

Aus dem Institut für Neuroanatomie

(Prof. Dr. med. Jochen Staiger)

im Zentrum Anatomie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Elektrophysiologische Charakterisierung
GABA-Rezeptoren vermittelter
Inhibition an Martinotti-Zellen im
somatosensorischen Kortex**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jürgen Delchmann

aus

Makinka (Kasachstan)

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent/in Prof. Dr. med. Jochen Staiger

Ko-Referent/in: Prof. Dr. Swen Hülsmann

Datum der mündlichen Prüfung: 17.01.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel
" Elektrophysiologische Charakterisierung GABA-Rezeptoren
vermittelter Inhibition an Martinotti-Zellen im somatosensorischen
Kortex " eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir
angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Das Nervensystem	1
1.2 Somatosensorischer Kortex (<i>Barrel Cortex</i>).....	3
1.3 Martinotti-Zellen.....	6
1.4 GABA-Rezeptoren	7
1.4.1 GABA _A -Rezeptoren	9
1.4.2 GABA _B -Rezeptoren	10
1.4.3 Agonisten und Antagonisten	10
1.5 Fragestellung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Versuchstiere und Präparation	13
2.2 Die Patch-Clamp-Methode.....	14
2.3 Elektrophysiologischer Versuchsaufbau.....	15
2.4 Herstellung und Befüllung der Pipetten	17
2.5 Druckapplikation.....	18
2.6 Elektrophysiologische Charakterisierung abgeleiteter Zellen.....	18
2.7 Extrazelluläre Stimulation und Aufnahme von eIPSC.....	19
2.8 Morphologie.....	21
2.9 Datenanalyse	23
2.10 Bestimmung der Umkehrpotentiale	23
2.11 Analyse von eIPSC.....	24
2.12 Lösungen und Pharmaka.....	25
3 Ergebnisse.....	26
3.1 Identifizierung abgeleiteter Martinotti-Zellen.....	26
3.2 Charakterisierung postsynaptischer GABA-Rezeptoren.....	31
3.3 Bestimmung des Umkehrpotentials für GABA- und Muscimol-induzierte Ströme.....	39
3.4 Biphasische GABA-induzierte Ströme	41
3.5 Modulation inhibitorischer Afferenzen der MC.....	42
4 Diskussion.....	51

4.1	Methodische Betrachtung	52
4.2	Charakterisierung der abgeleiteten Zellen als Martinotti-Zellen.....	54
4.3	Charakterisierung GABA-Rezeptoren auf der postsynaptischen Membran.....	56
4.4	GABA _B -Rezeptoren auf der präsynaptischen Membran	59
4.5	Physiologische Relevanz und Ausblick.....	63
5	Zusammenfassung.....	67
6	Anhang	69
7	Literaturverzeichnis	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: <i>Barrel</i> -Kortex im Nativpräparat.....	5
Abbildung 1.2: Übersicht GABA-Rezeptoren.....	11
Abbildung 2.1: Angewendete Stimulationsmethode zur Untersuchung von eIPSC	20
Abbildung 2.2: Lichtmikroskopische Aufnahme 2,5-Facher Vergrößerung eines thalamokortikalen Schnittes	21
Abbildung 2.3: Ermittlung eIPSC-relevanter Parameter.....	24
Abbildung 3.1: Elektrophysiologische Charakterisierung abgeleiteter Martinotti-Zellen.....	27
Abbildung 3.2: Lichtmikroskopisches Bild und Rekonstruktion einer Martinotti-Zelle in der Schicht II/III des somatosensorischen Kortex	30
Abbildung 3.3: Lichtmikroskopisches Bild und Rekonstruktion einer Martinotti-Zelle in der Schicht II/III des somatosensorischen Kortex	31
Abbildung 3.4: Lokale Druckapplikation von GABA, Muscimol und Baclofen	33
Abbildung 3.5: Konzentrationsabhängige Wirkung von GABA, Muscimol und Baclofen	34
Abbildung 3.6: Konzentrationsabhängige postsynaptische Wirkung verwendeter GABA _A - Rezeptoren-Agonisten	36
Abbildung 3.7: Blockierung GABA-/ Muscimol-induzierter Ströme.....	38
Abbildung 3.8: Umkehrpotentialbestimmung von GABA- und Muscimol-induzierten Strömen an Martinotti-Zellen	40
Abbildung 3.9: Biphasische Effekte in Abhängigkeit von der Applikationsdauer.....	41
Abbildung 3.10: Pharmakologische Modulation von eIPSC mittels Baclofen.....	44
Abbildung 3.11: Synaptische Kurzzeitplastizität von eIPSC bei Zweifach-Stimulationen.....	46
Abbildung 3.12: Effekt von Baclofen auf die eIPSC bei Zweifach-Stimulationen.....	47
Abbildung 3.13: Synaptische Kurzzeitplastizität von eIPSC bei Mehrfachstimulation- Stimulationen.....	49
Abbildung 3.14: Modulation der Kurzzeitplastizität durch GABA _B -Rezeptoren.....	50
Abbildung 4.1: Schematische Modellvorstellung zur synaptischen Verschaltung von inhibitorischen Terminalen auf Martinotti-Zellen.....	66
Abbildung 6.1: Badapplikation von Baclofen	69
Abbildung 6.2: Lokale Druckapplikation von GABA und Baclofen in unterschiedlichen Distanzen zur abgeleiteten Zelle	70
Abbildung 6.3: Abhängigkeit der elektrisch induzierten postsynaptischen Ströme von der extrazellulären Kalziumkonzentration	71
Abbildung 6.4: Pharmakologische Modulation von eEPSC mittels Baclofen	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Zusammensetzung verwendeter Lösungen	25
Tabelle 2.2: Experimentabhängige Zusätze.....	25
Tabelle 3.1: Zusammenfassung elektrophysiologischer Eigenschaften untersuchter MC	29
Tabelle 2.2: Statistische Analyse der einzelnen eIPSC bei repetitiver Mehrfachstimulation.....	72

