die Regeneration gemessen mit der PH-Domäne erst nach $132,74 \pm 20,77$ s und damit signifikant langsamer ($p < 0,01$, vgl. Abb. 3.27). Bei den 5 min Applikationen ist diese Tendenz ebenfalls vorhanden, aber aufgrund der insgesamt größeren Streuung der Daten nicht signifikant (Tubby $243,20$ s \pm 43,92; PH-Domäne $281,22$ s \pm 45,70). Der Verlauf der mGluRI-Antworten zeigt dagegen eine Übereinstimmung zwischen PH-Domäne (5-min Wert $181,34$ s \pm 34,55) und Tubby ($167,8$ s \pm 41,54). Im Gegensatz zu den Tubby-Messungen trat während 30 s DHPG bei keinem der Neurone eine eindeutig transiente Reaktion auf. Allerdings gab es auch bei der PH-Domäne Neurone mit sehr steilen Amplituden, deren Anstiegs-Zeitkonstanten nur unzuverlässig bestimmt werden können (3 von 15).

Bei der Anpassung monoexponentieller Kurven zur Bestimmung der Regenerationszeitkonstanten fiel bei den Ergebnissen der 30 s Applikation von Oxo-M auf, dass vier (fünf) der Neurone einen biphasischen Verlauf der Regeneration aufweisen und dementsprechend besser mit einer biexponentiellen Funktion beschrieben werden können. Die Tendenz zu einem biphasischen Verlauf ist in geringerem Maße auch noch in der gemittelten Kurve zu erkennen, die ebenfalls besser mit einer biexponentiellen Funktion beschrieben werden kann. Ein solches Verhalten war mit Tubby nur bei den 5-Minuten-Messungen (mit komplexerer Dynamik) erkennbar. Außerdem verzögerte sich der Beginn der Regeneration um bis zu 60s nach Ende der Applikation, während der Abfall der Fluoreszenz in den Tubby-Messungen spätestens nach 20 s erkennbar einsetzte.

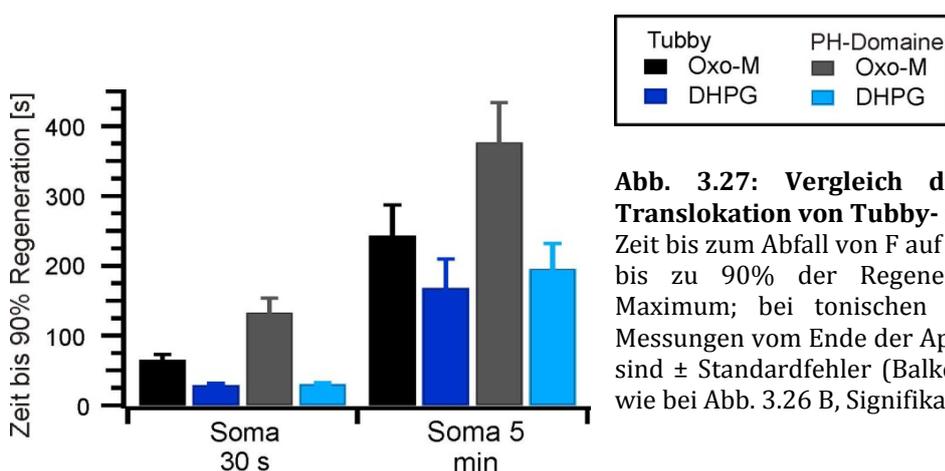


Abb. 3.27: Vergleich der Regeneration der Translokation von Tubby- und PH-Domäne.

Zeit bis zum Abfall von F auf 10% der Amplitude bzw. bis zu 90% der Regeneration (gemessen vom Maximum; bei tonischen Antworten der 5 min Messungen vom Ende der Applikation an). Alle Werte sind \pm Standardfehler (Balken) angegeben. Anzahl n wie bei Abb. 3.26 B, Signifikanzen s. Text.

3.3.2 Oszillationen der PH-Domänentranslokation

Wie bei den Tubby-Daten setzt sich der mittlere Verlauf der Dynamik auch bei den mit der PH-Domäne gemessenen Neuronen aus unterschiedlichen Verhaltensweisen zusammen. Die Einteilung der Neurone in die vier Gruppen tonisch, phasisch-tonisch, transient und oszillierend ergibt die in Abb. 3.28 A dargestellte Verteilung. Ein phasisch-tonisches Verhalten wurde während 5-minütiger Oxo-M-Applikation bei sechs und nach DHPG-Applikation bei drei Zellen beobachtet. Mit jeweils sieben bzw. acht Neuronen war ein tonischer Verlauf bei beiden Agonisten am häufigsten zu verfolgen. Ein oszillierendes Verhalten zeigten hier mit Oxo-M nur zwei Zellen, während dies bei DHPG in vier Fällen zu beobachten war. Auch in den kurzen Applikationen waren vereinzelt Oszillationen zu beobachten.

Die Abb. 3.28 B bis F zeigen jeweils Beispiele DHPG- und Oxo-M-induzierter Oszillationen. Die vier Neurone in C wurden simultan im selben Hirnschnitt gemessen. Der Zeitpunkt 0 gibt hier den Start der DHPG-Applikation an. Die Dynamik verläuft bei allen Neuronen unterschiedlich, wobei Neuron 1, 3 und 4 oszillieren und Neuron 2 ein tonisches Verhalten zeigt. In F ist die *Linestack*-Rekonstruktion von Neuron 1 abgebildet. Gut zu erkennen sind hier vor allem die beiden (bzw. drei) stärksten *Peaks* der Antwort, während die anfänglichen schnellen Spitzen weniger deutlich hervortreten. Neuron 4 zeigt ebenfalls eine Oszillation mit schnellen Spitzen und behält dieses Verhalten über die Dauer der Applikation bei. Abb. C zeigt eines der beiden separat gemessenen Neurone mit einer oszillierenden Oxo-M Antwort. Die *Linestack*-Rekonstruktion der Messung ist in E dargestellt. Der Abfall der zytoplasmatischen Fluoreszenz beginnt hier kurz vor Ende der Applikation und zeigt bis zur endgültigen Regeneration einen zweiphasigen Verlauf. Keines der beiden oszillierenden Neurone erreicht während der Applikation Werte der Ausgangsfluoreszenz F_0 . Das Neuron aus A wurde simultan mit einem zweiten Neuron gemessen, das ein phasisch-tonisches Verhalten zeigte (nicht abgebildet). Abb. D zeigt ein weiteres separat gemessenes Neuron mit noch deutlicher ausgeprägten Spitzen. Bei den entsprechenden Oxo-M-Messungen traten keine vergleichbaren Spitzen auf, d.h. ein solches Verhalten wurde in dieser Ausprägung nur mit DHPG (und der PH-Domäne) beobachtet. Abb. G zeigt ein Neuron aus dem Datensatz der kurzen DHPG-Applikationen, dass die maximale Amplitude bereits nach einem Messpunkt ($\tau < 0,12$) erreichte. Aufgrund des guten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses des Neurons und mit Hilfe eines kleineren Bildausschnitts konnte die *Sampling*-Rate von 1,76 auf 0,35 s heruntersgesetzt werden. Dies führte nicht zu einer wesentlich besseren Auflösung des Dynamikverlaufs am Anfang, zeigt aber sehr schön die auch im Verlauf auftretenden aufgesetzten schnellen Spitzen.

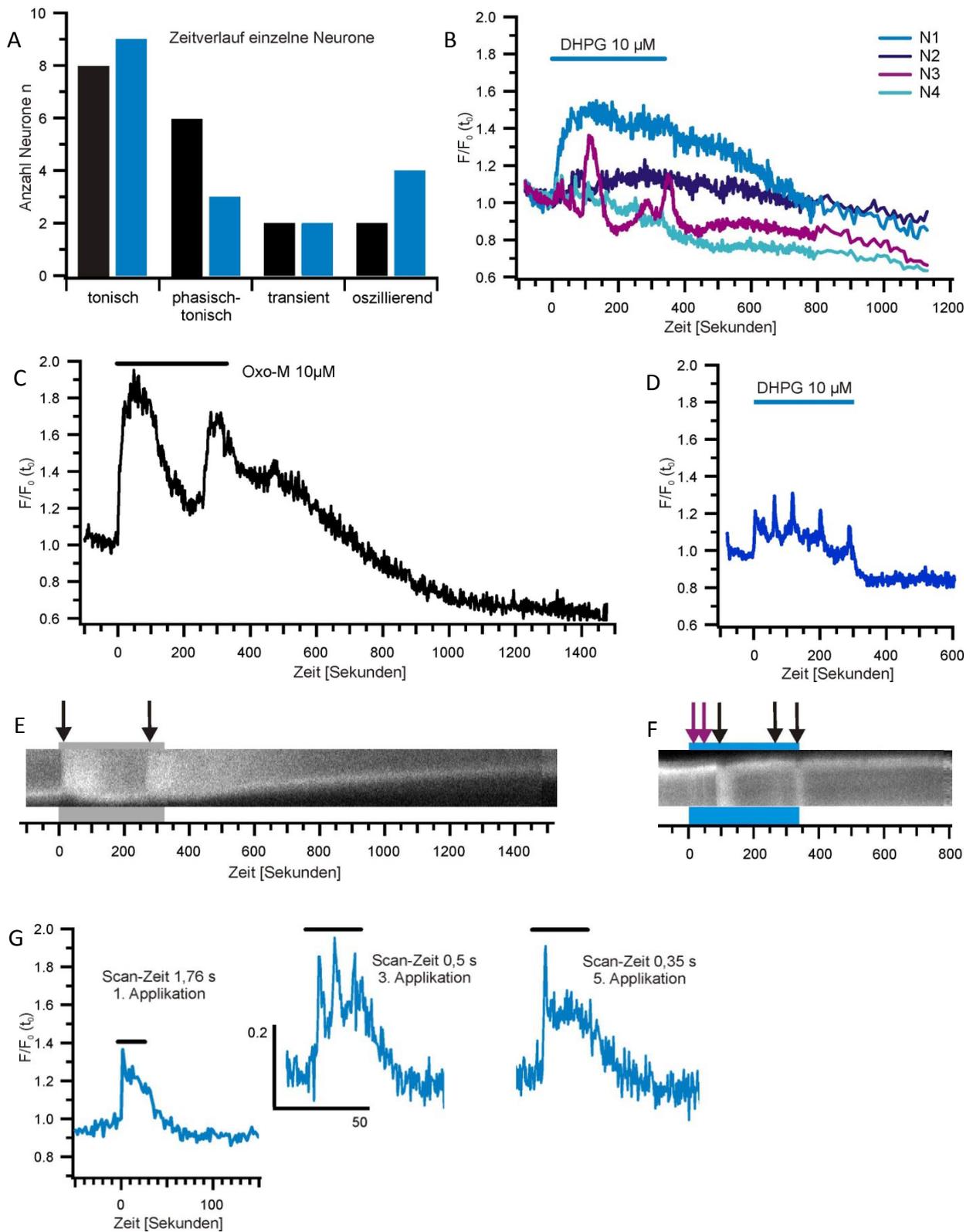


Abb. 3.28: Zusammensetzung der Zeitverläufe und Oszillationen der mAChR- und mGluRI-induzierten Sondentranslokation. **A)** Einzelne Neurone zeigen ein vom gemittelten Zeitverlauf abweichendes Verhalten. **B)** Verlauf der Dynamik (mGluRI) bei vier simultan gemessenen Neuronen. 3 Neurone oszillieren. **C)** Oszillation bei mAChR-Aktivierung. **E)** (Oxo-M) und **F)** (DHPG) *Linestack*-Rekonstruktionen des Fluoreszenzverlaufs aus C und Neuron 4 aus B (jeweils erstellt aus je über 20 Pixeln gemittelten Linienprofilen der Einzelbilder, Kontrastverstärkung 0,4% in E und 0,8% in F). Schwarze Pfeile deuten die Translokation in das Zytoplasma an; lila Pfeile: kurze Spitzen der Translokation am Reaktionsanfang). **G)** Neuron mit extrem schnellen Anstieg der zytoplasmatischen Fluoreszenz in wiederholten DHPG-Applikationen a 30 s mit unterschiedlichen Scan-Zeiten bzw. Sampling-Intervallen.

3.3.3 Dendritische PH-Domänen-Translokation

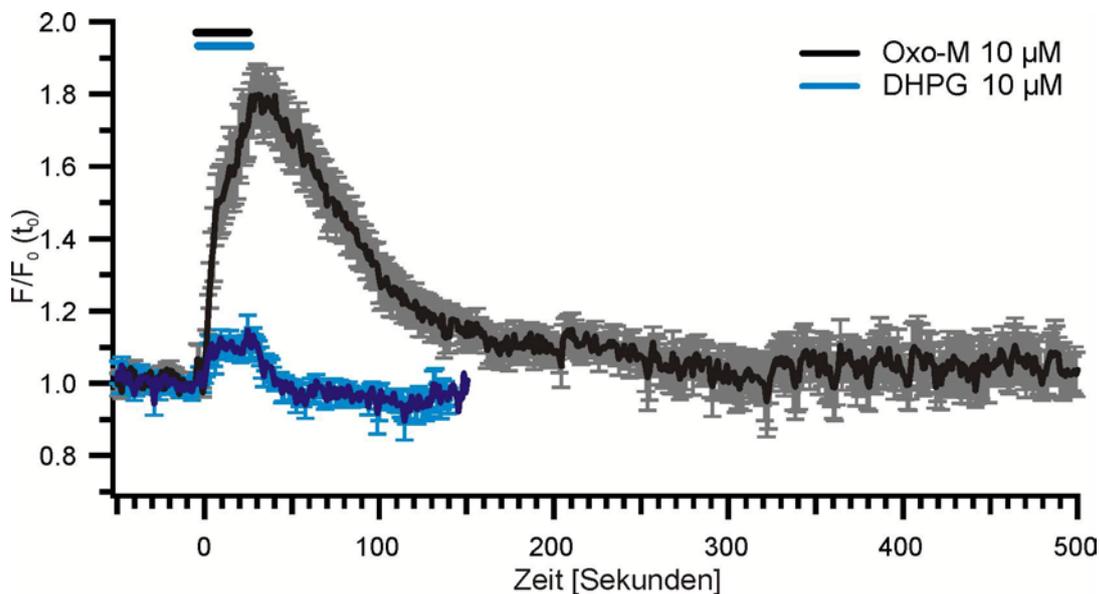


Abb. 3.29: mittlere mAChR- und mGluRI-induzierte dendritische Antworten der Pyramidenneurone. (Applikation je 30 s, Sonde: PH-Domäne). Angegeben ist die relative Fluoreszenz $F/F_0 \pm$ Standardfehler. Der Balken für die Applikation berücksichtigt die mittlere Latenz der Antworten.

Bei sieben Pyramidenneuronen mit Expression der PH-Domäne konnten erfolgreich Messungen im Bereich der Dendriten durchgeführt werden. Die mittleren Antworten auf 30 s-Applikationen von Oxo-M und DHPG sind in Abb. 3.29 dargestellt. Die Daten umfassen eine Entfernung von $-10 \mu\text{m}$ (basal) bis $200 \mu\text{m}$ (apikal, vgl. Abb. 3.30) vom Soma. Alle Zellen zeigten eine eindeutige Reaktion auf den mAChR-Agonisten Oxo-M. Wie bereits bei den Experimenten mit der Tubby-Domäne erschweren die geringen Amplituden der mGluRI-Antworten eine detaillierte Auflösung der Reaktionen. Das Ergebnis einer DHPG-Messung war nicht zweifelsfrei einzuordnen und wurde auf den ersten Datenpunkt nach Start der Applikation normiert. Die Latenz der Antworten betrug jeweils $4,33 \pm 1,11 \text{ s}$ (Oxo-M) und $4,00 \pm 0,92 \text{ s}$ (DHPG). Die relative zytoplasmatische Fluoreszenzintensität F/F_0 erreichte mit Oxo-M eine durchschnittliche Amplitude von $1,86 \pm 0,07$. Damit fallen die mit der PH-Domäne gemessenen mAChR-Amplituden anders als bei den Tubby-Messungen etwas höher aus als im Soma. Die DHPG-induzierte Translokation der PH-Domäne war mit $1,19 \pm 0,02$ der von Tubby sehr ähnlich. Folglich liegen die Amplituden von mAChR- und mGluRI-induzierter Translokation in den Dendriten bei der PH-Domäne noch weiter auseinander (Unterschied mGluRI/mAChR: $p < 0,001$) als bei Tubby. Die Kinetik des Fluoreszenzanstiegs in den Dendriten war für Oxo-M sowohl bei der Berechnung von t_{90} ($21,86 \pm 1,90 \text{ s}$) als auch der Zeitkonstante τ ($8,96 \pm 1,42 \text{ s}$) zwar leicht, aber nicht signifikant langsamer als bei

Tubby. Die Daten der DHPG-Messungen ergaben eine t_{90} von $11,72 \pm 2,91$ s. Die Regeneration benötigte bei DHPG $10,66 \pm 3,77$ s (t_{10}). Wie schon im Soma verlief die Regeneration bei Auswaschen von Oxo-M signifikant langsamer als bei Tubby (PH-Domäne $t_{10} = 142 \pm 30,53$ s, $p < 0,001$, Mann-Whitney-Test). Die Verteilung der Amplituden beider Agonisten in Bezug auf die Entfernung vom Soma ist in Abb. 3.30 C aufgetragen. Eine Beziehung zwischen Amplitude und dem Ort der Messung ist bei keinem der beiden Rezeptortypen festzustellen.

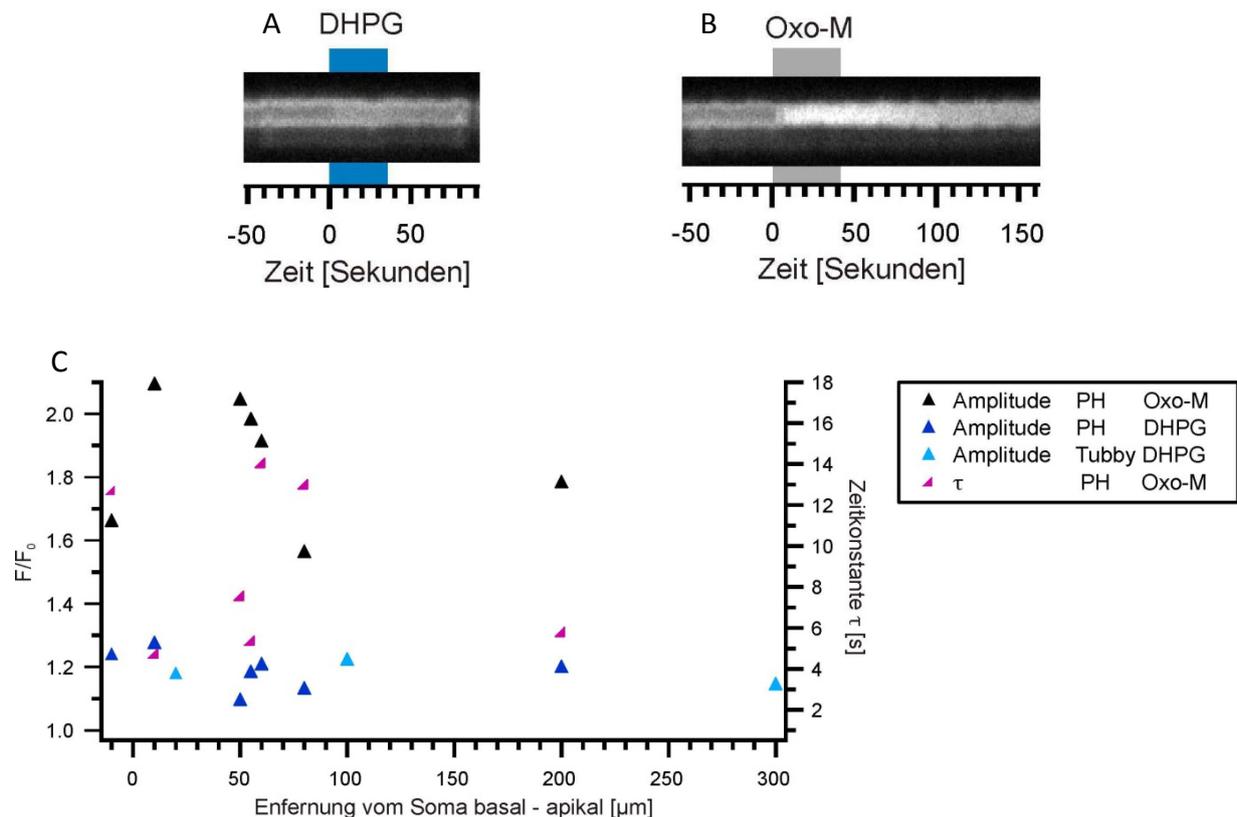


Abb. 3.30: Linestack-Rekonstruktionen eines Dendriten 200 μm vom Soma und Verteilung der Messergebnisse. A) schwache DHPG- und **B)** starke Oxo-M-Antwort eines Dendriten 200 μm vom Soma (erstellt aus je über 20 Pixeln gemittelten Linienprofilen der Einzelbilder, Kontrastverstärkung 0,4%). **C)** Einzelamplituden (\blacktriangle , linke y-Achse, mAChR schwarz, mGluRI blau) und -Zeitkonstanten (\blacktriangle , rechte y-Achse, mAChR lila). Mit eingetragen sind drei mGluRI-Dendriten-Messungen mit der Tubby-Domäne (hellblau).

3.3.4 Die Applikation weiterer $G\alpha_q$ -Rezeptoragonisten induziert keine messbare Translokation der PH-Domänensonden

Das Ausbleiben einer Translokation der Tubby-Domänen nach Aktivierung weiterer $G\alpha_q$ -gekoppelter Rezeptoren warf die Frage auf, ob gerade bei diesen Rezeptoren eine Translokation der PH-Domänen gemessen werden kann. Die Generierung von IP_3 über die $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptoren könnte unter Umständen auch bei einer schwachen oder fehlenden Reduktion der PIP_2 -Level zu einer Translokation der Sonde führen. Ein unterschiedliches Verhalten der Domänen bei Applikation eines Rezeptoragonisten könnte also sowohl einen Hinweis über die Spezifität der Signaltransduktion des Rezeptors als auch die Spezifität der Sonden geben. Die Applikation von Agonisten der $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptoren α_{1A} -Adrenorezeptor (Methoxamin, 10-20 μM , n = 25), Bradykinin (Bradykinin, 10-20 μM , n = 25), Dopamin $_{D1}$ -like (SKF 83959, 10-20 μM , n = 22), Histamin- H_1 (2-Pyridylethylamin, 10-20 μM , n = 21), $P2Y_1$ (ADP βS , 10-20 μM , n = 25), 5-HT $_{2A/2C}$ (DOI, 10-20 μM , n = 25) und Neurokinin (Neurokinin 1 μM , n = 3) induzierte jedoch keine messbare Translokation der PH-Domäne (Abb. 3.31). Die Daten umfassen Messungen am Soma und in sieben Dendriten, mit einer Entfernung von - 10 μm (basal) bis + 200 μm (apikal). Die maximale Entfernung betrug hier mit Ausnahme von Neurokinin (nur Soma) bei allen Agonisten + 200 μm vom Soma. Alle Neurone, die in die Auswertung einbezogen wurden, zeigten nachfolgend eine Antwort auf Oxo-M. Die Applikation (30 s) der verschiedenen Agonisten erfolgte in wechselnder Reihenfolge mit einem Intervall von ca. einer Minute. Sieben weitere Zellen wurden auf eine Reaktion auf die Transmitter Dopamin und Serotonin (je 100 μM , 5 min Applikation) getestet, davon vier am Soma und drei in einem Bereich vom Soma bis 15 μm apikal. Auch in diesen Fällen wurde keine Translokation der Sonden beobachtet.

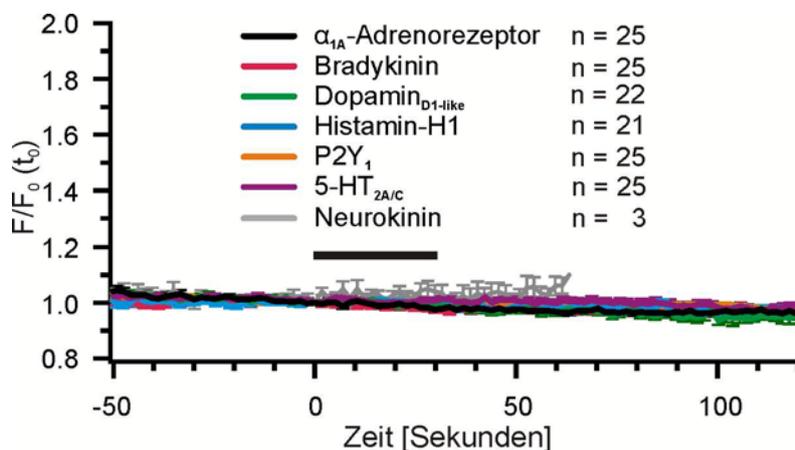


Abb. 3.31: Hippocampale $G\alpha_q$ -Rezeptoren ohne messbare Translokation der PH-Domäne.

Die Applikation spezifischer Agonisten von α_{1A} -Adrenorezeptor (Agonist: Methoxamin), Bradykinin (Bradykinin), Dopamin $_{D1}$ -like (SKF 83959), Histamin- H_1 (2-Pyridylethylamin), $P2Y_1$ (ADP βS), 5-HT $_{2A/2C}$ (DOI) und Neurokinin (Neurokinin) induzierte keine Translokation der Sonden in den CA1-Pyramidenneuronen.

3.3.5 Zusammenfassung der PH-Domänen-Translokation

Die Ergebnisse der Messungen mit der PH-Domäne als Sensor stimmen bis auf die Regeneration der Oxo-M-Antwort weitestgehend mit den Tubby-Daten überein. Sowohl die Aktivierung von mGluRI mit dem spezifischen Agonisten DHPG als auch die Aktivierung von mACh-Rezeptoren mit Oxo-M führt zu einer robusten Translokation in CA1-Pyramidenneuronen. Die Applikation von Oxo-M induziert in der Regel eine stärkere Translokation in Relation zu DHPG. Wie bei der Tubby-Domäne sind vereinzelt jedoch auch starke mGluRI-Antworten zu beobachten. In den Dendriten ist die Differenz zwischen den Amplituden noch stärker ausgeprägt.

Die mittleren Antworten zeigen einen phasisch-tonischen Verlauf über die Applikationsdauer, wobei die Desensibilisierung bei mAChR stärker ausgeprägt ist. Auch mit der PH-Domäne setzt sich der durchschnittliche Zeitverlauf im Einzelnen aus phasisch-tonischen, tonischen, transienten und oszillierenden Verlaufsformen zusammen. Unter den mit der PH-Domäne gemessenen Zellen konnten weniger Oszillationen während der Oxo-M-Applikation beobachtet werden als mit Tubby. Dagegen wurden mit der PH-Domäne etwas mehr Oszillationen nach DHPG beobachtet, die zum Teil von schnellen Spitzen geprägt waren. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Daten der Tubby-Domäne ergeben sich in der Regeneration, die bei den Ergebnissen der PH-Domäne langsamer verläuft. Auch mit der PH-Domäne konnte keine Antwort der Neurone auf die Applikation spezifischer α_{1A} -Adrenorezeptor, Bradykinin, Dopamin_{D1-like}, Histamin-H₁, P2Y₁, 5-HT_{2A/2C} und Neurokin-Agonisten beobachtet werden.

3.4 Elektrophysiologische Effekte der verwendeten $G\alpha_q$ -Agonisten

Für alle verwendeten $G\alpha_q$ -Agonisten wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik elektrophysiologische Messungen durchgeführt, um die Effekte mit den Daten der optischen Messungen zu vergleichen. Dies sollte insbesondere Aufschluss darüber geben, ob der Verlauf und die Stärke der Reaktionen mit denen der PIP_2 -Dynamik korrelieren. Für die Experimente wurden aufgrund der allgemein weniger anspruchsvollen Herstellung von Schnitten jüngerer Tiere vor allem P14- bis P21-Ratten verwendet. Die Optimierung des verwendeten Protokolls orientierte sich an der Messung von über m_1 -like-Ach-Rezeptoren vermittelten Effekten (vgl. Abschnitt 1.2.3). Der Ablauf des Protokolls und das Verhalten eines CA1-Pyramidenneurons vor und nach einer Applikation des mAChR-Agonisten Oxo-M sind in Abb. 3.32 veranschaulicht. Mit Hilfe von de- und hyperpolarisierenden Stromsprüngen im Current-Clamp-Modus wurden Informationen zum Membranpotential, Eingangswiderstand, Feuerverhalten (Anzahl der Aktionspotentiale und Frequenz) und Nachhyperpolarisation erhalten. Die Dauer der Substanzapplikation betrug zwei Minuten. Als Negativkontrolle diente das Umschalten zu einer zweiten Standard-ACSF-Applikation. Dies sollte auch das eventuelle Auftreten unspezifischer Effekte berücksichtigen, welche aus Änderungen der Flussgeschwindigkeit oder des pH-Wertes durch Ausgasen der Bikarbonat-gepufferten ACSF resultieren können. Alle Messungen erfolgten unter Verwendung von $GABA_{A/B}$ - und iGluR-Antagonisten zur Vermeidung von Netzwerkeffekten.

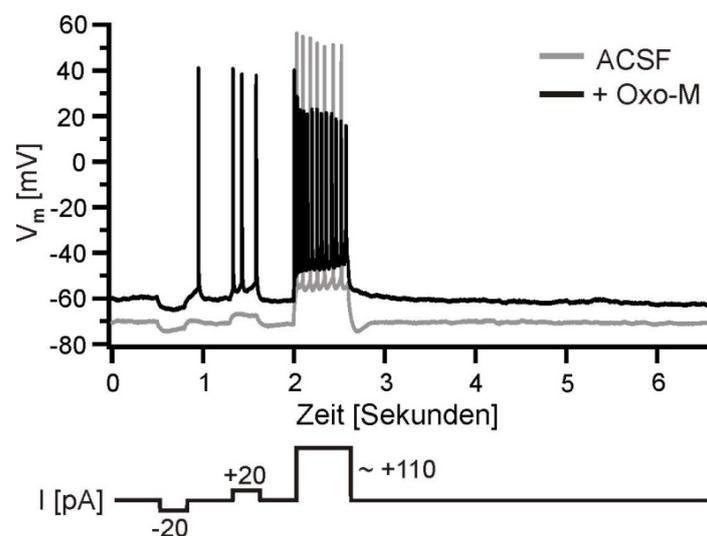


Abb. 3.32: Current-Clamp-Protokoll zur Messung elektrophysiologischer $G\alpha_q$ -Effekte. Abfolge der hyper- und depolarisierenden Strominjektionen (unten) und elektrophysiologische Antwort eines Neurons vor und während Oxo-M-Applikation. Die kleinen Stromsprünge dienen zur Messung des Eingangswiderstands, die längere starke Strominjektion zur Analyse des Feuerverhaltens (Anzahl APs/Frequenz, AHP und ADP).

In den optischen Messungen waren mAChR und mGluRI die einzigen Rezeptoren, über die eine Translokation der PIP₂-spezifischen Sonden induziert werden konnte. Diese Rezeptoren induzierten auch in den elektrophysiologischen Messungen die stärksten Effekte. Die Latenzzeit betrug jeweils wenige Sekunden und stimmt grob mit den Latenzen der Sondentranslokationen überein. Die Ergebnisse aller Rezeptoren sind in Abb. 3.33 und 3.34 zusammengefasst. Die Daten ergeben für den mAChR-Agonisten Oxo-M und den mGluRI-Agonisten DHPG eine signifikante Depolarisation, eine Erhöhung der Anzahl der Aktionspotentiale und des Eingangswiderstands (Oxo-M 10 μ M, n = 11, s. auch Abb. 3.32; DHPG 10 μ M, n = 9, p jeweils < 0,05). Bei beiden Agonisten tritt an die Stelle der Nachhyperpolarisation (AHP) im Anschluss an die Aktionspotentialesequenz eine Nachdepolarisation (ADP). In Abb. 3.34 ist jeweils sowohl eine Abschätzung der mittleren (AHP_m) als auch langsamen AHP (AHP_s) angegeben. Beide werden von unterschiedlichen Strömen getragen. Die Berechnung der AHP_m erfolgte dabei sowohl aus dem V_m-Minimum in einem Bereich bis 200 ms nach dem depolarisierenden 600 ms Strompuls als auch aus dem Mittelwert von V_m 90 bis 110 ms nach dem Puls (jeweils in Differenz zu V_m am Protokollanfang; ein positives Δ entspricht einer ADP). Letzteres erlaubt eine bessere Abschätzung der Potentialänderungen im Falle einer Depolarisation. In Abb. 3.34 ist für jeden Rezeptor nur jeweils einer der beiden Werte dargestellt. Änderungen der AHP_s wurden aus der Berechnung des Mittelwerts von V_m im Bereich 300 bis 500 ms nach dem langen Strompuls abgeschätzt. Die Aktivierung der mACh-Rezeptoren führte in einigen Fällen zum Auftreten eines sogenannten Plateaupotentials (Fraser & MacVicar, 1996), d.h. einer mehrere Sekunden anhaltenden Depolarisation in Folge der Aktionspotentiale während des langen positiven Strompulses. Daneben zeigten die Neurone häufig eine initiale Hyperpolarisation, welche laut Literatur auf die Aktivierung von SK-Kanälen zurückzuführen ist (Gulledge & Kawaguchi, 2007). Die mGluRI- und mAChR-induzierte Depolarisation dauerte nicht bei allen Zellen über die gesamte Applikationsdauer an. Insbesondere unter Oxo-M kam es zu deutlichen Schwankungen des Membranpotentials und vorzeitigen Hyperpolarisationen. Deutlich wird dies am Beispiel des Neurons in Abb. 3.35 A. Nach einer anfänglichen starken Depolarisation zeigte es noch während der Oxo-M Applikation eine über das Ruhemembranpotential hinausgehende Hyperpolarisation, bevor eine erneute Depolarisation erfolgte. Der Verlauf der Membranpotentialschwankung erinnert an die Oszillationen der PIP₂-Dynamik unter Oxo-M. Die Daten dieses Neurons stammen aus Messungen, die zusätzlich an P27 bis P32 durchgeführt wurden. Das Neuron wurde an P27 gemessen und hatte ein Ruhemembranpotential von -67 mV.

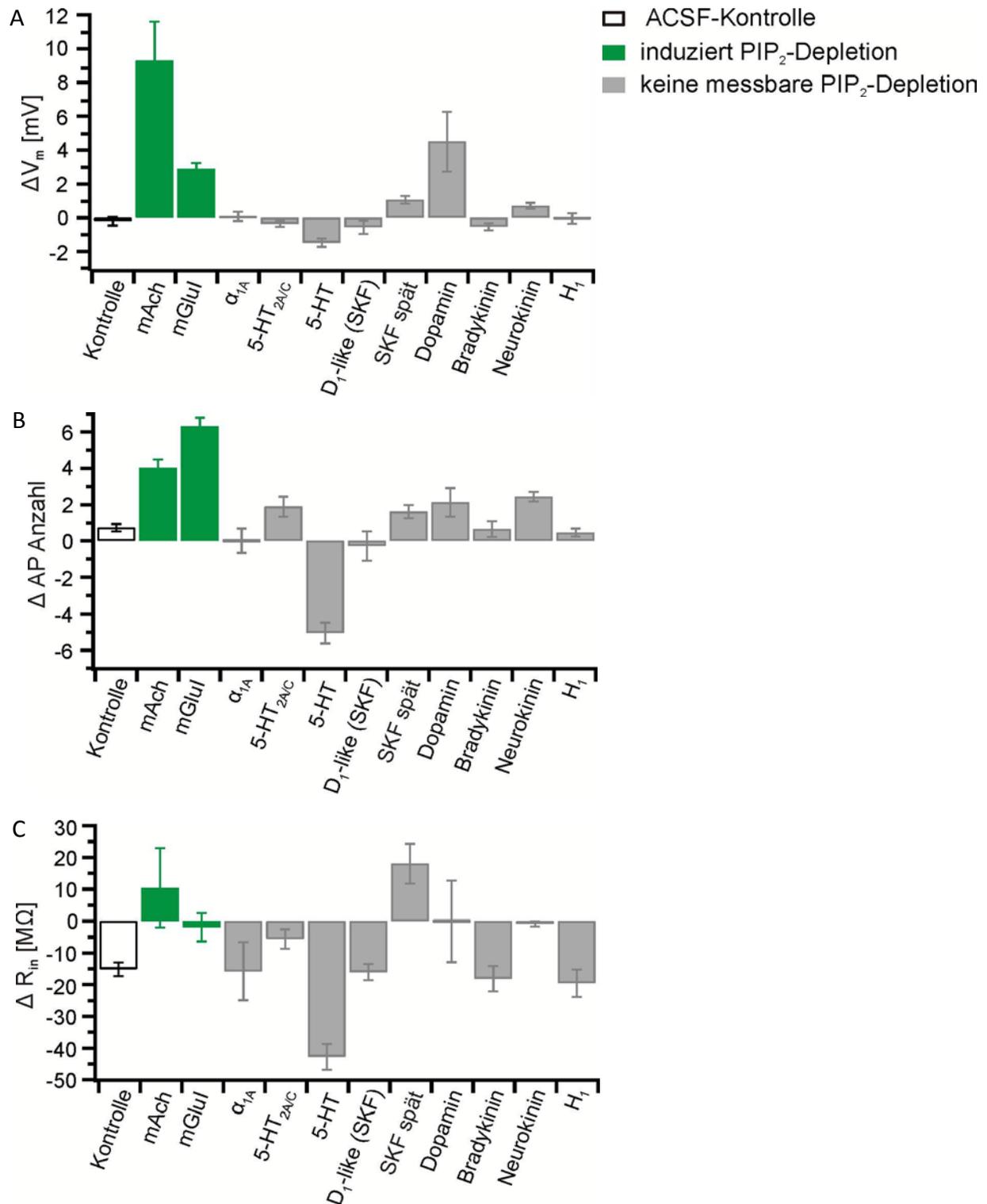
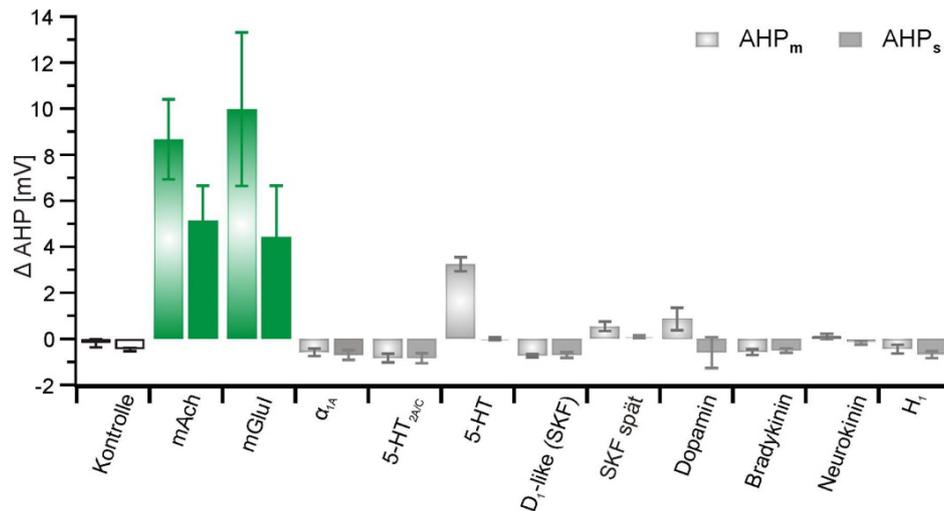


Abb. 3.33: elektrophysiologische Effekte der $G\alpha_q$ Agonisten: V_m , Anzahl APs und R_{in} . Dargestellt sind jeweils die Differenzen (Δ) der Werte vor und während Applikation der Agonisten. **A)** Membranpotential **B)** Anzahl der Aktionspotentiale während des 600 ms Strompulses. **C)** Eingangswiderstand R_{in} (aus -20 pA Puls). $n =$: 10 Kontrolle, 11 mAChR (Oxo-M), 9 mGluRI (DHPG), 8 α_{1A} (Methoxamin), 8 5-HT_{2A/C} (DOI), 8 5-HT (Serotonin), 7 D₁-like (SKF 83959; 6 „spät“), 8 Dopamin, 7 Bradykinin, 8 Neurokinin, 8 H₁ (2-Pyridylethylamin).

Abb. 3.34: elektrophysiologische Effekte der $G\alpha_q$ Agonisten: mittlere (AHP_m) und langsame (AHP_s) Nachhyperpolarisation. Farblgende siehe Abb. 3.33.



Nach mAChR und mGluRI waren die deutlichsten elektrophysiologischen Effekte nach Aktivierung von Serotonin- und Dopaminrezeptoren zu beobachten. Der unmittelbare Effekt einer Serotoninapplikation bestand in einer markanten Hyperpolarisation. Damit verbunden war eine Reduktion des Eingangswiderstands und der Aktionspotentiale sowie des AHP (vgl. Abb. 3.33/34, 50 μ M, n = 8). Die Hyperpolarisation erreichte nach wenigen Sekunden ihr Maximum, danach stabilisierte sich das Membranpotential auf einem etwas positiveren Niveau. Bei 4 Zellen trat während des Auswaschens eine transiente Depolarisation ein. Ein Beispiel ist in Abb. 3.35 B gezeigt. Der biphasische Verlauf der Serotoninantwort ist auf die Aktivierung unterschiedlicher 5-HT-Rezeptoren zurückzuführen (Andrade & Nicoll, 1987; Beck, 1992; Torres *et al.*, 1995). Dabei sind $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren an den Komponenten der Serotoninantwort beteiligt, die eine Steigerung der elektrischen Erregbarkeit bewirken. Der 5-HT_{2A/C} spezifische Agonist DOI bewirkte eine signifikante Erhöhung der Aktionspotentialanzahl verbunden mit einer Verstärkung des AHP_m sowie einen im Vergleich zur Kontrollapplikation erhöhten Eingangswiderstand (20 μ M, n = 8).

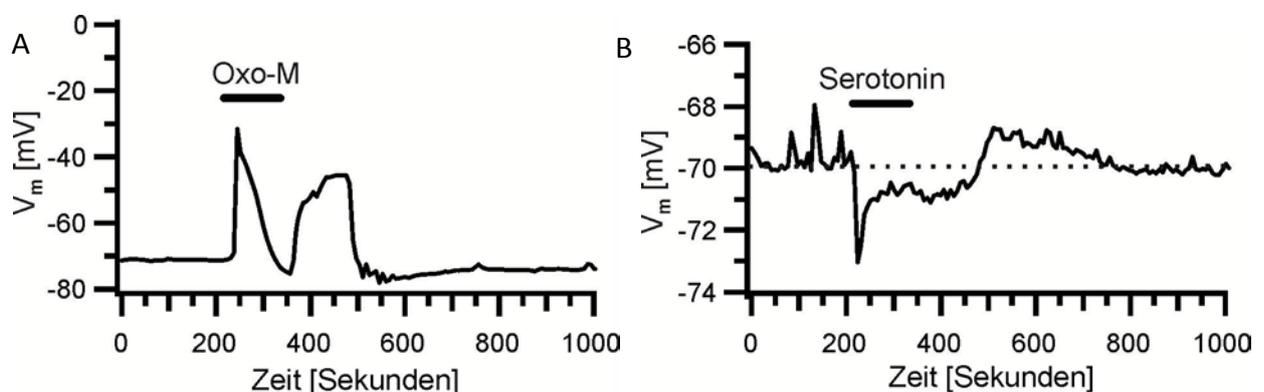


Abb. 3.35: Oxo-M-induzierte Potentialschwankungen und biphasische Serotoninantwort.

A) Schwankungen im Potentialverlauf nach Aktivierung von mACh-Rezeptoren mit Oxo-M bei einem P27 Neuron. **B)** Serotonin-Reaktion mit früher Hyperpolarisation und später Depolarisation.

Die Pyramidenneurone reagierten auf die Applikation von Dopamin (50 μM , $n = 8$) mit einer statistisch signifikanten Depolarisation, einer leichten Erhöhung des Feuerverhaltens und einer Reduktion des AHP_m . Die Applikation des D_1 -like Agonisten SKF 83959 bewirkte zunächst lediglich eine signifikante Verstärkung des AHP_m in Kombination mit einer leichten Hyperpolarisation (20 μM , $n = 7$; p jeweils $< 0,05$). Im Verlauf der Applikation und während des Auswaschens zeigten die Neurone eine signifikante Depolarisation, die gepaart war mit einer signifikanten Erhöhung des Eingangswiderstands und einer allgemeinen Reduktion der Nachhyperpolarisation ($n = 6$). Die beobachteten Effekte stehen im Einklang mit einer gemischten Wirkung von SKF 83959, die neben einer Aktivierung von atypischen D_1 -like Rezeptoren auch Dopamin-Rezeptor unabhängige Effekte einzuschließen scheinen (Chu *et al.*, 2011).

Die Applikation von Neurokinin- (1 μM , $n = 8$), Bradykinin- (20 μM , $n = 7$), α_1 -adrenergen- (Methoxamin 20 μM , $n = 8$) und Histamin- H_1 -Agonisten (2-Pyridylethylamin, 20 μM , $n = 8$) ergab nur schwache Effekte oder zeigte keine nachweisbare Wirkung.

Die Ergebnisse des P2Y_1 -Agonisten ADP βS ergaben eine für $\text{G}\alpha_q$ -Rezeptoren unerwartete Wirkung auf die CA1-Pyramidenneurone (10 μM , $n = 10$). Hier zeigte sich eine Hyperpolarisation und Reduktion des Eingangswiderstands zusammen mit einer Inhibition von HCN-Kanälen (Abb. 3.36). Diese Effekte ähneln denen einer Aktivierung von Adenosinrezeptoren in CA1-Pyramidenneuronen (Zhu & Krnjević, 1997). Da nach diesen Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden konnte, dass ADP βS in den hippocampalen Hirnschnitten zu Adenosin abgebaut wird, habe ich die Spezifität der Effekte mit dem P2Y_1 -Antagonisten MRS 2179 (10 μM , $n = 5$) und dem Adenosin-Antagonisten CGS 15943 (100 nM, $n = 5$) getestet (Abb. 3.36 B - D). Die Applikation der Antagonisten erfolgte jeweils zusammen mit einer zweiten Applikation des Agonisten. Als positiv-Kontrolle dienten Neurone mit einer zweiten Applikation von ADP βS ohne Antagonist ($n = 4$). Die Anwesenheit des P2Y_1 -Antagonisten führte zu keiner erkennbaren Reduktion der Effekte, während der Adenosin-Antagonist zu einer deutlichen Reduktion der Wirkung von ADP βS führte. Daraufhin habe ich die Wirkung von ADP βS auf die PIP_2 -Depletion zusätzlich in hippocampalen Primärkulturen getestet (nicht gezeigt), da hier auch bei einer Hydrolyse von ADP βS noch genug Agonist für eine Aktivierung von P2Y_1 -Rezeptoren ankommen sollte. Auch hier konnte keine PIP_2 -Depletion nachgewiesen werden (positiv-Kontrolle: Oxo-M/DHPG).

Insgesamt korreliert die (mit Tubby gemessene) PIP_2 -Depletion mit der Stärke der elektrophysiologischen Effekte. Die Wirkung von mGluRI und mACh-Rezeptoren hebt sich insbesondere in der Steigerung der AP-Anzahl und einer ADP von den anderen $\text{G}\alpha_q$ -

gekoppelten Rezeptoren ab. Dies sind Effekte, die vor allem eine Steigerung der Aktionspotentialfrequenz darstellen. Der Verlauf der mAChR- und mGluRI-Reaktionen ist soweit aus den getrennten Messungen zu beurteilen im Einklang mit der gemessenen PIP₂-Dynamik.