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode; <i>avidin-biotin-complex-method</i>
ACSF	künstliche Zerebrospinalflüssigkeit; <i>artificial cerebrospinal fluid</i>
AHP	Nachhyperpolarisation; <i>afterhyperpolarization</i>
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholecystokinin
CO	Cytochrom-C-Oxidase
CR	Calretinin
DAB	3,3'-Diamino-benzidin-tetrahydrochlorid
EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom; <i>excitatory postsynaptic current</i>
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential; <i>excitatory postsynaptic potential</i>
eIPSC	evozierter inhibitorischer postsynaptischer Strom; <i>evoked inhibitory postsynaptic current</i>
fAHP	Schnelle Nachhyperpolarisation; <i>fast afterhyperpolarization</i>
GABA	γ -Aminobuttersäure; <i>γ-aminobutyric acid</i>
GABA _A zin	4-[6-imino-3-(4-methoxyphenyl)pyridazin-1-yl] butanoic acid hydrobromide: GABA _A -Rezeptor-Antagonist
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GIN	GFP-exprimierende inhibitorische Neurone (<i>GFP-expressing inhibitory neurons</i>)
IIN	inhibitorisches Interneuron
IPSC	inhibitorischer postsynaptischer Strom; <i>inhibitory postsynaptic current</i>
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential; <i>inhibitory postsynaptic potential</i>
IR-DODT	Infrarot-Schrägbeleuchtung nach Dodt
MC	Martinotti-Zellen
Na	Natrium
NBQX	2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxaline: AMPA-und Kainatrezeptor-Antagonist
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat: Spezifischer Glutamat-Rezeptor-Agonist
NPY	Neuropeptid Y
PB	Phosphatpuffer; <i>phosphate buffer</i>
PC	Pyramidenzelle
PFA	Paraformaldehydlösung
PSC	postsynaptischer Strom; <i>inhibitory postsynaptic current</i>
PSP	postsynaptisches Potential; <i>inhibitory postsynaptic potential</i>

PV	Parvalbumin
SII	sekundärer somatosensorischer Kortex
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler; <i>standard error</i>
SOM	Somatostatin
STD	depressive Kurzzeitplastizität (<i>short-term depression</i>)
TB	TRIS Puffer; <i>tris-buffer</i>
TBS	TRIS-gepufferte-Saline; <i>tris buffered saline</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Untereinheiten
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
ZNS	zentrales Nervensystem
5HT _{3a}	Serotonin (<i>5-Hydroxytryptamin</i>)-3a-Rezeptor