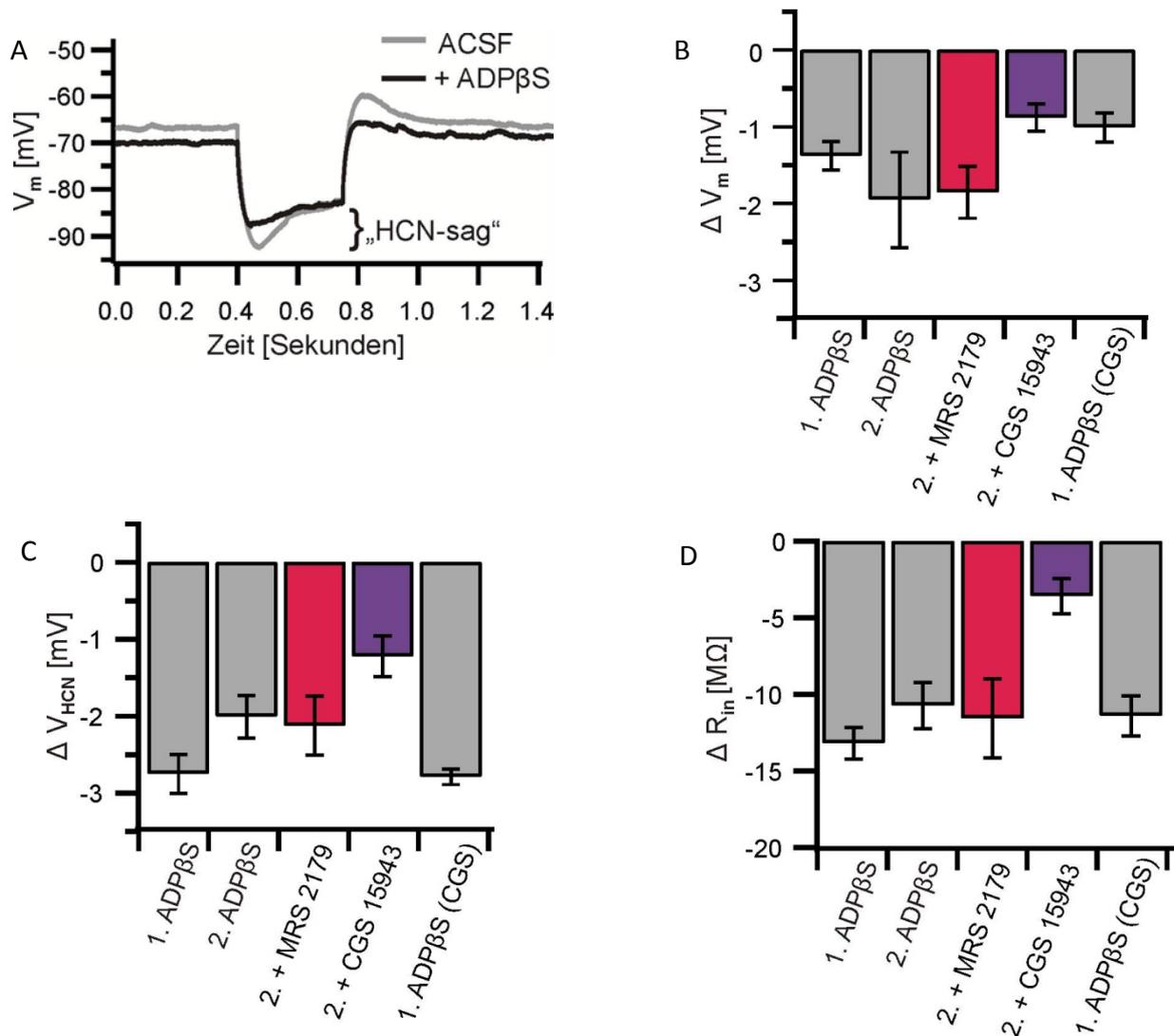


Abb. 3.36: Adenosinähnliche Wirkung des P2Y₁-Agonisten ADP β S auf CA1-Pyramidenneurone *in situ*. **A)** Repräsentative Antwort eines Neurons auf ADP β S-Applikation mit Hyperpolarisation, Reduktion des Eingangswiderstands (Erkennbar als eine Reduktion der Spannungsantwort auf einen Stromsprung) und Verringerung des charakteristischen „HCN-sag“. **B)** Der Adenosin-Antagonist CGS 15943 (100 nM = 5), aber nicht der P2Y₁-Antagonist MRS 2179 (10 μ M, n = 5), bewirkt eine Reduktion der Steigerung der ADP β S-Effekte in der 2. Applikation des Agonisten. Die erste ADP β S-bedingte Hyperpolarisation fällt in diesen separat gemessenen Neuronen allerdings geringer aus und ist daher als 1. ADP β S (CGS) mit aufgetragen. 1. ADP β -Applikation: n = 10 (10 μ M), 2. ADP β S-Applikation ohne Antagonisten: n = 4. **C)** Die Inhibition des „HCN-sag“ (ΔV_{HCN}) wird nur durch den Adenosin-Antagonisten verringert. **D)** Der Adenosin-Antagonist bewirkt eine Stabilisierung des Eingangswiderstands.

3.5 Synaptisch induzierte PIP₂-Depletion

In den Experimenten aus Abschnitt 3.2 konnte gezeigt werden, dass (mGluRI und mAChR) G-Protein gekoppelte Rezeptoren in akuten hippocampalen Hirnschnitten eine Reduktion der PIP₂-Level bewirken können. Dazu wurden die Rezeptoren der CA1-Pyramidenneurone pharmakologisch mithilfe spezifischer Agonisten aktiviert. Damit die Dynamik des PIP₂ eine Bedeutung für die *in vivo* Signaltransmission haben kann, muss die Depletion der PIP₂-Level jedoch auch durch die synaptische Aktivierung der Rezeptoren über endogene Transmitter induzierbar sein. Um die physiologischen Bedingungen der PIP₂-Dynamik weiter beurteilen zu können, wurde daher im nächsten Schritt die synaptische Induzierbarkeit der PIP₂-Depletion untersucht. Dazu wurden die präsynaptischen cholinergen Eingänge der CA1-Pyramidenneurone elektrisch stimuliert. In vorbereitenden Experimenten wurde die Wirkung der Stimulation auf die Neurone zunächst über die elektrophysiologische Messung in Patch-Clamp-Ableitungen geprüft (Abschnitt 3.5.1). Schließlich wurde die PIP₂-Depletion nach elektrischer Stimulation mit Hilfe der PIP₂-spezifischen Tubby-Sonde in der konfokalen Lasermikroskopie untersucht (Abschnitt 3.5.2).

3.5.1 Elektrophysiologische Messung elektrisch induzierter cholinerg *slow EPSPs*

Die Aktivierung G α_q -gekoppelter muskarinischer Rezeptoren führt in hippocampalen Pyramidenneuronen zur Modulation einer Reihe von Ionenkanälen und bewirkt eine Änderung der elektrischen Erregbarkeit (vgl. Abschnitt 1.2.3 und 3.4). Eine starke elektrische Stimulation septohippocampaler Fasern führt über die Ausschüttung des endogenen Transmitters Acetylcholin zum Auftreten von mAChR-induzierten langsamen exzitatorischen postsynaptischen Potentialen. Diese sog. cholinergen *slow EPSPs* können sich über einen Zeitraum von mehreren Sekunden erstrecken (Cole & Nicoll, 1983; Morton & Davies, 1997). Ziel der Patch-Clamp-Experimente in diesem Abschnitt war es, cholinerge *slow EPSPs* zu induzieren und die Effektivität der elektrischen Stimulation sowie der verwendeten Protokolle zu testen.

Die CA1-Pyramidenneurone wurden zunächst in Standard-ACSF abgeleitet. Unter diesen Bedingungen zeigen sie eine basale synaptische Aktivität (nicht gezeigt) und reagieren auf einzelne Strominjektionen zur Stimulation afferenter Fasern mit schnellen glutamatergen EPSPs (Abb. 3.37 A). Bei den glutamatergen Fasern handelt es sich vor allem um

Projektionen aus anderen Arealen des Hippocampus (vgl. Abschnitt 1.2.1). Die Applikation von ACSF mit Antagonisten ionotroper Glutamat- und GABA_{A/B}-Rezeptoren (vgl. Abschnitt 2.5.2) blockierte die schnelle synaptische Transmission (B).

Nach erfolgreicher Blockierung der schnellen EPSPs wurden Serien von Pulsen mit variierender Frequenz und Stromstärke eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.5.2). Abb. 3.37 C zeigt schematisch den Aufbau eines einzelnen Strompulses. In 11 von 61 Neuronen konnten langsame exzitatorische Potentiale beobachtet werden (Beispiel s. Abb. 3.37 D). Bei zwei Neuronen konnte kein langsames EPSP verfolgt werden, dafür aber eine Modulation der elektrischen Eigenschaften in anschließenden Current-Clamp-Protokollen. Die Antworten einer dieser Zellen vor und nach der Stimulation sind in Abb. 3.37 E dargestellt.

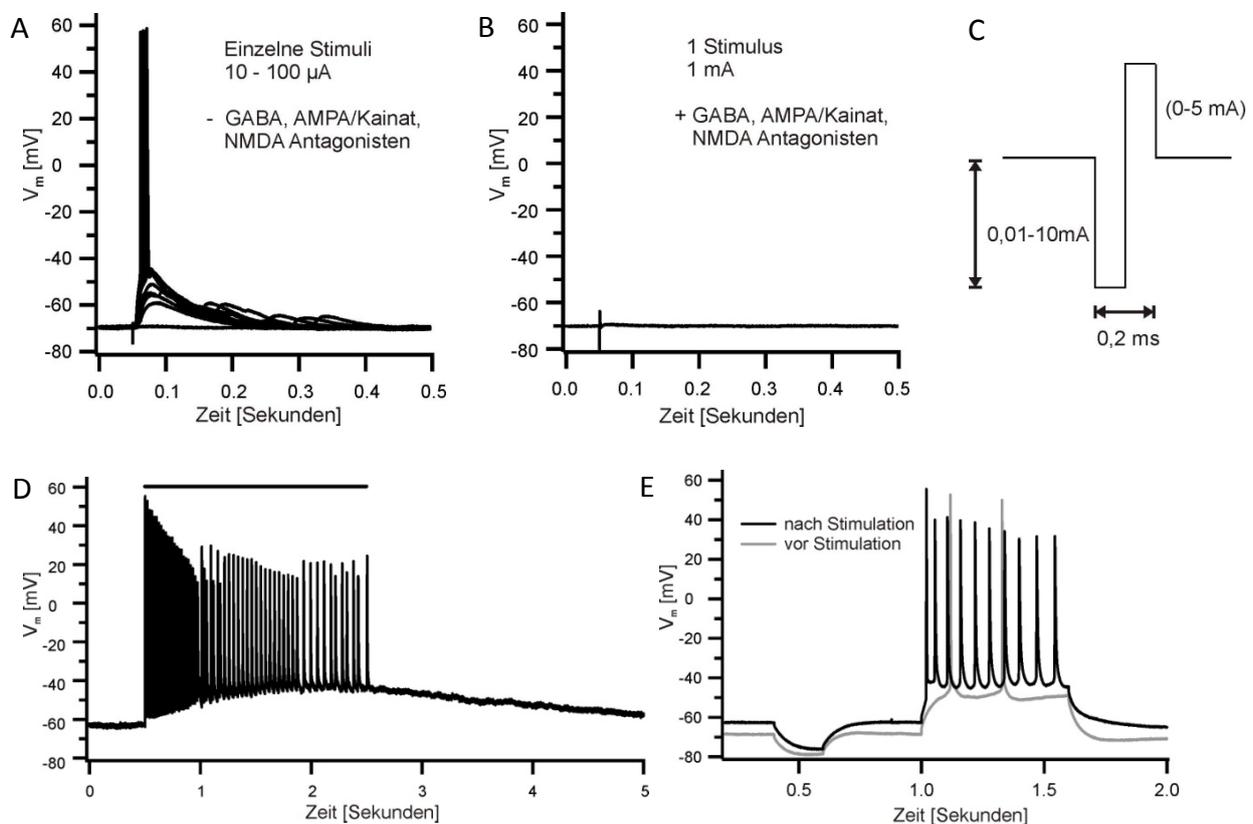


Abb. 3.37: Elektrische Antworten von CA1-Pyramidenneuronen auf Stimulation im *Stratum oriens*. **A)** Schnelle EPSPs als Antwort auf einzelne Stimuli in Standard ACSF. **B)** Blockierung der schnellen synaptischen Transmission in Gegenwart von GABA_{A/B}- und iGluR-Antagonisten. **C)** Schema eines einzelnen elektrischen Stimulus. **D)** Langsames exzitatorisches Potential induziert durch eine Stimulationssequenz aus 100 Pulsen von je 1 mA und 50 Hz (Balken, Stimulationsartefakte wurden hier zur Darstellung manuell entfernt). **E)** mAChR-ähnliche Modulation der elektrischen Merkmale eines Neurons nach elektrischer Stimulation.

Bei drei Neuronen konnte die Spezifität der beobachteten Effekte mit dem mAChR-Antagonisten Atropin getestet werden (vgl. Cole & Nicoll, 1983). Alle Neurone zeigten während Applikation von 5 μ M Atropin keine langsamen exzitatorischen Potentiale. Dies belegt, dass es sich bei den Antworten der Neurone um mAChR-vermittelte *slow EPSPs*

handelt. Die Antworten eines Neurons vor (schwarz) und während der Applikation von Atropin (rot) sind in Abb. 3.38 A gezeigt. Die Atropinapplikation bestätigte allerdings auch, dass es durch die elektrische Stimulation in einigen Fällen wahrscheinlich zu einer direkten elektrischen Erregung ohne synaptische Transmission kommt (nicht gezeigt). Zu erkennen war dies an in Folge der elektrischen Stimulation auftretenden Aktionspotentialen, die von Atropin nicht blockiert wurden. Nach 20 minütigem Auswaschen des Antagonisten konnte bei einem der Neurone wieder ein *slow EPSP* ausgelöst werden (nicht gezeigt).

Entsprechend der aktivitätsabhängigen Desensibilisierung von mACh-Rezeptoren ist auch von *slow EPSPs* eine Abnahme der Antworten nach vorangegangener starker Aktivierung der Rezeptoren beschrieben worden (Morton & Davies, 1997). Diese Desensibilisierung ist allerdings reversibel und zeigt in einem Zeitraum von 5 bis 10 Minuten eine deutliche Reduktion (Morton & Davies, 1997; Willets *et al.*, 2004). Dieses Verhalten war auch in den hier beschriebenen Experimenten zu beobachten (Abb. 3.38 B).

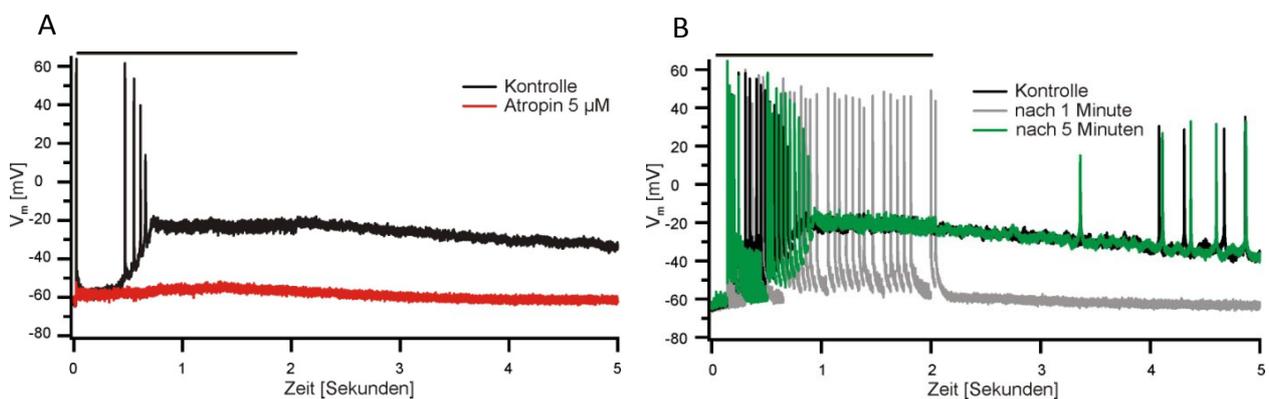


Abb. 3.38: Blockierung der *slow EPSPs* durch Atropin und Desensibilisierung. A) Blockierung durch den mAChR-Antagonisten Atropin (5 μ M). **B)** Desensibilisierung und Regeneration der Erregbarkeit bei Wiederholung der Stimulation in verschiedenen Zeitabständen.

Die Induktion von *slow EPSPs* war grundsätzlich mit allen an die Literatur angelehnten Frequenzen von 20 – 50 Hz möglich. In dieser Arbeit wurden in der Regel 100 Pulse pro Stimulus verwendet, bei einigen Neuronen war jedoch eine deutliche Sättigung der Reaktion vor Ende der Pulsserie zu beobachten. Die minimale Stromstärke, mit der in den Neuronen ein EPSP ausgelöst werden konnte, war 0,1 mA. Bei Neuronen, für die verschiedene Positionen der Elektrode in CA1 getestet wurden, ergaben sich die besten Resultate durch Stimulation im *Stratum oriens*.

Insgesamt zeigen die Daten der erfolgreich stimulierten Neurone eine gute Übereinstimmung mit der Literatur. Neurone, die bei stabiler Ableitung nach wiederholter Stimulation sowie umpositionieren der Stimulationselektrode keine *slow EPSP*-Reaktion zeigten, wurden einer Oxo-M-Positiv-Kontrolle unterzogen. Neun von neun Zellen zeigten hier eine Reaktion auf die Applikation des mAChR-Agonisten. Eine Ursache für die insgesamt

geringe Erfolgsrate konnte in einem Vergleich von Neuronen mit und ohne *slow EPSP* nicht gefunden werden.

3.5.2 Analyse elektrisch induzierter PIP₂-Depletion

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.5.1 zeigen, dass mit den in dieser Arbeit verwendeten Stimulationsprotokollen die synaptische Transmission über endogenes Acetylcholin aktiviert werden konnte. Nun wurde getestet, ob die Wirkung der synaptischen cholinergen Transmission stark genug ist, um eine PIP₂-Depletion zu induzieren. Die Experimente zur synaptisch induzierten PIP₂-Depletion wurden ohne elektrische Ableitung der Zellen durchgeführt. Die Membran und das Zytoplasma der Neurone blieben somit vollständig intakt. Die Analyse der Antworten erfolgte ausschließlich über die konfokale Messung der Tubby-Sondentranslokation.

Elektrische Stimulation im *Stratum oriens* führte in 18 von 44 Neuronen zu einer reversiblen Translokation der Tubby-Sonde mit einer Regeneration im Zeitraum von einigen Sekunden bis wenigen Minuten. Da die Translokation der Tubby-Domäne nach derzeitigen Erkenntnissen ausschließlich durch Verringerung der PIP₂-Konzentration hervorgerufen wird, zeigt dies eine durch die elektrische Stimulation induzierte PIP₂-Depletion an. Dies deutet darauf hin, dass die Ausschüttung endogener Transmitter eine Gα_q- bzw. PLC-gekoppelte PIP₂-Dynamik in den CA1-Pyramidenneuronen bewirken kann. Bei 13 Neuronen konnte keine messbare Reaktion in Form einer Translokation der Sonden festgestellt werden. Weitere 13 Neurone zeigten im Verlauf der Stimulationen eine starke PIP₂-Depletion, bei der eine Regeneration im Messzeitraum (20 min bis 1^{1/2} h) entweder ausblieb, sehr langsam verlief oder nicht zu beurteilen war. So trat bei einzelnen Zellen die Regeneration z.B. erst nach 15 bis 25 Minuten ein, in einem Extremfall regenerierte sich die Membranlokalisierung der Sonden nach einer Stunde. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass einem Teil dieser Daten ein Rezeptor-induzierter Effekt zugrunde liegt. Allerdings zeigten einzelne Neurone Anzeichen einer Schädigung, wie z.B. einem Anschwellen des Zellkerns. Daher werden die Daten der 13 Neurone mit ungewisser bzw. stark verzögerter Regeneration nicht näher behandelt.

Die Latenz der Antworten war in der Regel unter den gegebenen Messbedingungen nicht aufzulösen, betrug also weniger als die Zeit der minimalen Bildabfolge von 1,76 s. Der Normierungszeitpunkt t_0 wurde daher je nach dem exakten zeitlichen Abstand des Stimulationsbeginns zum nächsten Datenpunkt auf den Zeitpunkt vor oder nach Start der Stimulation festgelegt. Die PIP₂-Depletion erreichte den t_{90} -Wert durchschnittlich in 7 ± 1 s

(n = 18). Die mittlere maximale Amplitude der Antworten betrug $1,35 \pm 0,05$ (F/F_0) relativ zur Ausgangsfluoreszenz. Die kleinste Antwort war eine Zunahme der zytoplasmatischen Fluoreszenz um 6 %, die größte um 90%. Die Dauer der PIP_2 -Reduktion (von t_0 bis zur vollständigen Regeneration der Fluoreszenz) betrug durchschnittlich 79 ± 25 s. Abb. 3.39 A zeigt repräsentativ die Antwort eines Neurons auf die elektrische Stimulation.

Drei Neurone zeigten in voneinander unabhängigen Experimenten einen zweiphasigen Verlauf der PIP_2 -Dynamik, bei der einer ersten kurzen Depletion eine zweite längere folgte. Durch die zweite Phase der Reaktion hielt die Reduktion von PIP_2 bei diesen Zellen deutlich länger an als bei den übrigen 15 Neuronen. Abb. 3.39 B veranschaulicht den Verlauf einer solchen Reaktion am Beispiel eines Neurons, dass dieses Verhalten in mindestens vier aufeinander folgenden Messungen zeigte. In Abb. 3.39 C ist die *Linestack*-Rekonstruktion der Messung aus B dargestellt.

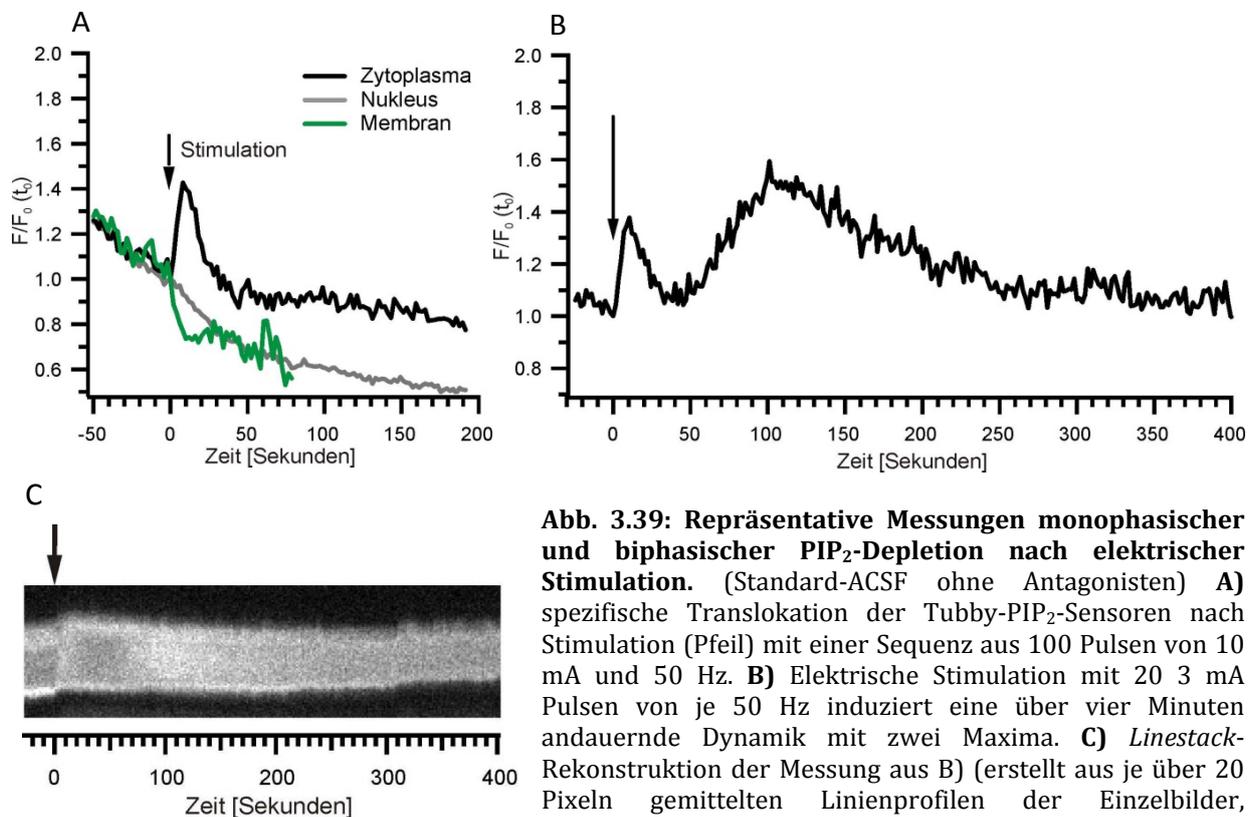


Abb. 3.39: Repräsentative Messungen monophasischer und biphasischer PIP_2 -Depletion nach elektrischer Stimulation. (Standard-ACSF ohne Antagonisten) **A)** spezifische Translokation der Tubby- PIP_2 -Sensoren nach Stimulation (Pfeil) mit einer Sequenz aus 100 Pulsen von 10 mA und 50 Hz. **B)** Elektrische Stimulation mit 20 3 mA Pulsen von je 50 Hz induziert eine über vier Minuten andauernde Dynamik mit zwei Maxima. **C)** *Linestack*-Rekonstruktion der Messung aus B) (erstellt aus je über 20 Pixeln gemittelten Linienprofilen der Einzelbilder, Kontrastverstärkung 0,4%).

Für die Stimulation wurden verschiedene Frequenzen und Stromstärken verwendet, um zu testen, ob diese Parameter einen Einfluss auf das Ausmaß der PIP_2 -Depletion haben. Eine PIP_2 -Depletion konnte dabei mit allen verwendeten Stimulusfrequenzen von 20 bis 50 Hz induziert werden. Einzelne Neurone reagierten unterschiedlich stark auf verschiedene Frequenzen oder zeigten eine Antwort erst bei Erhöhung der Frequenz, eine strikte Frequenzabhängigkeit kann jedoch mit den Daten nicht belegt werden. Abb. 3.40 A zeigt ein Beispiel eines Neurons, dessen Antworten keine Frequenzabhängigkeit der PIP_2 -Depletion

erkennen ließen. Wiederholte Stimuli mit unterschiedlichen Frequenzen von 20 bis 50 Hz induzieren hier jeweils eine PIP₂-Depletion mit ähnlicher Amplitude. Während die Frequenz also scheinbar nur einen geringen Einfluss auf die Effektivität der PIP₂-Depletion hatte, war ein merklicher Einfluss der Stromstärke auf das Ausmaß der PIP₂-Depletion festzustellen. Abb. 3.40 B veranschaulicht dies am Beispiel desselben Neurons, bei dem die Erhöhung der Stromstärke von 1 auf 10 mA eine deutlich stärkere PIP₂-Depletion bewirkte.

Wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, zeigen cholinerge *slow* EPSPs eine Desensibilisierung. Um die mit den PIP₂-Sonden gemessenen Effekte mit den Eigenschaften der *slow* EPSPs zu vergleichen, wurde die elektrische Stimulation daher auch in unterschiedlichen Abständen wiederholt. Im Unterschied zu den elektrophysiologisch gemessenen *slow* EPSPs konnte eine PIP₂-Depletion in relativ geringen Abständen (d.h. mit Intervallen von unter fünf Minuten) induziert werden, ohne dass eine deutliche Reduktion der Amplitude zu verzeichnen war. Abb. 3.40 C zeigt ein Beispiel einer solchen Messung.

Um zu testen, ob die beobachteten Effekte auf eine synaptische Transmission über den Transmitter Acetylcholin zurückzuführen sind, wurden Experimente mit dem muskarinischen Antagonisten Atropin durchgeführt. Vor der Applikation von Atropin wurde zunächst die Netzwerkaktivität im Hirnschnitt mit Antagonisten von iGlu- und GABA_{A/B}-Rezeptoren blockiert. Von diesen Rezeptoren ist keine direkte Koppelung an eine PIP₂-Hydrolyse bekannt. Erwartungsgemäß konnte in den Neuronen eine PIP₂-Depletion sowohl ohne als auch mit iGlu- und GABA_{A/B}-Rezeptorantagonisten ausgelöst werden (vgl. Abb. 3.40 B & C). Die Applikation von Rezeptorantagonisten und die Interpretation ihrer Wirkung wurde allerdings teilweise durch eine unzureichende Reproduzierbarkeit der Antworten und dem Bleichen der Fluoreszenz in aufeinanderfolgenden Zeitserien erschwert. Daher konnte eine Applikation des muskarinischen Antagonisten Atropin nur bei zwei Zellen mit reversibler PIP₂-Depletion durchgeführt werden. Bei den Neuronen handelt es sich um die Zellen aus Abb. A und B bzw. C und D. Eines dieser Neurone zeigte auch nach Zugabe von Atropin eine deutliche Reaktion auf die elektrische Stimulation (Abb. 3.40 B). Die Amplitude der PIP₂-Depletion ist allenfalls geringfügig verringert (9 und 23 Minuten Atropin). Demnach ist die bei diesem Neuron beobachtete PIP₂-Depletion nicht über mAChR-vermittelt. Auch bei dem zweiten Neuron zeigt die Auswertung der ROIs einen Anstieg der zytoplasmatischen Fluoreszenz während Applikation von Atropin an (D). Ein Anstieg der Fluoreszenz ist ansatzweise allerdings auch im ROI der Nukleusregion zu erkennen, was auf eine kleine laterale Bewegung des Gewebes zurückzuführen ist. Aufgrund der etwas weniger stabilen Messung ist daher nicht abschließend zu erklären, ob der gemessene Intensitätsanstieg gänzlich unspezifisch ist oder eine schwache Reaktion des Neurons durch

den Drift maskiert wird. Auf eine im Anschluss durchgeführte Applikation von Oxo-M zeigte das Neuron keine Reaktion (s. Abb.).

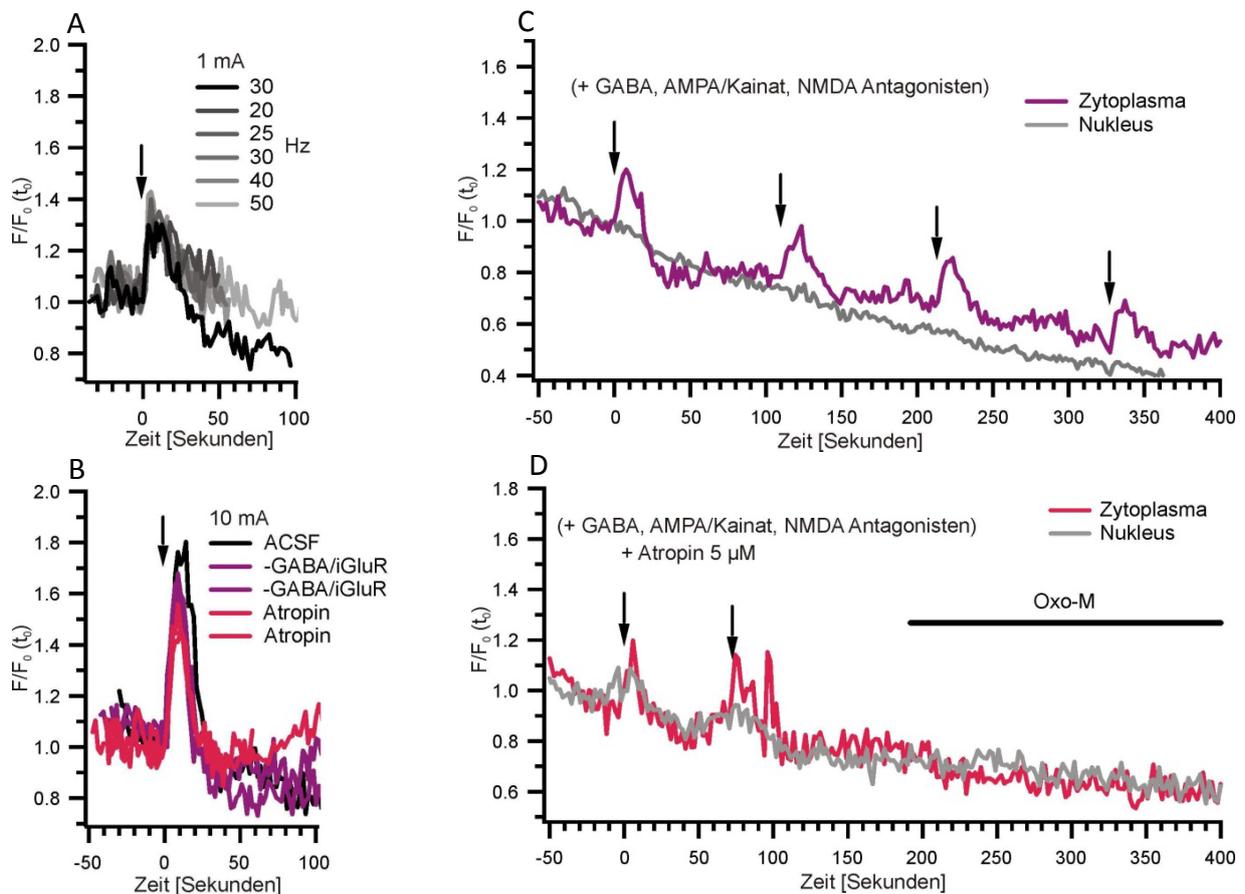


Abb. 3.40: Einfluss der Stimulationsparameter und von Rezeptorantagonisten auf die elektrisch induzierte PIP_2 -Depletion. **A)** Eine Variation der Stimulusfrequenz von 20 bis 50 Hz zeigt keinen Einfluss auf die PIP_2 -Depletion eines Neurons. **B)** Bei demselben Neuron induziert eine Erhöhung der Stromstärke eine stärkere PIP_2 -Depletion. Die Applikation von Atropin zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Reaktion des Neurons. **C)** Wiederholte Stimulationen (Pfeile; Sequenzen aus je 20 Pulsen von 3 mA) induzieren eine reproduzierbare PIP_2 -Depletion auch bei Stimulusintervallen unter 5 Minuten. **D)** Die Qualität der zweiten Messung des Neurons aus C lässt durch einen leichten Drift keine eindeutige Interpretation der Atropinwirkung zu. Unter Atropinwirkung zeigt die Zelle keine Reaktion auf Oxo-M.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass durch elektrische Stimulation im Bereich afferenter Fasern eine PIP_2 -Depletion in pyramidalen CA1-Neuronen möglich ist. Das Auftreten von zweiphasigen Antworten deutet an, dass auch eine synaptisch induzierte PIP_2 -Dynamik komplexere Verlaufsformen annehmen kann. Wiederholte Stimulationen mit unterschiedlichen Intervallen ergaben eine im Vergleich zu den elektrophysiologisch gemessenen *slow* EPSPs geringere Desensibilisierung der PIP_2 -Dynamik. Die Applikation des muskarinischen Antagonisten führte bei den so gemessenen Neuronen nicht zu einer Blockierung der PIP_2 -Depletion. Die durch elektrische Stimulation induzierte PIP_2 -Depletion konnte daher nicht auf eine cholinerge Transmission zurückgeführt werden.

3.6 Analyse pharmakologisch induzierter PIP₂-Dynamik in *Gyrus dentatus*-Körnerzellen

Wie bereits in Abschnitt 3.1.3 erwähnt, kam es vor allem in ventralen Hirnschnitten gelegentlich zu einer Infektion im Bereich des *Gyrus dentatus*. Die primären Neurone dieser Region sind die Körnerzellen, welche sich in ihrer Morphologie deutlich von den Pyramidenneuronen unterscheiden. Sie haben einen ovalen Zellkörper, an den sich ein konisch verlaufender Dendritenbaum und gegenüberliegend ein Axon anschließen. Immunhistochemische Daten mit spezifischen Antikörpern zeigen eine starke Expression von metabotropen Glutamat [u.a. Typ I mit mGluR1 und 5 (Shigemoto *et al.*, 1997)] und muskarinischen [insbesondere m₁ (Levey *et al.*, 1995)] Rezeptoren.

Sowohl die Rate (d.h. Häufigkeit, wenn Infektion im GD) als auch die Intensität der Sondenexpression war in diesen Neuronen im Vergleich zu den CA1-Neuronen hoch. Die starke Abgrenzung der Membranfluoreszenz gegen den Hintergrund ergab ein gutes Signal-zu-Rauschverhältnis und ein geringes Bleichen während der Messungen. Da sich die Dendriten der Körnerzellen ähnlich wie die basalen Dendriten der Pyramidenzellen stark aufzweigen und schnell an Durchmesser verlieren, konnten Messungen der PIP₂-Depletion in einem Bereich von Soma bis 10 µm im angrenzenden proximalen Bereich der Dendriten durchgeführt werden. Die Mehrzahl der Körnerzellen wurde mit der Tubby-Domäne gemessen. Abb. 3.41 A zeigt exemplarisch die Tubby-Expression von vier *Gyrus dentatus*-Körnerzellen und den Ansatz der Axone (Pfeile).

Während mindestens 95% der (CA1-) Pyramidenzellen eine Antwort auf die Applikation des muskarinischen Agonisten Oxo-M zeigten, reagierten nur 13 % (3 von 24) der Körnerzellen mit einer messbaren PIP₂-Depletion (Abb. 3.41 B, N1-3 aus drei separaten Experimenten/Tieren). Die Abb. C bis E zeigen die mAChR-induzierte Translokation der PIP₂-Sonden am Beispiel von Neuron 2. Keine der gemessenen Körnerzellen reagierte messbar auf die Applikation von Glutamat (100 µM) oder des mGluRI-Agonisten DHPG (10 µM), darunter auch zwei der Neurone mit einer Reaktion auf Oxo-M (Abb. 3.41 F). Bei Neuron 1 und 2 wurden wiederholte Oxo-M-Applikationen durchgeführt. Beide Neurone zeigten dabei eine Abschwächung der Antworten, grundsätzlich war die PIP₂-Depletion aber reproduzierbar (s. Abb. 3.41 G).

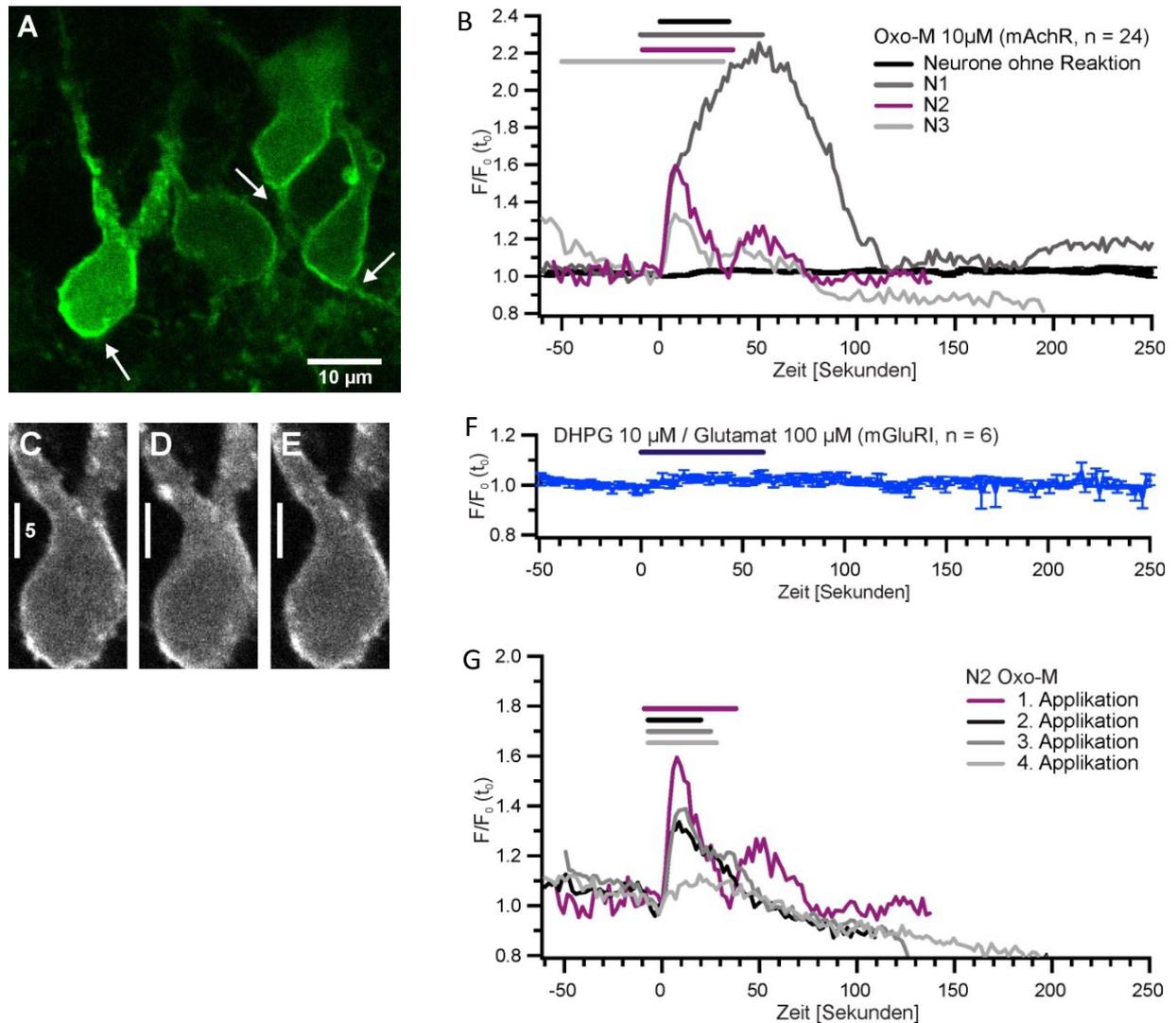


Abb. 3.41: PIP₂-Dynamik in *Gyrus dentatus*-Körnerzellen. A) Konfokalmikroskopische Aufnahme einer Gruppe *Gyrus dentatus*-Neurone mit Expression der Tubby-Sonde. Die Pfeile deuten auf den Anfang der Axone. **B)** Nur drei von n = 24 Körnerzellen zeigen eine mAChR-induzierte PIP₂-Depletion. Die 21 Neurone ohne Reaktion wurden gemittelt. (Balken $\hat{=}$ Zeitpunkt der Applikation). **C-E)** Originalaufnahmen einer Zeitserie von Neuron 2 (= linkes Neuron in A, 1% Kontrastverstärkung). C) Ruhebedingungen. D) mAChR-induzierte PIP₂-Depletion. E) Regeneration. **F)** Applikation des mGluRI-Agonisten DHPG (10 μM) und/oder von Glutamat (100 μM) induziert keine messbare PIP₂-Depletion (n = 6 inklusive Neuron 1 und 2). **G)** Wiederholte mAChR-induzierte PIP₂-Depletion am Beispiel von Neuron 2.

4 Diskussion

Änderungen der Konzentration des Phospholipids PIP₂ beeinflussen *in vitro* die Aktivität und Lokalisation einer Vielzahl von Proteinen. Die Dynamik der PIP₂-Konzentration in nativen Zellen ist allerdings weitgehend unbekannt. Folglich ist noch nicht endgültig geklärt, inwiefern es sich bei der Depletion von PIP₂ um einen physiologischen Prozess handelt. Um die Funktion von PIP₂ in der Regulation zellulärer Prozesse zu verstehen, ist eine Kenntnis der putativen PIP₂-Dynamik in nativen Zellen daher eine wesentliche Voraussetzung. In dieser Arbeit wurde die PIP₂-Dynamik in CA1-Pyramidenneuronen *in situ* (in akuten hippocampalen Hirnschnitten) untersucht. Von den in diesen Neuronen exprimierten m₁-Acetylcholinrezeptoren ist bekannt, dass sie in heterologen Expressionssystemen und isolierten Neuronen eine PIP₂-Dynamik induzieren können. Die Diskussion der Daten orientiert sich an den wesentlichen Fragestellungen dieser Arbeit: *1. Ist die Depletion von PIP₂ ein physiologischer Prozess? 2. Welche Bedeutung haben Amplitude und Kinetik der beobachteten PIP₂-Depletion für die Signaltransmission bzw. Elektrophysiologie der Neurone? 3. Was kann man aus der beobachteten PIP₂-Dynamik über die Regulation von PIP₂ in den Pyramidenneuronen schließen? 4. Wie universell ist die Depletion von PIP₂ durch Gα_q-gekoppelte Rezeptoren?* Im 5. Abschnitt schließt sich eine Diskussion über die Verwendung der Tubby vs. der PH-Domäne als PIP₂-Sensor an. Im 6. Abschnitt folgt schließlich ein Ausblick auf weitere Forschungen zur PIP₂-Dynamik in Neuronen.

4.1 Ist die Depletion von PIP₂ ein physiologischer Prozess?

4.1.1 Können Gα_q-gekoppelte Rezeptoren eine PIP₂-Depletion in nativen Neuronen induzieren?

Abgesehen von einigen Netzwerkeingängen und Axonen, die während einer Hirnschnittpräparation abgeschnitten werden, bleiben CA1-Pyramidenneurone im Hirnschnitt weitgehend intakt. Die Neurone bleiben in das Gewebe eingebettet, sind dem Alter der Tiere entsprechend voll entwickelt und haben eine dementsprechende Genexpression. Folglich handelt es sich bei hippocampalen Hirnschnitten zwar immer noch um eine *in vitro*-Situation, die Neurone sind aber als weitgehend nativ zu bezeichnen.

Die vorliegenden Daten der CA1-Pyramidenneurone zeigen eine robuste PIP₂-Depletion nach pharmakologischer Aktivierung von mACh- bzw. m₁-like-Rezeptoren. Die Daten bestätigen damit die Ergebnisse aus Messungen von isolierten hippocampalen Neuronen (Nelson *et al.*, 2008). Ein direkter Vergleich der Amplituden ist aufgrund der Messung der relativen Fluoreszenzänderung nur schwer möglich, wobei auch Nelson *et al.* eine robuste mAChR-induzierte PIP₂-Depletion nach Applikation des Agonisten Metacholin (100 μM) beschreiben. Im Gegensatz zu Messungen in heterologen Expressionssystemen, in denen die Tubby-Domäne nach PLC-Aktivierung oft nur schwach von der Membran dissoziiert (Quinn *et al.*, 2008; Szentpetery *et al.*, 2009), zeigen in den hippocampalen Pyramidenneuronen sowohl PH- als auch Tubby-Domäne eine starke Translokation. Die hier vorliegenden Daten zeigen folglich nicht nur, dass eine Gα_q-induzierte Depletion von PIP₂ *in situ* möglich ist, sondern deuten auch darauf hin, dass physiologische Bedingungen eine PIP₂-Depletion in den Pyramidenneuronen begünstigen.

Neben der mAChR-induzierten PIP₂-Depletion konnte in dieser Arbeit auch eine mGluRI-induzierte PIP₂-Depletion nachgewiesen werden. Die Tubby-PIP₂-Sonden zeigten auch hier eine robuste Translokation, wenn auch mit einer signifikant geringeren Amplitude als nach mAChR-Aktivierung. Die mGluRI-induzierte PIP₂-Depletion belegt, dass eine neuronale Reduktion der PIP₂-Level durch unterschiedliche Gα_q-gekoppelte Rezeptoren bewirkt werden kann. Dies ist insofern ein wichtiges Ergebnis, als dass in isolierten sympathischen Neuronen zwar eine deutliche PIP₂-Depletion durch mAChR, aber nur eine schwache PIP₂-Depletion durch Bradykinin- (und aufgrund von Ähnlichkeiten der Signaltransduktion P2Y₁-) Rezeptoren nachgewiesen werden konnte (Zaika *et al.*, 2007, 2011; Hughes *et al.*, 2007).