1 Einleitung

1.1 Das Nervensystem

Ein lebender Organismus steht in ständiger Interaktion mit der Umwelt. Für die Interaktion mit Umwelteinflüssen bedarf es einer komplexen Verarbeitung, um diese wahrnehmen und bewältigen zu können. Diese Verarbeitungsprozesse geschehen bei allen höheren Lebewesen im Nervensystem, welches sich in ein zentrales und ein peripheres Nervensystem unterteilen lässt. Das periphere Nervensystem ist mit seinen zahlreichen Ganglien und Nervensträngen im gesamten Körper repräsentiert. Funktionell betrachtet stellt es mit den afferenten Fasern eine Verbindung aus der Umwelt zum zentralen Nervensystem (ZNS) dar. Durch die efferenten Fasern sorgt es z.B. für eine Weiterleitung der motorischen Befehle an die Muskulatur. Sie stammen aus dem ZNS und sorgen somit für ein geordnetes und adäquates Zusammenspiel des Organismus mit der Umwelt. Im zentralen Nervensystem finden dazu vielfältige Verarbeitungsprozesse statt. Das zentrale Nervensystem ist klar zu lokalisieren. Es besteht aus dem Gehirn und dem Rückenmark, welche umgeben durch den knöchernen Schädel und der Wirbelsäule geschützt in der Zerebrospinalflüssigkeit eingebettet liegen. Makroskopisch betrachtet sind beim Gehirn helle und dunkle Strukturen zu erkennen. Die dunklen Strukturen werden als graue Substanz bezeichnet, in der sich überwiegend die Perikaryen der Neurone befinden. Bei den hellen Strukturen, welche als weiße Substanz bezeichnet werden finden sich vorwiegend die Fortsätze der Neurone. Die hellen Stellen hingegen werden als weiße Substanz bezeichnet. Die unterschiedliche Färbung entsteht durch den hohen Anteil an Lipiden, welche die zu- und abführenden Fasern der Nervenzellen umgeben. Diese Ummantelung dient für Axone als Isolierschicht und ermöglicht auf diese Weise eine schnellere Weiterleitung von Reizen.

Zu den funktionellen Grundeinheiten des Nervensystems zählen die Nervenzellen (Neurone). In Größe, Form und der Anzahl der Fortsätze können sich Neurone unterscheiden, jedoch bestehen sie in der Regel alle aus einem Zellkörper und mehreren Zellfortsätzen. Die Fortsätze kann man wiederum in Dendriten und Axone unterteilen. Dendriten nehmen erregende Reize auf und leiten diese zum Zellkörper hin. Über das Axon leitet ein Neuron seine Reize an andere Nervenzellen oder Erfolgsorgane weiter.

Sowohl an Dendriten als auch an Axonen findet die Weiteitung der Reize in elektrischer Form statt. An den terminalen Enden der Axone und den gesamten Dendriten befinden sich sogenannte Synapsen, sie verbinden die einzelnen Neurone untereinander. Dort findet die Reizübermittlung zu anderen Zellen in chemischer Form statt. Am terminalen Ende eines Axons befinden sich präsynaptische Endigungen. Diese wiederum sind mit membranumhüllten Bläschen (Vesikel) und einem für die Zelle spezifischen Botenstoff (Transmitter) gefüllt. Kommt nun ein Reiz in der präsynaptischen Endigung an, öffnen sich spannungsabhängige Ca^+ -Kanäle. Infolgedessen kommt es aufgrund der höheren Konzentration von Kalzium außerhalb der Zellmembran zu einem Einstrom von Kalzium in die Endigung. Das Kalzium wiederum ist für die Verschmelzung von Vesikeln mit der Membran verantwortlich. Durch diesen Vorgang gelangen die Botenstoffe in den synaptischen Spalt. Der synaptische Spalt stellt spezialisierten Extrazellularraum dar und lässt sich als eine ca. 20-30 nm große Lücke zwischen präsynaptischer und postsynaptischer Membran beschreiben. Auf der postsynaptischen Membran befinden sich Rezeptoren, sie sind spezifisch für den Transmitter aus der Präsynapse. Durch Anlagerung der Transmitter an die Rezeptoren werden sie aktiviert. Es sind meist spezifische Ionenkanäle, die nach Aktivierung geöffnet werden und durch unterschiedliche Konzentration zwischen Intra- und Extrazellularraum für einen Ionenfluss sorgen. Kommt es zu einem Einstrom von positiven Ionen bzw. Ausstrom von negativen Ionen, wird dieser Vorgang als Depolarisation bezeichnet. Im umgekehrten Fall spricht man von einer Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran. Auf der postsynaptischen Membran bewirken die hervorgerufenen Ionenströme, die man als postsynaptische Ströme bezeichnet (*postsynaptic currents*, PSC), eine Potentialänderung der postsynaptischen Membran. Diese Potentialänderung, auch postsynaptisches Potential (PSP) genannt, kann entweder erregend (EPSP) oder hemmend (IPSP) auf die Zelle wirken. Bei depolarisierenden Strömen werden diese als exzitatorische postsynaptische Ströme (EPSC) und bei hyperpolarisierenden als inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSC) bezeichnet. Inwieweit eine Zelle erregt bzw. gehemmt wird, hängt von ihrem Membranpotential und von der Ionenverteilung der Zelle im Vergleich zum Extrazellularraum ab. Ein Neuron steht stets unter dem Einfluss einer Vielzahl synaptischer Eingänge und den daraus exzitatorisch und inhibitorisch wirkenden Strömen, die zu einer Depolarisation bzw. Hyperpolarisation führen. Bei einem Neuron mit einem Ruhemembranpotential von -65 mV kommt es bei Öffnung eines Kaliumkanals zum Ausstrom von Kalium aus der Zelle, da zum einen die Konzentration von Kalium in der Zelle im Verhältnis zum Extrazellularraum um das 30-Fache höher ist. Die daraus resultierende chemische Triebkraft sorgt für einen Kaliumausstrom. Zum anderen werden