4.1.2 Ist eine PIP₂-Depletion synaptisch induzierbar?

In dieser Arbeit wurde die Depletion von PIP₂ in den CA1-Pyramidenneuronen zunächst mit Hilfe rezeptorspezifischer Agonisten induziert. Mit dieser Vorgehensweise konnte getestet werden, über welche der untersuchten Rezeptoren eine PIP₂-Depletion prinzipiell möglich ist. Es ist allerdings anzunehmen, dass eine physiologische Aktivierung der Rezeptoren über eine endogene Transmitterausschüttung eine geringere PIP₂-Depletion induziert. Ein Rezeptor, der nach pharmakologischer Aktivierung nur eine schwache PIP₂-Depletion auslöst, wird diese unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich nie erreichen. Die effektive PIP₂-Depletion *in vivo* wird also potentiell überschätzt.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass auch eine elektrische Stimulation des Gewebes im Bereich afferenter Fasern eine Translokation der Tubby-Domäne und folglich eine PIP₂-Depletion bewirken kann. Als zentrales Modell diente die Aktivierung muskarinischer Rezeptoren durch Acetylcholin, dessen Ausschüttung durch die Anregung septohippocampaler Fasern erzielt werden sollte. Während die in elektrophysiologischen Experimenten induzierten langsamen EPSPs erfolgreich mit dem mAChR-Antagonisten Atropin blockiert werden konnten, war dies bei der optisch gemessenen PIP₂-Depletion nicht der Fall. Die Pharmakologie der durch elektrische Stimulation induzierten PIP₂-Depletion bleibt also ungeklärt. Es kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass eine direkte elektrische Stimulation der Neurone ohne synaptische Aktivität für die PIP₂-Depletion verantwortlich ist. Ein möglicher Mechanismus wäre die Aktivierung von PLC durch Ca²⁺-Einstrom über spannungssensitive Ionenkanäle. Allerdings zeigen Daten von Billups *et al.* (2006), dass zumindest in Neuroblastoma-SH-SY5Y-Zellen und Körnerzellen des Cerebellums eine reine Depolarisation um 120 mV ohne gleichzeitige GPCR-Aktivierung keine Translokation der PH-Domäne induziert. Für CA1-Pyramidenneurone und die Tubby-Domäne muss dies noch überprüft werden.

Die wahrscheinlichere Ursache der hier beobachteten PIP₂-Depletion ist eine synaptische Aktivierung G_α_q-gekoppelter Rezeptoren. Da die Applikation von Atropin nur bei zwei Zellen durchgeführt werden konnte, kann die bei anderen Zellen gemessene PIP₂-Depletion durchaus auf mAChR-Rezeptoren zurückzuführen sein. Darüber hinaus könnte die Aktivierung von mGluRI-Rezeptoren die Grundlage der putativ synaptisch induzierten PIP₂-Dynamik darstellen, denn die elektrische Stimulation unterscheidet nur bedingt zwischen verschiedenen Fasern. Wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, erhält die CA1-Region eine große Zahl glutamaterger Eingänge insbesondere aus anderen Regionen des Hippocampus (u.a. Schaffer-Kollaterale). Diese sind durch elektrische Stimulation leichter anzuregen als cholinerge Fasern und führen somit auch zur Ausschüttung von Glutamat (die ionotropen Effekte der glutamatergen Transmission wurden in dieser Arbeit durch Antagonisten blockiert, s. Abschnitt 3.5.1). Die Aktivierung von mGluRI würde die fehlende Blockierung der PIP₂-Depletion durch Atropin erklären.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass eine Depletion von PIP₂ sehr wahrscheinlich synaptisch induziert werden kann. Damit unterstützen die Daten eine physiologische Funktion der PIP₂-Dynamik.

4.2 Welche Bedeutung haben Amplitude und Kinetik der beobachteten PIP₂-Depletion für die Signaltransmission bzw. Elektrophysiologie der Neurone?

4.2.1 Mittlerer Verlauf und Oszillationen der pharmakologisch induzierten PIP₂-Dynamik

Hintergrund der Erforschung G α_q -induzierter PIP₂-Konzentrationsänderungen in Neuronen ist die mutmaßliche PIP₂-vermittelte Regulation von Ionenkanälen und damit der elektrischen Erregbarkeit. Die vorliegenden Daten erlauben erstmals eine Korrelation der PIP₂-Dynamik mit der Elektrophysiologie *in situ*.

Die Applikation der mAChR- und mGluRI-Agonisten Oxo-M und DHPG induziert in den CA1-Pyramidenneuronen eine robuste PIP₂-Depletion. In den elektrophysiologischen Messungen zeigten die Neurone eine robuste Depolarisation und Steigerung der AP-Frequenz. Die vorliegenden Daten zeigen darüber hinaus eindeutig eine PIP₂-Oszillation nach Aktivierung G α_q -gekoppelter Rezeptoren. Auch in den elektrophysiologischen Messungen zeigten die Neurone während der Applikation der Agonisten Hyperpolarisationen bzw. Schwankungen von Membranpotential und AP-Frequenz. Ein Vergleich mit den elektrophysiologischen Daten deutet folglich auf eine gute Korrelation einer PIP₂-Depletion mit einer Depolarisation (bzw. Erhöhung der AP-Frequenz) und einer PIP₂-Regeneration mit einer Hyperpolarisation (bzw. Reduktion der AP-Frequenz) hin. Die PIP₂-Dynamik könnte über eine Inhibition bzw. Disinhibition von Ionenkanälen den elektrischen Tonus der Neurone beeinflussen. Wenn z.B. ein sonst aktiver K⁺-Kanal durch die PIP₂-Depletion inhibiert wird (wie z.B. für KCNQ-Kanäle angenommen), begünstigt dies eine Depolarisation bzw. Steigerung der AP-Frequenz. Wenn PIP₂ und infolge dessen der K⁺-Strom wieder regeneriert wird (Disinhibition des Kanals), kann dies zu einer Hyperpolarisation bzw. Frequenzsenkung führen. Die Koppelung von PIP₂-Konzentration und Elektrophysiologie wird umso effektiver sein, desto mehr (unterschiedliche) Kanäle auf diese Weise reguliert werden. Die Konsequenz einer oszillierenden Regulation von Ionenkanälen könnte eine zeitlich veränderliche Frequenzmodulation sein. Sowohl mGluRI- als auch m₁-like-Agonisten können z.B. abhängig von der Stimulusstärke Gamma- und Theta-Oszillationen (bezogen auf die AP-Frequenz) induzieren. Dabei können Theta-Oszillationen von Phasen geringerer Aktivität unterbrochen sein (Cobb *et al.*, 2000). Möglicherweise können GPCR-induzierte PIP₂-Oszillationen an einer solchen Modulation mitwirken.

Ein phasisch-tonischer Verlauf der PIP₂-Dynamik könnte sich ebenfalls in einer zeitlichen Modulation von Ionenkanälen widerspiegeln. Der Effekt der partiellen PIP₂-Regeneration auf die Ionenkanäle hängt hier im Vergleich zu einer vollständigen Depletion bzw. Regeneration besonders stark von deren Affinität ab. Ein Ionenkanal mit einer sehr niedrigen Affinität wird voraussichtlich auf die gesamte Dauer der PIP₂-Depletion reagieren. Die Aktivität eines Ionenkanals mit einer etwas höheren Affinität könnte dagegen unter Umständen nur durch die anfänglich sehr hohe PIP₂-Reduktion beeinflusst werden und sich im Rahmen der partiellen PIP₂-Regeneration wieder stabilisieren. Eine dementsprechende Desensibilisierung der Inhibition von K_{IR}- und K_V-Strömen infolge einer PIP₂-Neusynthese scheint in die Adaptation von Geschmacksrezeptoren für Koffein involviert zu sein (Zhao & Herness, 2009).

4.2.2 Korrelation von synaptisch induzierter PIP₂-Dynamik und Elektrophysiologie

Ein Vergleich des zeitlichen Verlaufs der durch elektrische Stimulation induzierten PIP₂-Dynamik und *slow*-EPSPs zeigt, dass die Latenzzeit von beiden Antworten durchaus übereinstimmt. Die maximale Latenzzeit beträgt in der Elektrophysiologie weniger als 2 Sekunden nach Beginn der Stimulussequenz, was in der Größenordnung der optischen Scanintervalle und Latenzzeit der PIP₂-Depletion liegt. Die Kinetik der elektrisch stimulierten PIP₂-Depletion korreliert allerdings nicht mit der Depolarisation eines cholinergen *slow*-EPSPs. Das Maximum der PIP₂-Depletion wird erst nach etwa 7 s erreicht und ist damit gegenüber dem Membranpotential verspätet. Während die Amplitude des *slow*-EPSP schon nach wenigen Sekunden deutlich abfällt, erreicht die Lokalisation der Sonden insgesamt erst nach durchschnittlich 79 s eine Regeneration. Die Dauer von cholinergen *slow*-EPSPs wird in der Literatur (Morton & Davies, 1997) mit 10 bis 50 s angegeben. Allerdings könnte der Verlauf der PIP₂-Depletion mit einer Regulation der Kanäle übereinstimmen, welche für die Frequenzadaptation verantwortlich sind. Die Aktivierung muskarinischer Rezeptoren kann bei unterschwelligen Reizen, die kein langsames EPSP induzieren, bereits eine Modulation der elektrischen Erregbarkeit bzw. der Inhibition der AP-Frequenzadaptation bewirken (Cole & Nicoll, 1983; Madison *et al.*, 1987). Diese Effekte können auch über die Dauer des markanten *slow*-EPSP hinaus andauern (Cole & Nicoll, 1984) und die zugrunde liegenden Ströme korrelieren nicht mit der Depolarisation (Madison *et al.*, 1987). Die Korrelation der wahrscheinlich synaptisch induzierten PIP₂-

Dynamik mit der Frequenzadaptation wäre u.a. im Einklang mit einer Inhibition von I_M (Brown & Passmore, 2009).

Für die Aktivierung von mGluRI als Grundlage der putativ synaptisch induzierten PIP_2 -Depletion spricht neben der fehlenden Blockierung durch Atropin auch, dass die PIP_2 -Depletion bei einigen Zellen in relativ kurzen Zeitabständen wiederholt induziert werden konnte. Wie bereits erwähnt (u.a. Abschnitt 3.5.1), zeigen *slow*-EPSPs bzw. mACh-Rezeptoren über einen Zeitraum von 5-10 Minuten eine merkliche Desensibilisierung (Cole & Nicoll, 1984; Willets *et al.*, 2004). Dagegen können langsame mGluR-induzierte EPSPs durch elektrische Stimulation in kürzeren Abständen von 30 bis 60 s generiert werden (Gerber *et al.*, 1993). Dies würde auch mit der weniger deutlichen Desensibilisierung der PIP_2 -Depletion bei pharmakologischer Aktivierung von mGluI- und mACh-Rezeptoren übereinstimmen.

Die in einigen Neuronen nach elektrischen Stimulationen aufgetretene transiente Regeneration des PIP_2 lässt darauf schließen, dass PIP_2 -Oszillationen nicht nur nach pharmakologischer, sondern auch synaptischer Aktivierung von $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptoren auftreten können. Die Frequenz der in dieser Arbeit gemessenen PIP_2 -Oszillationen war kleiner als 1 Hz. Soweit mir bekannt ist, wurden derartige Oszillationen des Membranpotentials nach elektrischer Stimulation cholinerg Fasern zwar in hippocampalen Interneuronen (Widmer *et al.*, 2006), aber nicht in Pyramidenneuronen beobachtet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch in einzelnen Interneuronen eine mAChR-induzierte PIP_2 -Depletion gemessen (nicht gezeigt). Davon ausgehend, dass eine synaptische PIP_2 -Depletion in Pyramidenneuronen vor allem eine Frequenzmodulation bewirkt, müssen PIP_2 -Oszillationen sich aber in Pyramidenneuronen nicht zwingend in Änderungen des Membranpotentials äußern.

4.2.3 Mögliche Grundlagen einer rezeptorspezifischen Regulation

GPCR-gekoppelter Effektoren über PIP_2

Wie in Abschnitt 1.1.3 kurz angeführt, gibt es bislang noch keine allgemein akzeptierte Erklärung für eine rezeptorspezifische PIP_2 -Regulation von Proteinen. In den CA1-Pyramidenneuronen war der deutlichste Unterschied zwischen mAChR- und mGluRI-induzierter PIP_2 -Depletion in den Amplituden zu beobachten. Diese unterschiedliche Amplitude könnte in Abhängigkeit der PIP_2 -Affinität eines gegebenen Effektors (z.B. Ionenkanals) eine spezifische Regulation dessen Funktion bewirken. Ein Effektor dessen Regulation primär von PIP_2 abhängt, könnte ausschließlich oder stärker von mAChR

reguliert werden, falls die mGluRI-induzierte Depletion nicht bereits maximal effektiv ist. Eine weitere Variante wäre, dass die Bedeutung der PIP₂-Wirkung bei den Rezeptoren eine andere Gewichtung erfährt. So könnte die Modulation der PIP₂-Affinität oder die Einbeziehung einer zusätzlichen Regulation bei mGluI-Rezeptoren eine stärkere Bedeutung haben. Beide Rezeptoren könnten im Endeffekt dasselbe Resultat bewirken, dabei aber unterschiedliche Mechanismen verwenden. So kann z.B. I_M in hippocampalen Pyramidenneuronen sowohl über mAChR (Brown & Adams, 1980) als auch mGluRI (Charpak *et al.*, 1990) inhibiert werden. Im Falle der mAChR-Wirkung konnte (in tsA-Zellen, Oozyten, SCG-Neuronen und Primärkulturen hippocampaler Neurone) gezeigt werden, dass die Inhibition primär über die Depletion von PIP₂ erfolgt (Suh & Hille, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2005). In SGC-Neuronen kann I_M außer über mAChR u.a. auch über Bradykinin inhibiert werden. Da die PIP₂-Konzentration in diesen Neuronen durch Bradykinin nicht stark reduziert wird (Gamper *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2007), geht man hier von einer Inhibition von I_M über Ca²⁺ und Calmodulin aus (Delmas *et al.*, 2002; Gamper & Shapiro, 2003; Winks *et al.*, 2005). Es wäre möglich, dass auch die mGluRI-induzierte Inhibition von I_M in Pyramidenneuronen aufgrund der geringeren Depletion nicht im gleichen Ausmaß über PIP₂ erreicht werden kann wie bei mAChR-Aktivierung.

Neben einem rezeptorabhängigen Grad der Reduktion der PIP₂-Konzentration ist ein weiterer Mechanismus in der Literatur bereits diskutiert worden: eine lokale Begrenzung der PIP₂-Depletion. Demnach würde ein Ionenkanal z.B. dann nicht von der PIP₂-Depletion eines Rezeptors reguliert, wenn der Kanal sich außerhalb der unmittelbaren Umgebung des Rezeptors bzw. dessen Membrandomäne befindet (also in einer auf wenige nm beschränkten Organisationseinheit bzw. Lipidinsel, auch „Raft“ genannt). In den CA1-Pyramidenneuronen zeigt aber sowohl die mAChR- als auch die mGluRI-induzierte PIP₂-Depletion einen stark „globalen“ Charakter (vgl. a. Abschnitt 4.3.2). Es erscheint daher sehr unwahrscheinlich, dass bei den beiden Rezeptoren eine Spezifität über eine lokale Begrenzung erreicht wird. Insbesondere wenn dies mit einer pharmakologischen Aktivierung der Rezeptoren getestet wird. Das eher globale bzw. homogene Muster der PIP₂ Dynamik kann allerdings eine Eigenschaft von Pyramidenneuronen und auf deren Funktion abgestimmt sein.

Neben der Amplitude der mAChR- und mGluRI-induzierten Dynamik sind weitere Unterschiede, die zu einer differenzierten PIP₂-abhängigen Regulation von Effektoren beitragen könnten: das Verhältnis von somatischer zu dendritischer PIP₂-Depletion, die Desensitisierung und die Frequenz bzw. Regulation von PIP₂-Oszillationen.

4.3 Was kann man aus der Beobachteten PIP₂-Dynamik über die Regulation von PIP₂ in den Pyramidenneuronen schließen?

4.3.1 Dynamik der PIP₂-Regulation während der Aktivierung von Gα_q-Rezeptoren

Die Ausprägung der in dieser Arbeit beobachteten PIP₂-Oszillationen zeigt eindrucksvoll, dass die Neurone in Anwesenheit der Agonisten zu einer sehr raschen und vollständigen Regeneration der PIP₂-Konzentration in der Lage sind. Die Kinetik der Regeneration ist ein starkes Indiz dafür, dass hier aktive Rückkoppelungsmechanismen beteiligt sind, welche die PIP₂-Neusynthese verstärken. Auch ein phasisch-tonischer Verlauf der PIP₂-Dynamik erfordert eine partielle PIP₂-Regeneration. Eine Steigerung der PIP₂-Synthese bei m₁/m₃-Rezeptoraktivierung wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen in Erwägung gezogen. Ein Hintergrund der Überlegungen war die Frage, wie bei längerer Rezeptoraktivierung die IP₃-Produktion aufrecht erhalten werden kann (Willars *et al.*, 1998). Zudem stellten Falkenburger *et al.* (2010) bei dem Vergleich von Modellrechnungen der PIP₂-vermittelten Kanalregulation mit gemessenen K_v-Strömen fest, dass eine schwache PLC-Aktivierung die Ströme schwächer inhibiert als erwartet. Die Einbeziehung einer deutlich gesteigerten PIP₂-Synthese in die Modellrechnungen konnte diese Diskrepanz zwischen Modell und Realität korrigieren.

Ein möglicher Mechanismus der Synthesestimulation könnte in einer Rückkoppelung durch die GPCR-induzierte Freisetzung des Second-Messengers Ca²⁺ bestehen (Gamper *et al.*, 2004; Zaika *et al.*, 2007; Falkenburger *et al.*, 2010; Kwiatkowska, 2010). In CA1-Pyramidenneuronen können Ca²⁺-Wellen während Aktivierung von mGluRI oder muskarinischen Rezeptoren eine Ca²⁺-Konzentration von mehr als 3 μM erreichen (Nakamura 2000). Auch die Aktivierung sog. kleiner GTPasen kann die PIP₂-Synthese stimulieren, in dem sie PIP5Ks zur Membran rekrutieren und in ihrer Aktiviert regulieren (Dutt *et al.*, 2002; Santarius *et al.*, 2006; Di Paolo & De Camilli, 2006; Kanaho & Unoki, 2012). Daneben wurde eine Potenzierung der enzymatischen Aktivität durch eine Depolarisation des Membranpotentials sowohl von PI4Ks (Chen *et al.*, 2011) als auch PIP5Ks berichtet [u.a. in hippocampalen Neuronen (Di Paolo *et al.*, 2004; Nakano-Kobayashi *et al.*, 2007; Kanaho *et al.*, 2008; Kanaho & Unoki, 2012)].

Die allgemein robuste mAChR- und mGluRI-induzierte PIP₂-Depletion und die Kinetik des erneuten PIP₂-Abfalls während der Oszillationen lassen darauf schließen, dass in den

Neuronen auch die PIP₂-Hydrolyse einer positiven Rückkopplung unterliegt. Sowohl Ca²⁺ als auch kleine GTPasen können neben der Synthese auch die Depletion von PIP₂ durch PLC verstärken (Übersicht: Horowitz *et al.*, 2005; Oude Weernink *et al.*, 2007; Fukami *et al.*, 2010). Die kürzliche Entdeckung besonders Ca²⁺-empfindlicher PLC-Isoformen in Neuronen lässt vermuten, dass der GPCR-induzierte Ca²⁺-Anstieg neben der Aktivitätssteigerung von PLCβ zusätzliche PLC-Isoformen rekrutieren kann. So zeigt die in (u.a. CA1-Pyramiden-) Neuronen exprimierte PLCη (Hwang *et al.*, 2005; Nakahara *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005) eine maximale Aktivität bei 1 μM Ca²⁺ und kann aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit wahrscheinlich alleine durch einen physiologischen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration aktiviert werden (Nakahara *et al.*, 2005; Fukami *et al.*, 2010).

Als Taktgeber GPCR-induzierter Oszillationen von PIP₂, DAG, IP₃ und Ca²⁺ kommen sowohl wiederholte De- und Resensitisierung der GPCRs als auch Schwankungen der Ca²⁺-Konzentration durch Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung oder das wiederholte Wiederauffüllen der Ca²⁺-Speicher in Frage (Nash *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2003; Nahorski *et al.*, 2003; Bartlett *et al.*, 2005; Atkinson *et al.*, 2006; Übersicht: Berridge, 2009). Die zur Auffüllung entleerter Ca²⁺-Speicher benötigte Zeit wird in CA1-Pyramidenneuronen auf 20 bis 60 s geschätzt (Nakamura *et al.*, 2000; Garaschuk *et al.*, 2006). Dies würde in etwa auf die Intervallzeiten der mGluRI- und der schnelleren mAChR-induzierten Oszillationen zutreffen.

4.3.2 Grundlagen der unterschiedlichen PIP₂-Depletion bei mGluRI und mAChR

Den Ergebnissen der Messungen mit 100 μM DHPG zufolge hat eine Erhöhung der Konzentration wahrscheinlich keinen entscheidenden Einfluss auf die gegenüber mAChR niedrigere Amplitude der mGluRI-induzierten PIP₂-Depletion. Unter Berücksichtigung der Affinitäten (Tabelle 1.1) sollte eine Agonistenkonzentration von je 10 μM eine vergleichbare Aktivierung der Rezeptoren bewirken. Das vereinzelte Auftreten von starken mGluRI-induzierten PIP₂-Depletionen mit Oxo-M-ähnlichen Amplituden zeigt, dass die PIP₂-Depletion auch unabhängig von der Agonistenkonzentration höher ausfallen kann. Die starke Steigerung der Amplitude bei einem Neuron in einer wiederholten Applikation lässt auch vermuten, dass das Ausmaß der PIP₂-Depletion potentiell noch steigerungsfähig ist und innerhalb kurzer Zeit (ca. 20 min) reguliert werden kann.

Die geringere mGluRI-Amplitude am Soma ist wahrscheinlich mit einer geringeren Rezeptordichte im Vergleich zu mAChR zu erklären. Der in CA1 am stärksten exprimierte

mGlu-Rezeptor mGlu₅ hat am Soma eine deutlich geringere Dichte als an den Dendriten (Shigemoto *et al.*, 1997), während m₁-Rezeptoren auch am Soma eine hohe Dichte haben (Levey *et al.*, 1995). Hier wird gleichzeitig ein Widerspruch deutlich, denn die gemessene Amplitude der mGluRI-induzierten PIP₂-Depletion war in den Dendriten geringer. Dieses Verhalten impliziert, dass das Muster der PIP₂-Depletion einzelner Rezeptoren nicht mit deren Verteilung korreliert. Denn auch, wenn man mit den verwendeten Sonden nicht erkennen kann, wo genau das PIP₂ gespalten wurde, steht doch eine recht homogene und deutliche Sondentranslokation im Soma einer vergleichsweise geringen Rezeptordichte gegenüber. Eine ähnliche Beobachtung machten Nakamura *et al.* (2000), als sie den Verlauf von Ca²⁺-Wellen in CA1-Pyramidenneuronen während pharmakologischer Aktivierung von Gα_q-gekoppelten Rezeptoren beobachteten. Hier hatten Ca²⁺-Wellen bei Applikation von mGluRI-, mAChR- und 5-HT₂R-Agonisten das gleiche Muster, obwohl die Rezeptoren nicht gleich verteilt sind. Die Neurone scheinen also über Mechanismen zu verfügen, die der Signaltransduktion über Gα_q-gekoppelte Rezeptoren einen „globalen“ Charakter geben. Für die mGluRI-induzierte PIP₂-Dynamik bedeutet dies, dass die Neurone die relativ geringe Dichte der Rezeptoren am Soma ausgleichen können und unter diesen Umständen eine beachtliche Reduktion der PIP₂-Konzentration erreichen. Die in Relation hohe PIP₂-Depletion am Soma könnte durch eine sehr effektive Koppelung der Signalkaskade und einer hohen Verfügbarkeit von Amplifikationsmechanismen erzielt werden. Von mGlu-Rezeptoren ist bekannt, dass sie u.a. mit Homer-Proteinen assoziiert sind (Übersicht: Nicoletti *et al.*, 2009), welche an der Rezeptorganisation und der physikalischen Verbindung von mGluI- mit IP₃-Rezeptoren an Postsynapsen beteiligt sind (Tu *et al.*, 1998). Eine Amplifikation und Globalisierung des Signals könnte daneben über die bereits in Abschnitt 4.3.1 angesprochenen Mechanismen erreicht werden.

Eine in Relation zu mAChR gesteigerte PIP₂-Synthese infolge der mGluRI-Aktivierung als Ursache der unterschiedlichen Amplitude ist zwar prinzipiell möglich, erscheint aber aufgrund der markanten Differenzen in der Rezeptorverteilung (zumindest im Soma) unwahrscheinlich.