die positiven Kaliumionen durch die elektrischen Triebkräfte zusätzlich aus der Zelle gedrückt. Es summieren sich die Ströme, die für die gleichen Potentialänderungen sorgen. Exzitatorische und inhibitorische Potentiale bzw. Ströme können sich wiederum aufheben. Ob ein Neuron ein Aktionspotential auslöst, hängt davon ab, ob ausreichend exzitatorische Eingänge auf das Neuron einwirken, um das Schwellenpotential am Axonhügel bzw. Axoninitialsegment zu erreichen. Sowohl EPSC/IPSC als auch EPSP/IPSP lassen sich mit Hilfe elektrophysiologischer Verfahren messen und ermöglichen so Untersuchungen neuronaler Aktivität.

1.2 Somatosensorischer Kortex (*Barrel-Cortex*)

Der Neokortex gehört phylogenetisch zu den jüngsten Bereichen des Gehirns. Zwar unterscheidet sich dieser in seiner Grundstruktur nicht von anderen Hirnteilen, jedoch finden dort komplexe Abläufe statt, die unter anderem an der Verarbeitung von Sinnesinformation, Bewegungsabläufen, Lernvorgängen, Gedächtnis und anderen kognitiven Denkprozessen beteiligt sind. Er zeigt sechs horizontal verlaufende Schichten (Laminae), welche bei vertikaler Schnittführung zur Pia in der Nissl-Färbung deutlich zu erkennen sind. Die Schichtung entsteht durch die unterschiedliche Form, Größe und Zelldichte an Pyramidenzellen und Nicht-Pyramidenzellen. Trotz des sechsschichtigen Aufbaus gibt es lokale Unterschiede in verschiedenen Rindenregionen des Neokortex. Er wurde im Jahre 1909 von Brodmann in 52 verschiedene Felder eingeteilt. Auch heute noch dienen sie im klinischen Alltag als Referenz zur Beschreibung von Kortexregionen. Es zeigte sich trotz der histologischen Einteilung der einzelnen Areale eine enge funktionelle Verknüpfung dieser Bereiche. So entspricht die Area 1, 2 und 3 nach Brodmann dem somatosensorischen Primärfeld, dort werden somatosensorische Empfindungen wie Berührung verarbeitet. Beim Menschen befindet sich das somatosensorische Primärfeld auf dem Parietallappen im Bereich des Gyrus postcentralis. Dort ist einer bestimmten Körperstelle (Wahrnehmung der Umwelt) ein Abschnitt zugeordnet. Man bezeichnet das als somatotope Repräsentation und kann als Abbild in Form des Homunkulus ersehen werden. Dabei sind Körperregionen, wie z.B. das Gesicht oder die Finger, sehr groß und Rücken- und Beinpartie im Verhältnis eher klein repräsentiert. Dieses Phänomen steht in direktem Zusammenhang mit der Empfindlichkeit der einzelnen Körperpartien. Mit den Lippen oder den Fingern können beispielsweise räumlich wesentlich feinere und genauere Berührungen als mit den Beinen wahrgenommen werden (Kugler 2004). Die