4.4 Wie universell ist die Depletion von PIP₂ durch Gα_q-gekoppelte Rezeptoren?

4.4.1 Signaltransduktion von Rezeptoren, bei denen keine PIP₂-Dynamik beobachtet wurde

Die Aktivierung von PLC mit der Hydrolyse von PIP₂ und Bildung der Second-Messenger IP₃ und DAG ist der Hauptsignaltransduktionsweg Gα_q-gekoppelter Rezeptoren. Es ist allerdings noch nicht geklärt, wie rezeptorübergreifend die aus der Hydrolyse potentiell resultierende Depletion von PIP₂ ist. In dieser Arbeit wurden daher anhand von Informationen zur Rezeptorexpression in CA1-Pyramidenneuronen verschiedene Gα_q-gekoppelte Rezeptoren auf eine PIP₂-Depletion getestet. Für α_{1A}-Adrenorezeptor, Bradykinin, Dopamin_{D1-like}, Histamin-H₁, P2Y₁ und 5-HT_{2A/2C} konnte keine signifikante PIP₂-Depletion in CA1-Pyramidenneuronen nachgewiesen werden. Zwar induzieren die Rezeptoren möglicherweise eine PIP₂-Hydrolyse. Anhand der fehlenden Translokation beider Sonden kann aber mit einiger Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die betroffenen Rezeptoren im Soma und den proximalen Dendriten sowie den distalen apikalen Hauptdendriten keine Depletion bewirken. Es kann zwar nicht ganz ausgeschlossen werden, dass eine sehr geringe Reduktion der PIP₂-Level von den Sonden aufgrund ihrer PIP₂-Affinität nicht angezeigt wird. Jedoch wäre in einem solchen Fall auch fraglich, ob und für welche Effektoren eine solche Reduktion physiologisch relevant wäre. Voraussetzung für eine extrem hohe Empfindlichkeit eines Effektors wäre eine sehr niedrige PIP₂-Affinität, die im Umkehrschluss allerdings auch hinderlich für eine stabile Interaktion mit PIP₂ unter Ruhebedingungen sein könnte.

Es ist durchaus möglich, dass bei Aktivierung der „ineffektiven“ Rezeptoren eine PIP₂-Depletion in den schmalen bzw. distalen Dendriten oder in Spines stattfindet. Aufgrund der optischen Auflösungsgrenze des Mikroskops konnten hier keine Messungen durchgeführt werden. Gegen eine stark lokale Begrenzung der Signaltransduktion bzw. PIP₂-Depletion spricht, dass aufgrund der Verteilung der innervierenden Axone im Vergleich zu den Rezeptoren bei quasi allen der hier untersuchten Transmittersystemen von einer mindestens anteiligen Volumentransmission ausgegangen wird [explizit Neuropeptide, Noradrenalin, Serotonin, Dopamin, Acetylcholin, Glutamat (Herkenham, 1987)]. Dabei sind Axonendigung und Rezeptor nicht in direkter Nachbarschaft, was eine Diffusion des Liganden zum Rezeptor erfordert und in einer recht weitläufigen extrasynaptischen

Transmission resultiert, die nicht auf das Hauptinnervationsgebiet der Afferenzen beschränkt ist.

Bei den Rezeptoren ohne PIP₂-Depletion ist anzunehmen, dass Sie ihre Wirkung nicht über eine PIP₂-Depletion entfalten, sondern ausschließlich über die G-Proteine und die gebildeten Second-Messenger. Dabei wäre aufgrund der Belege einer Rezeptoraktivierung aus Literatur und elektrophysiologischen Ergebnissen durchaus eine PIP₂-Depletion zu vermuten gewesen, so z.B. bei „atypischen Dopamin_{D1-like}“, P2Y₁- und 5-HT_{2A/C}- Rezeptoren. Im Hinblick auf eine ineffektive PIP₂-Depletion infolge der Aktivierung von „atypischen D_{1-like}“ Rezeptoren fällt auf, dass Daten zum Verlauf der Ca²⁺-Konzentration nach Applikation des Agonisten SKF 83959 bei hippocampalen Primärkulturen (Ming *et al.*, 2006) einen sehr langsam (2-3 Min) und graduell einsetzenden Anstieg der Ca²⁺-Konzentration zeigen. Dies lässt auf eine konstante, aber schwache Aktivierung der PLC während der Applikation des Agonisten schließen. Da Pyramidenneurone zu einer beträchtlichen Synthese von PIP₂ während der Aktivierung von Gα_q-Rezeptoren in der Lage sind (Abschnitt 4.3.1), ist die dopaminerge PIP₂-Hydrolyse wahrscheinlich nicht stark genug um die Konzentration zu reduzieren.

Ähnlich verhält es sich möglicherweise mit der Aktivierung von P2Y₁-Rezeptoren. Während durch den P2Y₁-Agonisten ADPβS eine Inhibition des I_M in kultivierten hippocampalen Neuronen gezeigt wurde (Filippov *et al.*, 2006), konnte in dieser Arbeit weder in Kultur noch in hippocampalen Hirnschnitten eine PIP₂-Depletion nachgewiesen werden. (In den elektrophysiologischen Experimenten wurde ein inhibierender Effekt der Aktivierung von P2Y₁-Rezeptoren auf I_M möglicherweise durch die gemessene Steigerung von Auswärtsströmen überlagert.) In SGC-Neuronen scheint die Inhibition von I_M durch einen Bradykinin-ähnlichen Mechanismus ohne starke PIP₂-Depletion zu erfolgen (Zaika *et al.*, 2007, 2011; Hughes *et al.*, 2007). Filippov *et al.* vermuteten, dass dies in hippocampalen Neuronen nicht der Fall ist, weil sie keinen starken Ca²⁺-Anstieg messen konnten. Damit bleibt die Frage nach dem Mechanismus der P2Y₁-vermittelten I_M-Regulation in hippocampalen Neuronen gänzlich ungeklärt.

Für eine 5-HT_{2A/C}-induzierte PLC-Aktivierung in CA1-Pyramidenneuronen sprechen u.a. Experimente von Nakamura *et al.* (2000). Die Autoren fanden sowohl bei Applikation von Serotonin oder des 5-HT_{2A/C}-Agonisten DOI eine von den proximalen apikalen Dendriten ausgehende IP₃-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung. Demzufolge würde die Ursache einer fehlenden PIP₂-Depletion (und auch IP₃-Bildung) in den hier untersuchten neuronalen Kompartimenten nicht in einer auf distale Dendriten beschränkten Aktivierung der PLC begründet sein. Ein interessanter Aspekt an den Daten von Nakamura *et al.* (2000) ist, dass

sie die beschriebenen Effekte nur in einem Teil der gemessenen Zellen beobachten konnten (in 6 von 35 Neuronen). Die Autoren führten die Ergebnisse auf eine niedrige Dichte bzw. nicht homogene Verteilung der Rezeptoren in der CA1-Region zurück.

Das vorläufige Fazit der Messung $G\alpha_q$ -induzierter PIP_2 -Depletion in CA1-Pyramidenneuronen ist, dass die Depletion von PIP_2 zwar kein Alleinstellungsmerkmal von mAChR-Rezeptoren in diesen Neuronen ist, aber auch nicht den Standard darstellt. Bezogen auf die Frage der Rezeptorspezifität von PIP_2 -Wirkungen ist aus den vorliegenden Daten zu schließen, dass bereits das Auftreten einer PIP_2 -Depletion ein rezeptorspezifischer und kein universeller Prozess ist. In CA1-Pyramidenneuronen ist die $G\alpha_q$ -induzierte PIP_2 -Depletion demnach spezifisch für mAChR und mGluRI, die sich ihrerseits im Ausmaß der induzierten Depletion unterscheiden.

4.4.2 PIP_2 -Dynamik in *Gyrus dentatus*-Körnerzellen

Die Ergebnisse der *Gyrus dentatus*-Körnerzellen zeigen, dass die $G\alpha_q$ -induzierte PIP_2 -Depletion offenbar auch zelltypspezifisch ist. Obwohl *Gyrus dentatus*-Körnerzellen eine starke Expression von muskarinischen Acetylcholin (insbesondere m_1) und metabotropen Glutamat ($mGluR_1$ und $mGluR_5$) Rezeptoren aufweisen (Levey *et al.*, 1995; Shigemoto *et al.*, 1997), zeigte nur eine Minderheit dieser Neurone eine pharmakologisch induzierte PIP_2 -Depletion. Dies steht im starken Gegensatz zu der robusten PIP_2 -Depletion von CA1-Pyramidenneuronen. Daraus ist zu schließen, dass eine hohe Expression der Rezeptoren alleine nicht hinreichend für eine PLC-vermittelte PIP_2 -Depletion ist.

Eine Begründung der Unterschiede durch das Expressionsmuster der Rezeptoren ist noch am ehesten bei den mGluI-Rezeptoren zu finden. Immunhistochemische Daten zeigen auch für *Gyrus dentatus*-Körnerzellen nur eine vergleichsweise schwache Dichte von $mGluR_5$ Rezeptoren im Bereich des Soma (Shigemoto *et al.*, 1997). Während dies bei Pyramidenneuronen offensichtlich nur eine untergeordnete Rolle spielt (diese zeigten am Soma eine in Relation zur $mGluR_5$ -Rezeptorverteilung hohe PIP_2 -Depletion), könnte die Position der Rezeptoren für Körnerzellen eine stärkere Bedeutung haben. Hier wäre es durchaus denkbar, dass eine mögliche PIP_2 -Depletion gerade in dem Bereich stattfindet, der mit der hier verwendeten Methodik praktisch nicht gemessen werden kann. Da im Bereich der Körnerzellschicht allerdings eine nicht zu vernachlässigende Expression von $mGluR_1$ besteht, ist die Rezeptorverteilung aber letztlich wahrscheinlich nicht ursächlich für die fehlende PIP_2 -Depletion. Für mAChR ist die Rezeptorverteilung als Ursache auszuschließen,

denn den immunhistochemischen Daten zufolge ist die Expression von m_1 -Rezeptoren auch im Soma vergleichbar mit der hohen Expression in CA1 (Levey *et al.*, 1995; Rouse *et al.*, 1998). Auch m_3 -Rezeptoren werden exprimiert.

Möglicherweise beruht der Unterschied im PIP_2 -Verhalten auf einem im Vergleich zu Pyramidenneuronen höheren PIP_2 -Gehalt. Dieser könnte auf einem zugunsten von PIP_2 verschobenen Gleichgewicht durch die Expression bzw. Aktivität von Kinasen und Phosphatasen basieren. Insbesondere eine stärkere PIP_2 -Synthese könnte eine Stabilisierung des PIP_2 während einer PLC-Aktivierung bewirken.

Zu prüfen ist auch, ob die physiologische Regulation des PIP_2 indirekt über eine höhere Expression der Sonden gestört wird. Die gegenüber den Pyramidenneuronen höhere Fluoreszenzintensität bei Körnerzellen lässt auf eine höhere Expression der Sonden schließen. Insbesondere von der PH-Domäne ist bekannt, dass sie PIP_2 gegenüber anderen Molekülen zu einem gewissen Grad abschirmen kann (Nelson *et al.*, 2008; Szentpetery *et al.*, 2009). Die Fluoreszenz einzelner Neuronen lässt aber keine Korrelation zum Verhalten erkennen.

Es bleibt die Frage, was die reagierenden Körnerzellen von den Neuronen ohne Reaktion unterscheidet. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es innerhalb der Körnerzellen eine kleine Population mit einer abweichenden Regulation des PIP_2 oder der PLC-gekoppelten Signalkaskade gibt. Da eine Eigenschaft des *Gyrus dentatus* die adulte Neurogenese ist (Übersicht: Bonfanti & Peretto, 2011), könnte es sich z.B. um unreife Neurone handeln. Zwar konnten keine morphologischen Unterschiede – wie ein noch nicht voll ausgereifter Dendritenbaum – festgestellt werden. Die neuronale Entwicklung ergibt jedoch einen interessanten Ansatzpunkt für die Verbindung der PIP_2 -Signaltransduktion mit der Funktion der Körnerzellen, da unreife Körnerzellen sich u.a. durch eine erhöhte synaptische Plastizität von ausgereiften unterscheiden. (Schmidt-Hieber *et al.*, 2004).

4.5 Eignung von Tubby- und PH-Domänen als PIP_2 -Sensoren

In der Literatur herrscht eine anhaltende Debatte über die Nützlichkeit bzw. die Vor- und Nachteile der Tubby und PH-Domäne als PIP_2 Sensoren (vgl. Nelson *et al.*, 2008; Szentpetery *et al.*, 2009). In dieser Arbeit zeigten beide Sensoren ein weitgehend übereinstimmendes Verhalten bezüglich Amplitude, Kinetik der Dissoziation von der Membran und Verlauf der $G\alpha_q$ -induzierten Translokation. Allerdings waren bei einem Teil der Daten signifikante

Unterschiede zwischen der Regeneration der beiden Sensoren zu beobachten (30 s-Oxo-M-Applikation in Soma und Dendriten).

Die Tubby-Domäne zeigt in heterologen Expressionssystemen nach PLC-Aktivierung bisweilen nur eine schwache oder keine messbare Translokation (Hughes *et al.*, 2007; Quinn *et al.*, 2008; Szentpetery *et al.*, 2009). Einige Autoren deuten dieses Ergebnis als eine hohe PIP₂-Affinität (Hughes *et al.*, 2007; Quinn *et al.*, 2008; Szentpetery *et al.*, 2009), obwohl die Tubby Domäne in Experimenten mit Verwendung von 5-Phosphatasen eine niedrigere Affinität als die PH-Domäne zeigt (Szentpetery *et al.*, 2009; Halaszovich *et al.*, 2009). Die hier vorliegenden Daten belegen, dass die Tubby-Domäne in nativen Neuronen eine mAChR- und mGluRI-induzierte PIP₂-Depletion zuverlässig anzeigt. Im Unterschied zu den ebenfalls in hippocampalen Pyramidenneuronen (Kultur) durchgeführten Messungen von Nelson *et al.* (2008) gab es in den von mir durchgeführten Experimenten keine Verzögerung der Tubby-Translokation gegenüber der PH-Domäne. Die langsamere Kinetik bei Nelson *et al.* ist wahrscheinlich auf die Verwendung des vollständigen Tubby-Proteins zurückzuführen, während in dieser Arbeit die PIP₂-bindende C-terminale Domäne eingesetzt wurde. Nelson *et al.* vermuteten bereits, dass die Größe des Gesamtkonstrukts einen Einfluss auf die Translokation haben könnte. Möglich wäre z.B., dass die Größe des Konstrukts einen Einfluss auf die Translokation bzw. Diffusion haben könnte oder die PLC-Aktivität sterisch behindert. Im Einklang mit einer in Relation zur PH-Domäne niedrigeren Affinität (Szentpetery *et al.*, 2009; Halaszovich *et al.*, 2009) erfolgte die Tubby-Translokation stets etwas schneller. Hierbei handelt es sich aber lediglich um einen Trend und keinen signifikanten Unterschied. Die Daten zeigen, dass mit Hilfe der Tubby-Domäne ein differenzierter Vergleich der PIP₂-Depletion verschiedener Rezeptoren möglich ist. Auch eine Modulation der PIP₂-Depletion während der Rezeptoraktivierung kann mit der Tubby-Domäne verfolgt werden. Die Tubby-Domäne zeigte sowohl eine gute Sensitivität zur Messung moderater Änderungen wie einem phasisch-tonischen Verlauf der PIP₂-Depletion als auch eine gute Kinetik der Translokation bei raschen Änderungen während PIP₂-Oszillationen. Die Tubby-Domäne ist demnach ein gut geeignetes Instrument zur PIP₂-Messung.

Wesentlicher Vorteil der Tubby-Domäne gegenüber der PH-Domäne ist das Fehlen einer IP₃-Affinität (Quinn *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 2008; Szentpetery *et al.*, 2009). Zum Einfluss der - im Vergleich zu PIP₂ immerhin bis zu 20-fachen - IP₃-Affinität (s. Methoden) der PH-Domäne auf die PLC-induzierte Translokation gibt es in der Literatur sehr unterschiedliche Meinungen. Manche Autoren sehen in der PH-Domäne eine reine PIP₂-Sonde (Szentpetery *et al.*, 2009), während andere sie sogar als eine IP₃-Sonde (Willets *et al.*, 2004) verwenden.

Angesichts des Disputs in der Literatur und den Daten aus Experimenten mit überexprimierten Rezeptoren zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine erstaunlich gute Übereinstimmung zwischen Tubby- und PH-Domäne. Da die Amplituden der Daten nicht nur bei der hohen mAChR-induzierten PIP₂-Depletion übereinstimmen, sondern auch bei der niedrigeren mGluRI-induzierten PIP₂-Depletion, kann eine Sättigung der Translokation beider Sonden nicht der Grund der Übereinstimmung sein. Prinzipiell gibt es drei Erklärungen für diese Übereinstimmung. 1. Die Translokation beider Sonden beruht auf der Depletion von PIP₂. 2. Nur die Tubby-Domäne zeigt die PIP₂-Depletion an, während die PH-Domäne eine zur PIP₂-Depletion stets proportionale IP₃-Steigerung anzeigt. 3. Die PH-Domäne zeigt eine Mischung aus PIP₂ und IP₃-Signal an. Auch hier müsste allerdings eine gewisse rezeptorübergreifende Proportionalität von PIP₂- und IP₃-Signal bestehen. Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen den Signalen scheint die reale Grundlage der PH-Domänentranslokation näher bei Erklärung 1 zu liegen. Dass die PH-Domäne ein zuverlässiger IP₃-Sensor ist, ist auch aufgrund der fehlenden Translokation bei Aktivierung von G_{αq}-gekoppelten Adreno-, Bradykinin-, Dopamin-, Histamin-, P2Y₁- und 5-HT-Rezeptoren (Abschnitt 4.4.1) zu bezweifeln. Es mag zwar eine PLC-vermittelte PIP₂-Hydrolyse ohne -Depletion geben, aber nicht ohne IP₃-Bildung.

Unter der Annahme, dass beide Domänen die PIP₂-Depletion anzeigen, wird die Kinetik der Translokation (Dissoziation) der Sonden vor allem durch die Rate der PIP₂-Depletion bestimmt. Die unterschiedlichen PIP₂-Affinitäten spielen demnach nur eine untergeordnete Rolle, sonst müssten stärkere Unterschiede in Kinetik und Amplitude vorhanden sein. Unter Umständen kann eine geringgradige IP₃-Bindung der PH-Domäne den Einfluss der PIP₂-Affinitäten kleiner erscheinen lassen als er tatsächlich ist. Im Vergleich zur Kinetik der Dissoziation und Amplitude deuten die Differenzen in der Reassoziaton allerdings an, dass hier möglicherweise ein merklicher Einfluss von IP₃ auf die PIP₂-Interaktion der PH-Domäne zu tragen kommt. Wenn die Kinetik der Translokation der Sonden nur von PIP₂ bestimmt wird, sollte die Sonde mit der höheren Affinität später dissoziieren und früher reassoziieren. Während die tendenziell spätere Dissoziation der PH-Domäne in Übereinstimmung mit einer höheren PIP₂-Affinität ist, zeigt sie bei der Reassoziaton eine signifikante Verzögerung gegenüber Tubby. Besonders gut lässt sich dies anhand der Daten nach 30 s-Oxo-M-Applikation am Soma veranschaulichen. Der t₉₀-Wert (Dissoziation) beträgt mit Tubby 19,92 ± 2,38 s und mit der PH-Domäne 22,26 ± 1,92 s, die Amplituden sind mit F/F₀ = 1,73 ± 0,06 und 1,72 ± 0,07 sehr ähnlich, die t₁₀-Werte (Reassoziaton) unterscheiden sich mit 65,08 ± 7,57 s und 132,74 ± 20,77 s jedoch deutlich (s.a. Abb. in Abschnitt 3.3.1). Dissoziation und Reassoziaton der Sonden zeigen also unterschiedlich große Differenzen in der Kinetik und

sind hinsichtlich der apparenten Affinitäten gegenläufig. Das Verhalten der Sonden ist folglich nicht nur mit den relativen PIP₂-Affinitäten zu erklären. Eine mögliche Erklärung ist, dass in Folge der PIP₂-Depletion ein signifikanter Anteil der PH-Domäne ungebunden vorliegt und an das im Zytosol befindliche IP₃ binden kann. Das neu gebildete PIP₂ tritt zwangsweise in Konkurrenz mit IP₃, was wahrscheinlich zu einer signifikanten Verzögerung der Membranassoziation der PH-Domäne führt. Das dieser Effekt vor allem bei Oxo-M und den kurzen Applikationen auftritt, dürfte u.a. mit der hohen initialen Amplitude der PIP₂-Depletion und damit dem hohen Anteil an nicht-PIP₂-assoziierten PH-Domänen zusammenhängen. In Konsequenz zeigt die PH-Domäne demnach zwar die PIP₂-Depletion korrekt an, kann aber die Kinetik eines späteren PIP₂-Anstigs unter Umständen nur ungenau wiedergeben. Dies könnte Auswirkungen auf die Interpretation einer mit der PH-Domäne gemessenen PIP₂-Dynamik im Vergleich z.B. mit elektrophysiologischen Messungen haben. Zusammenfassend sind nach den vorliegenden Daten beide Sensoren zur Messung einer PIP₂-Depletion geeignet. Allerdings besteht bei der PH-Domäne stets eine gewisse Unsicherheit bezüglich des IP₃-Einflusses, die mit der Verwendung der Tubby-Domäne vermieden werden kann.

4.6 Ausblick

Die Messung der PIP₂-Dynamik von Neuronen und anderen Zellen in deren nativer Umgebung steht gerade erst am Anfang. Die Daten dieser Arbeit unterstützen eine physiologische Funktion der PIP₂-Dynamik und zeigen, dass diese eine hohe Komplexität aufweisen kann. Die im Folgenden genannten Aspekte können daher nur einen ersten Einblick in die vielen Fragestellungen geben, die es in Zukunft zu untersuchen gilt.

Ein Nahziel der Erforschung der PIP₂-Dynamik in CA1-Pyramidenneuronen ist die Ausweitung der optischen Messungen auf die schmalen apikalen und basalen Dendriten. Möglicherweise gibt es hier eine PIP₂-Depletion durch die Gα_q-gekoppelten Rezeptoren, die im Soma und dem apikalen Hauptdendriten keine PIP₂-Depletion triggern konnten. Außerdem ist zu prüfen, ob sich die mAChR- und mGluRI-induzierte PIP₂-Depletion im basalen bzw. distalen Bereich von der in dieser Arbeit gemessenen Dynamik unterscheidet. Ähnliches gilt für die basalen Dendriten von *Gyrus dentatus*-Körnerzellen. Die genannten Bereiche sind mit den hier verwendeten PIP₂-Sonden aufgrund der beugungslimitierten optischen Auflösung nicht zugänglich. Eine Alternative stellt die Verwendung der PIP₂-spezifischen Domänen in Konstrukten zur Messung des Fluoreszenz-Resonanzenergie-

Transfers (FRET) zwischen zwei Fluorophoren dar (Übersicht: Padilla-Parra & Tramier, 2012). Bei dieser Methode ist man nicht auf die Messung der Sondentranslokation zwischen Membran und Zytoplasma angewiesen. Entsprechende Fusionsproteine wurden bereits in heterologen Expressionssystemen angewendet und müssen noch für eine effiziente virale Infektion in Neuronen vorbereitet werden (Kruse *et al.*, 2012; PH-Domäne).

Um die physiologische Funktion der PIP₂-Dynamik weiter zu untersuchen, wird die synaptische Induzierbarkeit der Depletion genauer zu prüfen sein. In dieser Arbeit konnte die Pharmakologie der PIP₂-Depletion nach elektrischer Stimulation nicht hinreichend geklärt werden. Die Applikation von mGluRI-Antagonisten wird zeigen, ob die beobachteten Effekte auf diesen Rezeptortyp zurückzuführen sind. Um speziell die mAChR-Signaltransduktion zu untersuchen, stellt die optogenetische Stimulation spezifischer Fasern durch heterolog exprimierte lichtsensitive Ionenkanäle eine Alternative zur weitgehend unselektiven elektrischen Stimulation dar (Übersicht: Yizhar *et al.*, 2011). Die Expression der sog. Channelrhodopsine (dt. auch Kanalrhodopsine) ausschließlich in cholinergen Neuronen (Witten *et al.*, 2010) ermöglicht es, spezifisch cholinerge Fasern im Hippocampus zu stimulieren. Mittlerweile stehen dafür auch speziell gezüchtete transgene Mäuse zur Verfügung (Zhao *et al.*, 2011).

Ein weiteres Ziel wird sein, eine konkrete Kausalität der Regulation bestimmter Ionenkanäle bzw. Ströme mit der Dynamik der PIP₂-Depletion nachzuweisen. Ein naheliegender Kandidat ist hier der zuvor erwähnte I_M-Strom, für den eine Regulation durch die PIP₂-Dynamik in heterologen Expressionssystemen und SGC-Neuronen gut belegt ist. Auch die hier beobachteten Oszillationen von PIP₂ und dem Membranpotential geben einen guten Ansatzpunkt, um die PIP₂-Dynamik mit der Elektrophysiologie zu korrelieren. Die entsprechenden Experimente erfordern die gleichzeitige Messung von PIP₂-Depletion und Elektrophysiologie in derselben Zelle.

5 Literatur

- Acsády L, Katona I, Gulyás AI, Shigemoto R & Freund TF (1997). Immunostaining for substance P receptor labels GABAergic cells with distinct termination patterns in the hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology* **378**, 320–336.
- Akiba Y, Suzuki R, Saito-Saino S, Owada Y, Sakagami H, Watanabe M & Kondo H (2002). Localization of mRNAs for phosphatidylinositol phosphate kinases in the mouse brain during development. *Gene Expression Patterns* **1**, 123–133.
- Alexander SPH, Mathie A & Peters JA (2011). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. *British Journal of Pharmacology* **164**, S1–S2.
- Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T & O’Keefe J (2007). *The Hippocampus Booked*. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T & O’Keefe J. Oxford University Press.
- Andrade R & Nicoll RA (1987). Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro. *The Journal of Physiology* **394**, 99–124.
- Argañaraz GA, Silva Jr JA, Perosa SR, Pessoa LG, Carvalho FF, Bascands JL, Bader M, Trindade E da S, Amado D, Cavalheiro EA, Pesquero JB & Naffah-Mazzacoratti M da G (2004). The synthesis and distribution of the kinin B1 and B2 receptors are modified in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine model of epilepsy. *Brain Research* **1006**, 114–125.
- Atkinson PJ, Young KW, Ennion SJ, Kew JNC, Nahorski SR & Challiss RAJ (2006). Altered Expression of Gq/11 α Protein Shapes mGlu1 and mGlu5 Receptor-Mediated Single Cell Inositol 1,4,5-Trisphosphate and Ca²⁺ Signaling. *Molecular Pharmacology* **69**, 174–184.
- Balla T, Szentpetery Z & Kim YJ (2009). Phosphoinositide signaling: new tools and insights. *Physiology (Bethesda, Md)* **24**, 231–244.
- Bartlett PJ, Young KW, Nahorski SR & Challiss RAJ (2005). Single cell analysis and temporal profiling of agonist-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate, Ca²⁺, diacylglycerol, and protein kinase C signaling using fluorescent biosensors. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 21837–21846.
- Beck SG (1992). 5-Hydroxytryptamine increases excitability of CA1 hippocampal pyramidal cells. *Synapse (New York, NY)* **10**, 334–340.
- Berman DE, Dall’Armi C, Voronov S V, McIntire LBJ, Zhang H, Moore AZ, Staniszewski A, Arancio O, Kim T-W & Di Paolo G (2008). Oligomeric amyloid-beta peptide disrupts phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate metabolism. *Nature Neuroscience* **11**, 547–554.
- Berridge MJ (1983). Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *The Biochemical Journal* **119**, 849–858.

- Berridge MJ (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1793**, 933–940.
- Berridge MJ & Irvine RF (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **341**, 197–205.
- Berumen LC, Rodríguez A, Miledi R & García-Alcocer G (2012). Serotonin receptors in hippocampus. *The Scientific World Journal* **2012**, 823493.
- Bilbao PS, Katz S & Boland R (2012). Interaction of purinergic receptors with GPCRs, ion channels, tyrosine kinase and steroid hormone receptors orchestrates cell function. *Purinergic Signalling* **8**, 91–103.
- Billington C & Penn R (2003). Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respiratory Research* **4**, 2.
- Billups D, Billups B, Challiss RAJ & Nahorski SR (2006). Modulation of Gq-protein-coupled inositol trisphosphate and Ca²⁺ signaling by the membrane potential. *The Journal of Neuroscience* **26**, 9983–9995.
- Bischofberger J, Engel D, Li L, Geiger JRP & Jonas P (2006). Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nature Protocols* **1**, 2075–2081.
- Bland BH & Oddie SD (2001). Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. *Behavioural Brain Research* **127**, 119–136.
- Bohmann C, Schollmeyer P & Rump LC (1993). Methoxamine inhibits noradrenaline release through activation of α 1- and α 2-adrenoceptors in rat isolated kidney: involvement of purines and prostaglandins. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **347**, 273–279.
- Bonfanti L & Peretto P (2011). Adult neurogenesis in mammals – a theme with many variations. *European Journal of Neuroscience* **34**, 930–950.
- Brown DA & Adams PR (1980). Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* **283**, 673–676.
- Brown DA, Hughes SA, Marsh SJ & Tinker A (2007). Regulation of M(Kv7.2/7.3) channels in neurons by PIP(2) and products of PIP(2) hydrolysis: significance for receptor-mediated inhibition. *The Journal of Physiology* **582**, 917–925.
- Brown DA & Passmore GM (2009). Neural KCNQ (Kv7) channels. *British Journal of Pharmacology* **156**, 1185–1195.
- Bunney TD & Katan M (2010). Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. *Nature Reviews Cancer* **10**, 342–352.
- Burban A, Faucard R, Armand V, Bayard C, Vorobjev V & Arrang J-M (2010). Histamine Potentiates N-Methyl- D -aspartate Receptors by Interacting with an Allosteric Site Distinct from the Polyamine Binding Site. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **332**, 912–921.

- Burwell RD & Agster KL (2008). 3.03 - Anatomy of the Hippocampus and the Declarative Memory System. In *Memory Systems. Vol. [3] of Learning and Memory: A Comprehensive Reference*, ed. Reference E-CJHBBT-L and MAC, pp. 47–66. Academic Press, Oxford.
- Buzsáki G (2002). Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron* **33**, 325–340.
- Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR & Hamm HE (2003). Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation. *Endocrine Reviews* **24**, 765–781.
- Camps M, Kelly PH & Palacios JM (1990). Autoradiographic localization of dopamine D1 and D2 receptors in the brain of several mammalian species. *Journal of Neural Transmission / General Section JNT* **80**, 105–127.
- Cantley LC (2002). The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science* **296**, 1655–1657.
- Challiss RA, Chilvers ER, Willcocks AL & Nahorski SR (1990). Heterogeneity of [3H]inositol 1,4,5-trisphosphate binding sites in adrenal-cortical membranes. Characterization and validation of a radioreceptor assay. *Biochemical Journal* **265**, 421–427.
- Charpak S, Gahwiler BH, Do KQ & Knopfel T (1990). Potassium conductances in hippocampal neurons blocked by excitatory amino-acid transmitters. *Nature* **347**, 765–767.
- Chen X, Zhang X, Jia C, Xu J, Gao H, Zhang G, Du X & Zhang H (2011). Membrane depolarization increases membrane PtdIns(4,5)P₂ levels through mechanisms involving PKC β II and PI4 kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 39760–39767.
- Chu H-Y, Wu Q, Zhou S, Cao X, Zhang A, Jin G-Z, Hu G-Y & Zhen X (2011). SKF83959 suppresses excitatory synaptic transmission in rat hippocampus via a dopamine receptor-independent mechanism. *Journal of Neuroscience Research* **89**, 1259–1266.
- Clement S, Krause U, Desmedt F, Tanti J-F, Behrends J, Pesesse X, Sasaki T, Penninger J, Doherty M, Malaisse W, Dumont JE, Le Marchand-Brustel Y, Erneux C, Hue L & Schurmans S (2001). The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* **409**, 92–97.
- Cobb SR, Bulters DO & Davies CH (2000). Coincident activation of mGluRs and mAChRs imposes theta frequency patterning on synchronised network activity in the hippocampal CA3 region. *Neuropharmacology* **39**, 1933–1942.
- Cobb SR & Davies CH (2005). Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits. *The Journal of Physiology* **562**, 81–88.
- Cockcroft S (2009). Phosphatidic acid regulation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1791**, 905–912.
- Cockcroft S, Taylor JA & Judah JD (1985). Subcellular localisation of inositol lipid kinases in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **845**, 163–170.

- Cole AE & Nicoll RA (1983). Acetylcholine mediates a slow synaptic potential in hippocampal pyramidal cells. *Science* **221**, 1299–1301.
- Cole AE & Nicoll RA (1984). Characterization of a slow cholinergic post-synaptic potential recorded in vitro from rat hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Physiology* **352**, 173–188.
- Colino A & Halliwell J V (1993). Carbachol potentiates Q current and activates a calcium-dependent non-specific conductance in rat hippocampus in vitro. *The European Journal of Neuroscience* **5**, 1198–1209.
- Creba JA, Downes CP, Hawkins PT, Brewster G, Michell RH & Kirk CJ (1983). Rapid breakdown of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in rat hepatocytes stimulated by vasopressin and other Ca²⁺-mobilizing hormones. *The Biochemical Journal* **733–747**.
- Cremona O, Di Paolo G, Wenk MR, Lüthi A, Kim WT, Takei K, Daniell L, Nemoto Y, Shears SB, Flavell RA, McCormick DA & De Camilli P (1999). Essential Role of Phosphoinositide Metabolism in Synaptic Vesicle Recycling. *Cell* **99**, 179–188.
- Csölle C, Heinrich A, Kittel A & Sperlágh B (2008). P2Y receptor mediated inhibitory modulation of noradrenaline release in response to electrical field stimulation and ischemic conditions in superfused rat hippocampus slices. *Journal of Neurochemistry* **106**, 347–360.
- Dasari S & Gullledge AT (2011). M1 and M4 receptors modulate hippocampal pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology* **105**, 779–792.
- Delmas P, Wanaverbecq N, Abogadie FC, Mistry M & Brown DA (2002). Signaling Microdomains Define the Specificity of Receptor-Mediated InsP3 Pathways in Neurons. *Neuron* **34**, 209–220.
- Dutar P, Bassant MH, Senut MC & Lamour Y (1995). The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiological Reviews* **75**, 393–427.
- Dutt P, Kjoller L, Giel M, Hall A & Toksoz D (2002). Activated Gαq family members induce Rho GTPase activation and Rho-dependent actin filament assembly. *FEBS Letters* **531**, 565–569.
- Falkenburger BH, Jensen JB & Hille B (2010). Kinetics of PIP2 metabolism and KCNQ2/3 channel regulation studied with a voltage-sensitive phosphatase in living cells. *The Journal of General Physiology* **135**, 99–114.
- Ferguson KM, Lemmon MA, Schlessinger J & Sigler PB (1995). Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* **83**, 1037–1046.
- Filippov AK, Choi RCY, Simon J, Barnard EA & Brown DA (2006). Activation of P2Y1 nucleotide receptors induces inhibition of the M-type K⁺ current in rat hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience* **26**, 9340–9348.

- Flynn DD, Ferrari-DiLeo G, Mash DC & Levey AI (1995). Differential Regulation of Molecular Subtypes of Muscarinic Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry* **64**, 1888–1891.
- Fotuhi M, Standaert DG, Testa CM, Penney Jr. JB & Young AB (1994). Differential expression of metabotropic glutamate receptors in the hippocampus and entorhinal cortex of the rat. *Molecular Brain Research* **21**, 283–292.
- Fraser DD & MacVicar BA (1996). Cholinergic-dependent plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience* **16**, 4113–4128.
- Fredriksson R & Schiöth HB (2005). The Repertoire of G-Protein-Coupled Receptors in Fully Sequenced Genomes. *Molecular Pharmacology* **67**, 1414–1425.
- Freund TF & Buzsáki G (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* **6**, 347–470.
- Fukami K, Inanobe S, Kanemaru K & Nakamura Y (2010). Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Progress in Lipid Research* **49**, 429–437.
- Gambhir A, Hangyás-Mihályné G, Zaitseva I, Cafiso DS, Wang J, Murray D, Pentylala SN, Smith SO & McLaughlin S (2004). Electrostatic Sequestration of PIP2 on Phospholipid Membranes by Basic/Aromatic Regions of Proteins. *Biophysical Journal* **86**, 2188–2207.
- Gamper N, Reznikov V, Yamada Y, Yang J & Shapiro MS (2004). Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Signals Underlie Receptor-Specific Gq/11-Mediated Modulation of N-Type Ca²⁺ Channels. *The Journal of Neuroscience* **24**, 10980–10992.
- Gamper N & Shapiro MS (2003). Calmodulin Mediates Ca²⁺-dependent Modulation of M-type K⁺ Channels. *The Journal of General Physiology* **122**, 17–31.
- Gamper N & Shapiro MS (2007). Regulation of ion transport proteins by membrane phosphoinositides. *Nature Reviews Neuroscience* **8**, 921–934.
- Garaschuk O, Milos R-I & Konnerth A (2006). Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging in vivo. *Nature Protocols* **1**, 380–386.
- Gerber U, Luthi A & Gähwiler BH (1993). Inhibition of a Slow Synaptic Response by a Metabotropic Glutamate Receptor Antagonist in Hippocampal CA3 Pyramidal Cells. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **254**, 169–172.
- Gileadi E, Kirowa-Eisner E & Penciner J (1975). *Interfacial Electrochemistry – An Experimental Approach*. Addison-Wesley, Advanced Book Program, Reading, Massachusetts.
- Giudici M-L, Emson PC & Irvine RF (2004). A novel neuronal-specific splice variant of Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoform gamma. *Biochemical Journal* **379**, 489–496.
- Gu Z & Yakel JL (2011). Timing-dependent septal cholinergic induction of dynamic hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* **71**, 155–165.

- Gulledge A & Kawaguchi Y (2007). Phasic cholinergic signaling in the hippocampus: functional homology with the neocortex? *Hippocampus* **17**, 327–332.
- Halaszovich CR, Schreiber DN & Oliver D (2009). Ci-VSP is a depolarization-activated phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5'-phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 2106–2113.
- Halstead JR, Jalink K & Divecha N (2005). An emerging role for PtdIns(4,5)P₂-mediated signalling in human disease. *Trends in Pharmacological Sciences* **26**, 654–660.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B & Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* **391**, 85–100.
- Hansen SB, Tao X & MacKinnon R (2011). Structural basis of PIP₂ activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature* **477**, 495–498.
- Hardie RC (2007). TRP channels and lipids: from Drosophila to mammalian physiology. *The Journal of Physiology* **578**, 9–24.
- Hasbi A, O'Dowd BF & George SR (2010). Heteromerization of dopamine D₂ receptors with dopamine D₁ or D₅ receptors generates intracellular calcium signaling by different mechanisms. *Current Opinion in Pharmacology* **10**, 93–99.
- Hasselmo ME (2005). What is the function of hippocampal theta rhythm?—Linking behavioral data to phasic properties of field potential and unit recording data. *Hippocampus* **15**, 936–949.
- Hein L (2006). Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell and Tissue Research* **326**, 541–551.
- Herkenham M (1987). Mismatches between neurotransmitter and receptor localizations in brain: observations and implications. *Neuroscience* **23**, 1–38.
- Hilgemann DW & Ball R (1996). Regulation of Cardiac Na⁺,Ca²⁺ Exchange and KATP Potassium Channels by PIP₂. *Science* **273**, 956–959.
- Hilgemann DW, Feng S & Nasuhoglu C (2001). The Complex and Intriguing Lives of PIP₂ with Ion Channels and Transporters. *Science Signaling* **2001**, re19.
- Hillman KL, Lei S, Doze VA & Porter JE (2009). Alpha-1A adrenergic receptor activation increases inhibitory tone in CA1 hippocampus. *Epilepsy Research* **84**, 97–109.
- Hirose K (1999). Spatiotemporal Dynamics of Inositol 1,4,5-Trisphosphate That Underlies Complex Ca²⁺ Mobilization Patterns. *Science* **284**, 1527–1530.
- Hokin MR & Hokin LE (1953). ENZYME SECRETION AND THE INCORPORATION OF P₃₂ INTO PHOSPHOLIPIDES OF PANCREAS SLICES. *Journal of Biological Chemistry* **203**, 967–977.

- Horowitz LF, Hirdes W, Suh B-C, Hilgemann DW, Mackie K & Hille B (2005). Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca²⁺ requirement, and regulation of M current. *The Journal of General Physiology* **126**, 243–262.
- Hubbard KB & Hepler JR (2006). Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins. *Cellular Signalling* **18**, 135–150.
- Hughes S, Marsh SJ, Tinker A & Brown DA (2007). PIP(2)-dependent inhibition of M-type (Kv7.2/7.3) potassium channels: direct on-line assessment of PIP(2) depletion by Gq-coupled receptors in single living neurons. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology* **455**, 115–124.
- Hwang J-I, Oh Y-S, Shin K-J, Kim H, Ryu SH & Suh P-G (2005). Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC-eta. *The Biochemical Journal* **389**, 181–186.
- Idevall-Hagren O, Dickson EJ, Hille B, Toomre DK & De Camilli P (2012). Optogenetic control of phosphoinositide metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E2316–E2323.
- Inanobe A, Nakagawa A, Matsuura T & Kurachi Y (2010). A Structural Determinant for the Control of PIP2 Sensitivity in G Protein-gated Inward Rectifier K⁺ Channels. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 38517–38523.
- Ishihara H, Shibasaki Y, Kizuki N, Katagiri H, Yazaki Y, Asano T & Oka Y (1996). Cloning of cDNAs Encoding Two Isoforms of 68-kDa Type I Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 23611–23614.
- Ishihara H, Shibasaki Y, Kizuki N, Wada T, Yazaki Y, Asano T & Oka Y (1998). Type I Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinases: CLONING OF THE THIRD ISOFORM AND DELETION/SUBSTITUTION ANALYSIS OF MEMBERS OF THIS NOVEL LIPID KINASE FAMILY. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 8741–8748.
- Jin L-Q, Goswami S, Cai G, Zhen X & Friedman E (2003). SKF83959 selectively regulates phosphatidylinositol-linked D1 dopamine receptors in rat brain. *Journal of Neurochemistry* **85**, 378–386.
- Kanaho Y, Nakano-Kobayashi A & Yokozeki T (2008). Novel activation mechanism and physiological function of PIP5K γ 661. *Advances in Enzyme Regulation* **48**, 88–96.
- Kanaho Y & Unoki T (2012). Regulation and functions of the lipid kinase PIP5K γ 661 at synapses. *Advances in Biological Regulation* **52**, 59–65.
- Katritch V, Cherezov V & Stevens RC (2012). Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends in Pharmacological Sciences* **33**, 17–27.
- Klausberger T & Somogyi P (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science (New York, NY)* **321**, 53–57.
- Knight AR, Misra A, Quirk K, Benwell K, Revell D, Kennett G & Bickerdike M (2004). Pharmacological characterisation of the agonist radioligand binding site of 5-HT(2A), 5-

- HT(2B) and 5-HT(2C) receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **370**, 114–123.
- Köhler CA, Da Silva WC, Benetti F & Bonini JS (2011). Histaminergic mechanisms for modulation of memory systems. *Neural Plasticity* **2011**, 328602.
- Kruse M, Hammond GR V & Hille B (2012). Regulation of voltage-gated potassium channels by PI(4,5)P₂. *The Journal of General Physiology* **140**, 189–205.
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T & Doyle DA (2003). Crystal Structure of the Potassium Channel KirBac1.1 in the Closed State. *Science* **300**, 1922–1926.
- Kwiatkowska K (2010). One lipid, multiple functions: how various pools of PI(4,5)P₂ are created in the plasma membrane. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* **67**, 3927–3946.
- Kwon O Bin, Paredes D, Gonzalez CM, Neddens J, Hernandez L, Vullhorst D & Buonanno A (2008). Neuregulin-1 regulates LTP at CA1 hippocampal synapses through activation of dopamine D4 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15587–15592.
- Landman N, Jeong SY, Shin SY, Voronov S V, Serban G, Kang MS, Park MK, Di Paolo G, Chung S & Kim T-W (2006). Presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease cause an imbalance in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 19524–19529.
- Leitner MG, Feuer A, Ebers O, Schreiber DN, Halaszovich CR & Oliver D (2012). Restoration of ion channel function in deafness-causing KCNQ4 mutants by synthetic channel openers. *British Journal of Pharmacology* **165**, 2244–2259.
- Leitner MG, Halaszovich CR & Oliver D (2011). Aminoglycosides Inhibit KCNQ4 Channels in Cochlear Outer Hair. *Molecular Pharmacology* **79**, 51–60.
- Lemmon MA, Ferguson KM, O'Brien R, Sigler PB & Schlessinger J (1995). Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 10472–10476.
- Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG & Heilman CJ (1995). Expression of m1-m4 Muscarinic Acetylcholine Receptor Proteins in Rat Hippocampus and Regulation by Cholinergic Innervation. *The Journal of Neuroscience* **15**, 4077–4092.
- Li G & Olson JE (2008). Purinergic activation of anion conductance and osmolyte efflux in cultured rat hippocampal neurons. *American Journal of Physiology Cell Physiology* **295**, C1550–60.
- Li Q-H, Nakadate K, Tanaka-Nakadate S, Nakatsuka D, Cui Y & Watanabe Y (2004). Unique expression patterns of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in the rat brain during postnatal development: Western blot and immunohistochemical analyses. *The Journal of Comparative Neurology* **469**, 128–140.

- Linke R & Frotscher M (1993). Development of the rat septohippocampal projection: Tracing with DiI and electron microscopy of identified growth cones. *The Journal of Comparative Neurology* **332**, 69–88.
- Linke R, Pabst T & Frotscher M (1995). Development of the hippocamposeptal projection in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* **351**, 602–616.
- Lintunen M, Sallmen T, Karlstedt K, Fukui H, Eriksson KS & Panula P (1998). Postnatal expression of H1-receptor mRNA in the rat brain: correlation to l-histidine decarboxylase expression and local upregulation in limbic seizures. *European Journal of Neuroscience* **10**, 2287–2301.
- Liu B, Zhang C & Qin F (2005). Functional Recovery from Desensitization of Vanilloid Receptor TRPV1 Requires Resynthesis of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *The Journal of Neuroscience* **25**, 4835–4843.
- Liu J, Wang W, Wang F, Cai F, Hu Z-L, Yang Y-J, Chen J & Chen J-G (2009). Phosphatidylinositol-linked novel D(1) dopamine receptor facilitates long-term depression in rat hippocampal CA1 synapses. *Neuropharmacology* **57**, 164–171.
- Liu L, Heneghan JF, Michael GJ, Stanish LF, Egertová M & Rittenhouse AR (2008). L- and N-current but not M-current inhibition by M1 muscarinic receptors requires DAG lipase activity. *Journal of Cellular Physiology* **216**, 91–100.
- Liu W, Kumar A & Alreja M (1998). Excitatory effects of muscarine on septohippocampal neurons: involvement of M3 receptors. *Brain Research* **805**, 220–233.
- Logothetis DE, Lupyán D & Rosenhouse-Dantsker A (2007). Diverse Kir modulators act in close proximity to residues implicated in phosphoinositide binding. *The Journal of Physiology* **582**, 953–965.
- Logothetis DE, Petrou VI, Adney SK & Mahajan R (2010). Channelopathies linked to plasma membrane phosphoinositides. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology* **460**, 321–341.
- Loijens JC & Anderson RA (1996). Type I Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinases Are Distinct Members of This Novel Lipid Kinase Family. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 32937–32943.
- Lopes CMB, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J & Logothetis DE (2002). Alterations in Conserved Kir Channel-PIP2 Interactions Underlie Channelopathies. *Neuron* **34**, 933–944.
- Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A & DiFrancesco D (1993). Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *Journal of Neurophysiology* **69**, 2129–2136.
- Madison D V, Lancaster B & Nicoll RA (1987). Voltage clamp analysis of cholinergic action in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* **7**, 733–741.