hervorgerufenen Reize werden über das periphere Nervensystem zum Hirnstamm und von dort aus zum Thalamus weitergeleitet. Der Thalamus projiziert mit seinen Fasern bevorzugt in die Schicht IV des somatosensorischen Kortex (Simons 1978; Staiger et al. 1996; Petersen 2007; Feldmeyer 2012). Der primäre somatosensorische Kortex wiederum projiziert in andere Kortexareale wie den sekundären somatosensorischen Kortex (SII) (Carvell und Simons 1987; Fabri und Burton 1991).

Nach demselben Prinzip findet auch bei anderen Säugern die sensorische Wahrnehmung statt. Die einzelnen Körperpartien werden jedoch von Art zu Art verschieden stark abgebildet. So ist bei Mäusen und Ratten aufgrund der taktilen Empfindung ihrer Schnurrhaare (Vibrissen) dieser Bereich überdimensional groß repräsentiert. Vibrissen stellen ein komplexes Sinnesorgan des somatosensorischen Systems dar. Die Tiere sind in der Lage, mit rhythmischen Bewegungen die Schnurrhaare vor- und zurückzubewegen, um auf diese Art und Weise ihre direkte Umwelt aktiv taktil wahrzunehmen (Woolsey und Van der Loos 1970, Woolsey et al. 1975; Wineski 1985; Carvell und Simons 1990). Der somatosensorische Kortex von vielen Nagetieren zeigt neben dem sechsschichtigen Aufbau in der Schicht IV einen besonderen zytoarchitektonischen Aufbau durch neuronale Verdichtung (Welker und Woolsey 1974). Bei tangentialen Schnitten durch den somatosensorischen Kortex erkennt man bereits bei nativen Präparaten säulenartige dunklere Stellen, welche stark an Fässer (*barrel*) erinnern. Dies sind Zellverdichtungen, denen der somatosensorischen Kortexabschnitt von Mäusen und Ratten seinen Namen zu verdanken hat. Bei einem Schnitt durch die Schicht IV lassen sich den einzelnen *Barrels* die entsprechenden somatotopen Vibrissen isomorph zuordnen (Woolsey 1967; Woolsey und Van der Loos 1970). Diese Zuordnung ist jedoch nicht nur auf die Schicht IV beschränkt. Man ist der Ansicht, dass die somatotope Gliederung sich auch vertikal durch alle Kortexschichten zieht und auf diese Weise eine funktionelle Einheit der einzelnen Regionen darstellt. Zwischen den einzelnen Fässerstrukturen sind Bereiche mit zellärmeren Regionen zu erkennen, sie werden als Septen bezeichnet (Woolsey und Van der Loos 1970). So entspricht jedem *Barrel* eine Säule, die als Kolumne bezeichnet wird. Aufgrund dieses Aufbaus geht man davon aus, dass die einzelnen Kolumnen nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell engzusammen gehören (Mountcastle et al. 1957; Simons 1978; Armstrong-James et al. 1992;). Wegen dieser als Modulkonzept bezeichneten Annahme steht der *Barrel*-Kortex im Fokus der Wissenschaft (Modellsystem), da man sich so erhofft, die Informationsverarbeitung der einzelnen rezeptiven Schaltkreise nachvollziehen zu können und anschließend auf alle anderen Bereiche des Neokortex übertragen zu können.

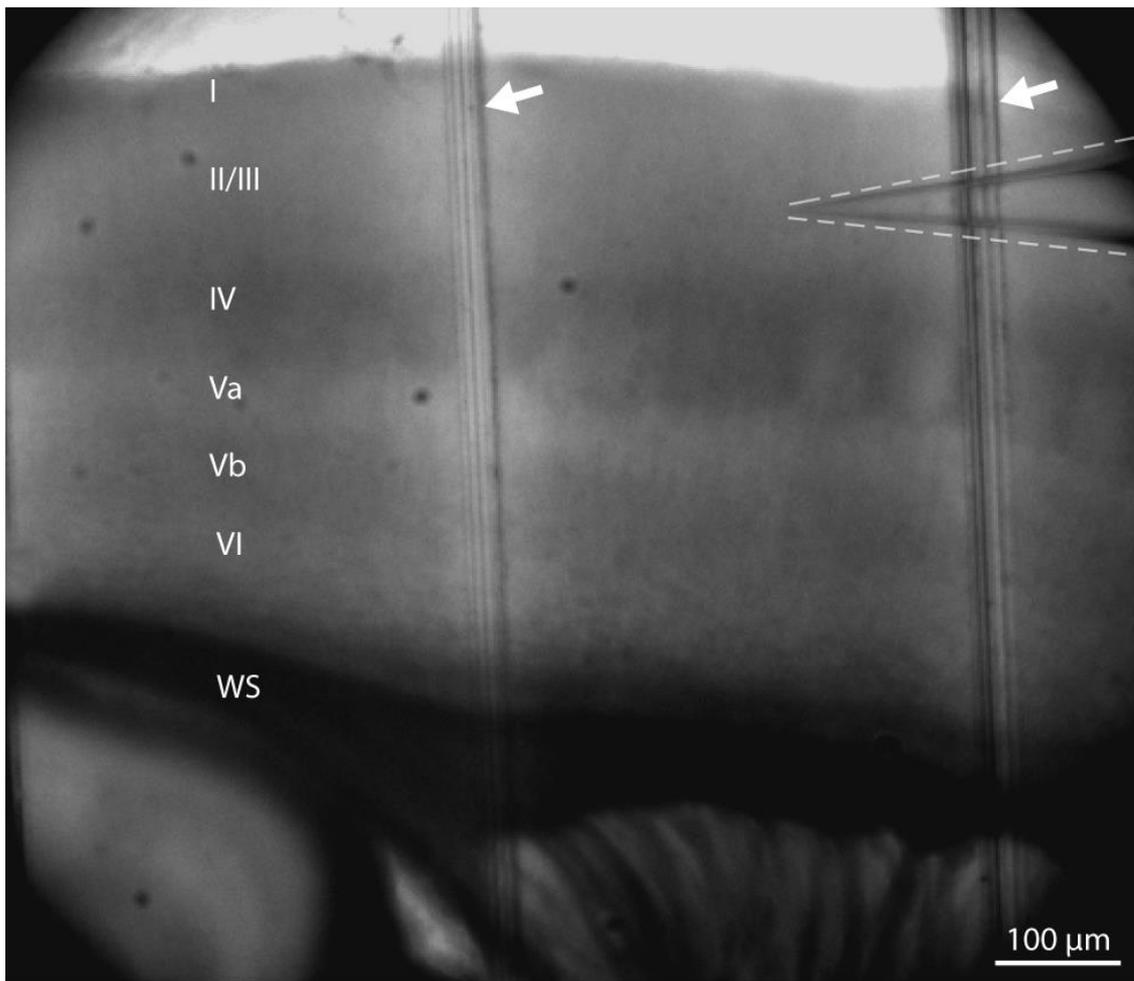


Abbildung 1.1 *Barrel*-Kortex im Nativpräparat

Lichtmikroskopische Aufnahme (2,5-Faches Objektiv) eines akuten 300 µm dicken thalamokortikalen Hirnschnittes einer GIN-Maus im Bereich des *Barrel*-Kortex. In der Schicht IV sind die fässchenartigen Strukturen gut zu erkennen. Vertikal verlaufende Strukturen, welche → markiert sind, stellen das *Grid* (Fixierungsgitter) zur Fixierung des Gewebes dar. Die Glaskapillare (von rechts kommend) repräsentiert mit ihrer Spitze den Ort der Ableitung.

Es gibt eine große Vielfalt an exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen im somatosensorischen Kortex. Dabei zählen die Pyramidenzellen (PC), die Sternpyramidenzellen (*star pyramid*) und die bedornten Sternzellen (*spiny stellate cells*) zu den bisher bekannten exzitatorischen Neuronen. Diese enthalten Glutamat als exzitatorischen Neurotransmitter (Staiger et al. 2004). Die inhibitorischen Zellen des somatosensorischen Kortex zeigen eine weitaus größere Vielfalt und lassen sich in verschiedene morphologische, biochemische oder physiologische Kategorien einordnen. Als eine Gemeinsamkeit nutzen sie GABA als hemmenden Neurotransmitter. Nach der morphologischen Einteilung enthält der *Barrel*-Kortex Korbzellen (*basket cells*), kleine

Korbzellen, große Korbzellen, Nestkorbzellen, Kronleuchter- (*chandelier*), doppelter Blumenstrauß (*double bouquet*), doppelt gebüschelte- (*bitufted*), Bipolar-, Martinotti- und Neurogliaforme-Zellen mit deren charakteristischem Aussehen (Markram et al. 2004; Fox und Woolsey 2008, DeFelipe et al. 2013, Staiger et al. 2015).