- Mandal M & Yan Z (2009). Phosphatidylinositol (4,5) -Bisphosphate Regulation of N-Methyl-D-aspartate Receptor Channels in Cortical Neurons. *Molecular Pharmacology* **76**, 1349–1359.
- Marion E, Kaisaki PJ, Pouillon V, Gueydan C, Levy JC, Bodson A, Krzentowski G, Daubresse J-C, Mockel J, Behrends J, Servais G, Szpirer C, Kruys V, Gauguier D & Schurmans S (2002). The Gene INPPL1, Encoding the Lipid Phosphatase SHIP2, Is a Candidate for Type 2 Diabetes In Rat and Man. *Diabetes* **51**, 2012–2017.
- Meberg PJ & Miller MW (2003). Culturing Hippocampal and Cortical Neurons. In, ed. Biology BT-M in C, pp. 111–127. Academic Press.
- Medin T, Owe SG, Rinholm JE, Larsson M, Sagvolden T, Storm-Mathisen J & Bergersen LH (2011). Dopamine D5 receptors are localized at asymmetric synapses in the rat hippocampus. *Neuroscience* **192**, 164–171.
- Mehta S & Zhang J (2011). Reporting from the Field: Genetically Encoded Fluorescent Reporters Uncover Signaling Dynamics in Living Biological Systems. *Annual Review of Biochemistry* **80**, 375–401.
- Merrill DR, Bikson M & Jefferys JGR (2005). Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols. *Journal of Neuroscience Methods* **141**, 171–198.
- Michailidis IE, Helton TD, Petrou VI, Mirshahi T, Ehlers MD & Logothetis DE (2007). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulates NMDA receptor activity through alpha-actinin. *The Journal of Neuroscience* **27**, 5523–5532.
- Micheva KD (2001). Regulation of presynaptic phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by neuronal activity. *The Journal of Cell Biology* **154**, 355–368.
- Millan MJ, Marin P, Bockaert J & Mannoury la Cour C (2008). Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends in Pharmacological Sciences* **29**, 454–464.
- Ming Y, Zhang H, Long L, Wang F, Chen J & Zhen X (2006). Modulation of Ca²⁺ signals by phosphatidylinositol-linked novel D1 dopamine receptor in hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry* **98**, 1316–1323.
- Mizuno N & Itoh H (2009). Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. *Neuro-Signals* **17**, 42–54.
- Molleman A (2003). *Patch clamping : an introductory guide to patch clamp electrophysiology*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Moravcevic K, Oxley CL & Lemmon MA (2012). Conditional peripheral membrane proteins: facing up to limited specificity. *Structure* **20**, 15–27.
- Morton RA & Davies CH (1997). Regulation of muscarinic acetylcholine receptor-mediated synaptic responses by adenosine receptors in the rat hippocampus. *The Journal of Physiology* **502**, 75–90.
- Mukhopadhyay S & Jackson P (2011). The tubby family proteins. *Genome Biology* **12**, 225.

- Nahorski SR, Young KW, John Challiss RA & Nash MS (2003). Visualizing phosphoinositide signalling in single neurons gets a green light. *Trends in Neurosciences* **26**, 444–452.
- Nakahara M, Shimosawa M, Nakamura Y, Irino Y, Morita M, Kudo Y & Fukami K (2005). A Novel Phospholipase C, PLC η 2, Is a Neuron-specific Isozyme. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 29128–29134.
- Nakamura T, Nakamura K, Lasser-Ross N, Barbara J-G, Sandler VM & Ross WN (2000). Inositol 1,4,5-Trisphosphate (IP3)-Mediated Ca²⁺ Release Evoked by Metabotropic Agonists and Backpropagating Action Potentials in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience* **20**, 8365–8376.
- Nakano-Kobayashi A, Yamazaki M, Unoki T, Hongu T, Murata C, Taguchi R, Katada T, Frohman MA, Yokozeki T & Kanaho Y (2007). Role of activation of PIP5K[γ]661 by AP-2 complex in synaptic vesicle endocytosis. *EMBO J* **26**, 1105–1116.
- Narayan K & Lemmon MA (2006). Determining selectivity of phosphoinositide-binding domains. *Methods* **39**, 122–133.
- Nash MS, Schell MJ, Atkinson PJ, Johnston NR, Nahorski SR & Challiss RAJ (2002). Determinants of metabotropic glutamate receptor-5-mediated Ca²⁺ and inositol 1,4,5-trisphosphate oscillation frequency. Receptor density versus agonist concentration. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 35947–35960.
- Nash MS, Willets JM, Billups B, John Challiss RA & Nahorski SR (2004). Synaptic Activity Augments Muscarinic Acetylcholine Receptor-stimulated Inositol 1,4,5-Trisphosphate Production to Facilitate Ca²⁺ Release in Hippocampal Neurons. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 49036–49044.
- Nelson CP, Nahorski SR & Challiss RAJ (2008). Temporal profiling of changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol allows comprehensive analysis of phospholipase C-initiated signalling in single neurons. *Journal of Neurochemistry* **107**, 602–615.
- Nicoletti F, Bruno V & Battaglia G (2009). Metabotropic Glutamate Receptors (mGluRs): Molecular Biology, Pharmacology and Cell Biology. In *Encyclopedia of Neuroscience*, ed. Larry R & Squire BT, pp. 801–810. Academic Press, Oxford.
- Niswender CM & Conn PJ (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **50**, 295–322.
- Noristani HN, Olabarria M, Verkhratsky A & Rodríguez JJ (2010). Serotonin fibre sprouting and increase in serotonin transporter immunoreactivity in the CA1 area of hippocampus in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience* **32**, 71–79.
- Numberger M & Draguhn A (1996). *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Odorizzi G, Babst M & Emr SD (2000). Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends in Biochemical Sciences* **25**, 229–235.

- Ogier R, Wrobel LJ & Raggenbass M (2008). Action of tachykinins in the hippocampus: facilitation of inhibitory drive to GABAergic interneurons. *Neuroscience* **156**, 527–536.
- Okubo Y, Kakizawa S, Hirose K & Iino M (2001). Visualization of IP(3) dynamics reveals a novel AMPA receptor-triggered IP(3) production pathway mediated by voltage-dependent Ca(2+) influx in Purkinje cells. *Neuron* **32**, 113–122.
- Oldham WM & Hamm HE (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 60–71.
- Oleskevich S, Descarries L & Lacaille JC (1989). Quantified distribution of the noradrenaline innervation in the hippocampus of adult rat. *The Journal of Neuroscience* **9**, 3803–3815.
- Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K & Freed EO (2004). Phosphatidylinositol (4,5) biphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 14889–14894.
- Oude Weernink PA, Han L, Jakobs KH & Schmidt M (2007). Dynamic phospholipid signaling by G protein-coupled receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1768**, 888–900.
- Padilla-Parra S & Tramier M (2012). FRET microscopy in the living cell: Different approaches, strengths and weaknesses. *BioEssays* **34**, 369–376.
- Di Paolo G & De Camilli P (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657.
- Di Paolo G, Moskowitz HS, Gipson K, Wenk MR, Voronov S, Obayashi M, Flavell R, Fitzsimonds RM, Ryan TA & Camilli P De (2004). Impaired PtdIns(4,5)P₂ synthesis in nerve terminals produces defects in synaptic vesicle trafficking. *Nature* **431**, 415–422.
- Park K-H, Piron J, Dahimene S, Mérot J, Baró I, Escande D & Loussouarn G (2005). Impaired KCNQ1-KCNE1 and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate interaction underlies the long QT syndrome. *Circulation Research* **96**, 730–739.
- Paxinos G & Watson C (1982). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 1st ed. Academic Press.
- Paxinos G & Watson C (1996). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed. Academic Press, Sydney.
- Paxinos G & Watson C (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd ed. Elsevier Academic Press.
- Plonsey R & Barr RC (1988). *Bioelectricity: A Quantitative Approach*. Plenum Press, New York.
- Pourquier P, Takebayashi Y, Urasaki Y, Gioffre C, Kohlhagen G & Pommier Y (2000). Induction of topoisomerase I cleavage complexes by 1-β-d-arabinofuranosylcytosine (ara-C) in vitro and in ara-C-treated cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 1885–1890.

- Powner DJ, Payne RM, Pettitt TR, Giudici ML, Irvine RF & Wakelam MJO (2005). Phospholipase D2 stimulates integrin-mediated adhesion via phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase I γ b. *Journal of Cell Science* **118**, 2975–2986.
- Quinn K V, Behe P & Tinker A (2008). Monitoring changes in membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in living cells using a domain from the transcription factor tubby. *The Journal of Physiology* **586**, 2855–2871.
- Rand DAJ & Woods R (1971). The nature of adsorbed oxygen on rhodium, palladium and gold electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **31**, 29–38.
- Rashid AJ, O'Dowd BF, Verma V & George SR (2007). Neuronal Gq/11-coupled dopamine receptors: an uncharted role for dopamine. *Trends in Pharmacological Sciences* **28**, 551–555.
- Rebecchi M, Peterson A & McLaughlin S (1992). Phosphoinositide-specific phospholipase C- δ .1 binds with high affinity to phospholipid vesicles containing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* **31**, 12742–12747.
- Remington SJ (2011). Green fluorescent protein: a perspective. *Protein Science* **20**, 1509–1519.
- Rouse ST, Gilmor ML & Levey AI (1998). Differential presynaptic and postsynaptic expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptors at the perforant pathway/granule cell synapse. *Neuroscience* **86**, 221–232.
- Rouse ST, Hamilton SE, Potter LT, Nathanson NM & Conn PJ (2000). Muscarinic-induced modulation of potassium conductances is unchanged in mouse hippocampal pyramidal cells that lack functional M1 receptors. *Neuroscience Letters* **278**, 61–64.
- Santagata S, Boggon TJ, Baird CL, Gomez CA, Zhao J, Shan WS, Myszkowski DG & Shapiro L (2001). G-protein signaling through tubby proteins. *Science* **292**, 2041–2050.
- Santarius M, Lee CH & Anderson RA (2006). Supervised membrane swimming: small G-protein lifeguards regulate PIPK signalling and monitor intracellular PtdIns(4,5)P₂ pools. *The Biochemical Journal* **398**, 1–13.
- Scheffzek K & Welte S (2012). Pleckstrin homology (PH) like domains – versatile modules in protein–protein interaction platforms. *FEBS Letters* **586**, 2662–2673.
- Scheiderer CL, Dobrunz LE & McMahon LL (2004). Novel Form of Long-Term Synaptic Depression in Rat Hippocampus Induced By Activation of α 1 Adrenergic Receptors. *Journal of Neurophysiology* **91**, 1071–1077.
- Schmidt MR, Stansfeld PJ, Tucker SJ & Sansom MSP (2012). Simulation-Based Prediction of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Binding to an Ion Channel. *Biochemistry* **52**, 279–281.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P & Bischofberger J (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* **429**, 184–187.

- Schoepp DD, Goldsworthy J, Johnson BG, Salhoff CR & Baker SR (1994). 3,5-Dihydroxyphenylglycine Is a Highly Selective Agonist for Phosphoinositide-Linked Metabotropic Glutamate Receptors in the Rat Hippocampus. *Journal of Neurochemistry* **63**, 769–772.
- Selbach O, Brown RE & Haas HL (1997). Long-term increase of hippocampal excitability by histamine and cyclic AMP. *Neuropharmacology* **36**, 1539–1548.
- Sharman JL, Benson HE, Pawson AJ, Lukito V, Mpamhanga CP, Bombail V, Davenport AP, Peters JA, Spedding M, Harmar AJ & NC-IUPHAR (2013). IUPHAR-DB: updated database content and new features. *Nucleic Acids Research* **41**, D1083–D1088.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S & Mizuno N (1997). Differential Presynaptic Localization of Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes in the Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* **17**, 7503–7522.
- Shimohama S, Perry G, Richey P, Praprotnik D, Takenawa T, Fukami K, Whitehouse PJ & Kimura J (1995). Characterization of the association of phospholipase C- δ with Alzheimer neurofibrillary tangles. *Brain Research* **669**, 217–224.
- Silva Jr. JA, Goto EM, Perosa SR, Argañaraz GA, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG & Pesquero JB (2008). Kinin B1 receptors facilitate the development of temporal lobe epilepsy in mice. *International Immunopharmacology* **8**, 197–199.
- Simon MI, Strathmann MP & Gautam N (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**, 802–808.
- Sloviter RS, Ali-Akbarian L, Horvath KD & Menkens KA (2001). Substance P receptor expression by inhibitory interneurons of the rat hippocampus: Enhanced detection using improved immunocytochemical methods for the preservation and colocalization of GABA and other neuronal markers. *The Journal of Comparative Neurology* **430**, 283–305.
- Stauffer TP, Ahn S & Meyer T (1998). Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ concentration monitored in living cells. *Current Biology* **8**, 343–346.
- Suh B-C & Hille B (2002). Recovery from Muscarinic Modulation of M Current Channels Requires Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Synthesis. *Neuron* **35**, 507–520.
- Suh B-C & Hille B (2008). PIP₂ Is a Necessary Cofactor for Ion Channel Function: How and Why? *Annual Review of Biophysics* **37**, 175–195.
- Supèr H & Soriano E (1994). The organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. II. Development of entorhinal, commissural, and septal connections studied with the lipophilic tracer DiI. *The Journal of Comparative Neurology* **344**, 101–120.
- Surges R, Freiman TM & Feuerstein TJ (2004). Input resistance is voltage dependent due to activation of I_h channels in rat CA1 pyramidal cells. *Journal of Neuroscience Research* **76**, 475–480.

- Szentpetery Z, Balla A, Kim YJ, Lemmon MA & Balla T (2009). Live cell imaging with protein domains capable of recognizing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; a comparative study. *BMC Cell Biology* **10**, 67.
- Szymańska E, Sobota A, Czuryło E & Kwiatkowska K (2008). Expression of PI(4,5)P₂-binding proteins lowers the PI(4,5)P₂ level and inhibits FcγRIIA-mediated cell spreading and phagocytosis. *European Journal of Immunology* **38**, 260–272.
- Tai C, Kuzmiski JB & MacVicar BA (2006). Muscarinic enhancement of R-type calcium currents in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience* **26**, 6249–6258.
- Toker A (2002). Phosphoinositides and signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **59**, 761–779.
- Tonazzini I, Trincavelli ML, Storm-Mathisen J, Martini C & Bergersen LH (2007). Co-localization and functional cross-talk between A1 and P2Y1 purine receptors in rat hippocampus. *The European Journal of Neuroscience* **26**, 890–902.
- Torres GE, Chaput Y & Andrade R (1995). Cyclic AMP and protein kinase A mediate 5-hydroxytryptamine type 4 receptor regulation of calcium-activated potassium current in adult hippocampal neurons. *Molecular Pharmacology* **47**, 191–197.
- Tsien RY (1998). The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* **67**, 509–544.
- Tu JC, Xiao B, Yuan JP, Lanahan AA, Leoffert K, Li M, Linden DJ & Worley PF (1998). Homer Binds a Novel Proline-Rich Motif and Links Group 1 Metabotropic Glutamate Receptors with IP3 Receptors. *Neuron* **21**, 717–726.
- Tully K & Bolshakov VY (2010). Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. *Molecular Brain* **3**, 15.
- Tyers M, Haslam RJ, Rachubinski RA & Harley CB (1989). Molecular analysis of pleckstrin: The major protein kinase C substrate of platelets. *Journal of Cellular Biochemistry* **40**, 133–145.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ & Waterfield MD (2001). SYNTHESIS AND FUNCTION OF 3-PHOSPHORYLATED INOSITOL LIPIDS. *Annual Review of Biochemistry* **70**, 535–602.
- Várnai P & Balla T (1998). Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[3H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *The Journal of Cell Biology* **143**, 501–510.
- Várnai P & Balla T (2006). Live cell imaging of phosphoinositide dynamics with fluorescent protein domains. *Biochimica et Biophysica Acta* **1761**, 957–967.
- Várnai P & Balla T (2008). Live cell imaging of phosphoinositides with expressed inositide binding protein domains. *Methods* **46**, 167–176.

- Vijayan VK (1979). Distribution of cholinergic neurotransmitter enzymes in the hippocampus and the dentate gyrus of the adult and the developing mouse. *Neuroscience* **4**, 121–137.
- Volpicelli-Daley LA, Lucast L, Gong L-W, Liu L, Sasaki J, Sasaki T, Abrams CS, Kanaho Y & De Camilli P (2010). Phosphatidylinositol-4-Phosphate 5-Kinases and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Synthesis in the Brain. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 28708–28714.
- Wang RY & Arvanov VL (1998). M100907, a highly selective 5-HT_{2A} receptor antagonist and a potential atypical antipsychotic drug, facilitates induction of long-term potentiation in area CA1 of the rat hippocampal slice. *Brain Research* **779**, 309–313.
- Warman EN, Grill WM & Durand D (1992). Modeling the effects of electric fields on nerve fibers: Determination of excitation thresholds. *Biomedical Engineering* **39**, 1244–1254.
- Wenk MR, Pellegrini L, Klenchin VA, Di Paolo G, Chang S, Daniell L, Arioka M, Martin TF & De Camilli P (2001). PIP Kinase Iy Is the Major PI(4,5)P₂ Synthesizing Enzyme at the Synapse. *Neuron* **32**, 79–88.
- Wess J, Eglen RM & Gautam D (2007). Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery* **6**, 721–733.
- Whorton MR & MacKinnon R (2011). Crystal Structure of the Mammalian GIRK2 K⁺ Channel and Gating Regulation by G Proteins, PIP₂, and Sodium. *Cell* **147**, 199–208.
- Widmer H, Ferrigan L, Davies CH & Cobb SR (2006). Evoked Slow Muscarinic Acetylcholinergic Synaptic Potentials in Rat Hippocampal Interneurons. *Hippocampus* **628**, 617–628.
- Willars GB, Nahorski SR & Challiss RA (1998). Differential regulation of muscarinic acetylcholine receptor-sensitive polyphosphoinositide pools and consequences for signaling in human neuroblastoma cells. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 5037–5046.
- Willems JM, Nash MS, Challiss RAJ & Nahorski SR (2004). Imaging of muscarinic acetylcholine receptor signaling in hippocampal neurons: evidence for phosphorylation-dependent and -independent regulation by G-protein-coupled receptor kinases. *The Journal of Neuroscience* **24**, 4157–4162.
- Winks JS, Hughes S, Filippov AK, Tatulian L, Abogadie FC, Brown DA & Marsh SJ (2005). Relationship between Membrane Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate and Receptor-Mediated Inhibition of Native Neuronal M Channels. *The Journal of Neuroscience* **25**, 3400–3413.
- Witten IB, Lin S-C, Brodsky M, Prakash R, Diester I, Anikeeva P, Gradinaru V, Ramakrishnan C & Deisseroth K (2010). Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning. *Science (New York, NY)* **330**, 1677–1681.
- Yizhar O, Fenno LE, Davidson TJ, Mogri M & Deisseroth K (2011). Optogenetics in neural systems. *Neuron* **71**, 9–34.

- Young KW, Billups D, Nelson CP, Johnston N, Willets JM, Schell MJ, Challiss RAJ & Nahorski SR (2005). Muscarinic acetylcholine receptor activation enhances hippocampal neuron excitability and potentiates synaptically evoked Ca²⁺ signals via phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate depletion. *Molecular and Cellular Neurosciences* **30**, 48–57.
- Young KW, Nash MS, Challiss RAJ & Nahorski SR (2003). Role of Ca²⁺ feedback on single cell inositol 1,4,5-trisphosphate oscillations mediated by G-protein-coupled receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 20753–20760.
- Zaika O, Tolstykh GP, Jaffe DB & Shapiro MS (2007). Inositol triphosphate-mediated Ca²⁺ signals direct purinergic P2Y receptor regulation of neuronal ion channels. *The Journal of Neuroscience* **27**, 8914–8926.
- Zaika O, Zhang J & Shapiro MS (2011). Combined Phosphoinositide and Ca²⁺ Signals Mediating Receptor Specificity toward Neuronal Ca²⁺ Channels. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 830–841.
- Zhang H, Craciun LC, Mirshahi T, Rohács T, Lopes CMB, Jin T & Logothetis DE (2003). PIP(2) activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* **37**, 963–975.
- Zhang X, Li X & Xu H (2012). Phosphoinositide isoforms determine compartment-specific ion channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 11384–11389.
- Zhao F-L & Herness S (2009). Resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates adaptation of the caffeine response in rat taste receptor cells. *The Journal of Physiology* **587**, 363–377.
- Zhao S, Ting J, Atallah H, Qiu L, Tan J, Gloss B, Augustine GJ, Deisseroth K, Luo M, Graybiel AM & Feng G (2011). Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nature Methods* **8**, 745–752.
- Zhou Y, Wing MR, Sondek J & Harden TK (2005). Molecular cloning and characterization of PLC- ϵ 2. *The Biochemical Journal* **391**, 667–676.
- Zhu PJ & Krnjević K (1997). Adenosine release mediates cyanide-induced suppression of CA1 neuronal activity. *The Journal of Neuroscience* **17**, 2355–2364.

Ehrenwörtliche Erklärung

Die die dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Rezeptorinduzierte PI(4,5)P₂-Dynamik in hippocampalen CA1-Pyramidenneuronen“ wurde in der Zeit vom Januar 2008 bis Juni 2013 am Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung von Prof. Dr. Dominik Oliver angefertigt.

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich bislang noch kein Promotionsgesuch bei einer anderen in- oder ausländischen Hochschule eingereicht habe. Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt und alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet. Ich habe die Dissertation weder in der vorliegenden noch einer ähnlichen Form bei einer anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht.

Marburg, im Juli 2013

Sandra Hackelberg

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen/Herren in Düsseldorf:

Bachmann, Bossinger, Braun, Bridges, Bünemann, D'Haese, Ernst, Fazio, Gelius-Dietrich, ,
Glätzer, Greven, Grieshaber, Groth, Heinlein, Hollenberg, Jahns, Keck, Kies, Kläui, Knust,
Krause, Lisowsky, Martin, Mehlhorn, Müller, Prüstel, Riesner, Rüter, Santore, Schlue,
Schumacher, Schumann, Wagner, Walldorf, Westhoff, Witsch, Wodaz, Wunderlich

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen/Herren in Aachen:

Bohrmann, Bräunig, Campenhausen, Emans, Frentzen, Höcker, Indermark, Luksch, Mey, Möller,
Müller, Naynert, Wagner, Willigen, Wolf, Zimmermann

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen/Herren in Jülich:

Baumann, Gensch, Kaupp, Müller, Seifert, Strünker

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen/Herren in Freiburg:

Bischofberger, Fakler, Oliver

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen/Herren in Marburg:

Braun, Daut, Oliver

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mit ihrer technischen sowie moralischen Unterstützung und Diskussionsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Neurophysiologie sowie der Universität Marburg, der Physiologie Freiburg und der Physiologie Frankfurt für ihre Unterstützung und gute Zusammenarbeit. Insbesondere gilt mein Dank:

Prof. Dr. Dominik Oliver für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Josef Bischofberger und den Mitarbeitern der AG Jonas für die Anleitung und die Tipps zur Herstellung und Messung hippocampaler Hirnschnitte.

Prof. Dr. Jochen Roeper und Stephan Lammel für die Anleitung zur Stereotaxie.

Olga Ebers für die Herstellung der guten Viren und ihrer Hilfe mit der neuronalen Zellkultur, sowie vielen anderen kleinen Dingen.

Michael Leitner und Christian Halaszovich, für ihre technische Hilfe, Diskussionsbereitschaft und das Korrekturlesen von Teilen dieser Dissertation sowie die gute Zusammenarbeit.

Daniela N. Schreiber and Olga Ivanova for all discussions, technical help and your support in science and beyond.

Dieter, Steffi und allen Mitarbeitern des Tierstalls für die gute Zusammenarbeit.

Ludwig Böckler und Simon Bubel für ihre exzellente Arbeit und großes Engagement bei der Herstellung und Reparatur kleiner und großer technischer Dinge, sowie für ihr freundliches Wesen.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, meinem Bruder Stefan, KD, Tina und Kessie für die bedingungslose Unterstützung während der gesamten Zeit dieser Arbeit. Außerdem danke ich allen meinen Freunden, die mich durch diese Zeit begleitet haben.