1.3 Martinotti-Zellen

Martinotti-Zellen (MC) gehören zu der Gruppe der inhibitorischen Interneurone. Sie wurden erstmals im Jahre 1889 von Carlo Martinotti beschrieben. Diese sind in vielen Spezies nachgewiesen worden und scheinen ubiquitär in allen Kortexregionen vorhanden zu sein (Wang et al. 2004). Martinotti-Zellen besitzen meist einen ovalen oder spindelförmigen Zellkörper (Wang et al. 2004). Aufgrund der Form ist eine Orientierung festzustellen, diese ist in der Großhirnrinde meist vertikal angeordnet. An den beiden Polen des Zellkörpers entspringen in der Regel mehrere Dendritenstämme. Die Dendritenstämme verzweigen sich und ziehen zu verschiedenen Schichten der Großhirnrinde. Der Großteil der Dendritenziele liegt in tieferen Schichten, jedoch ist die Verteilung in lateraler Ebene meist nur auf die Kolumne beschränkt, in der die Zelle auch liegt. Die axonale Ausbreitung von Martinotti-Zellen zeigt ein sehr charakteristisches Verlaufsmuster. Das Axon entspringt typischerweise an der ersten oder zweiten Verzweigung eines Dendriten und zieht größtenteils in die Schicht I des Kortex (Wang et al. 2004). An dieser Stelle finden eine massive Verzweigung und eine weite Ausbreitung des Axons in lateraler Ebene statt. Es kann sich bis zu zwei Millimeter weit erstrecken und ist dadurch das typische morphologische Erscheinungsbild von Martinotti-Zellen. Es sind ebenso einzelne Abgänge des Axons um den Zellkörper vorhanden und ein bis zwei Axonkollaterale, die in tiefere Schichten ziehen. Martinotti-Zellen projizieren somit nicht nur auf ihre Heim-Kolumne, sondern besitzen synaptische Verbindungen zu Neuronen in den Nachbarkolumnen (Wang et al. 2004, Markram et al. 2004).

Nach biochemischen Gesichtspunkten sind Martinotti-Zellen eine Untergruppe von Somatostatin exprimierenden GABAergen Interneuronen. Trotz ihrer Vielfältigkeit im Neokortex lassen sich GABAerge Interneurone zu fast 100 Prozent in drei molekular nicht überlappende Gruppen einteilen: die Parvalbumin (PV)-exprimierenden, die Somatostatin (SOM)-exprimierenden und die 5HT_{3a}-Rezeptor-exprimierenden Zellen (Rudy et al. 2011). Letztere lassen sich weiter in die Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP-) positiven und nicht-VIP-Zellen unterscheiden. Für Martinotti-Zellen ist bekannt, dass sie für SOM

positiv und sowohl für PV als auch VIP negativ sind. Weiterhin können Martinotti-Zellen weitere biochemische Marker wie Calretinin (CR), Neuropeptid Y (NPY) und Cholecystokinin (CCK) aufweisen. Dies scheint offenbar von der Lage in den verschiedenen Schichten abhängig zu sein (Wang et al. 2004; Rudy et al. 2011; DeFelipe et al. 2013).

Martinotti-Zellen zeigen in ihren aktiven elektrophysiologischen Eigenschaften zu 90 Prozent ein adaptierendes Aktionspotentialfeuermuster bei langanhaltenden depolarisierenden Stromapplikationen. Ein weitaus geringerer Teil (8 %), besitzt ein nicht adaptierendes Antwortverhalten und 2 % der Zellen zeigen Antworten mit einem unregelmäßigen Feuermuster (Wang et al. 2004). Die bisher bekannten exzitatorischen Eingänge, welche auf MC projizieren, werden durch lokale Pyramidenzellen hervorgerufen. Einige Martinotti-Zellen wiederum hemmen sowohl die erregende Pyramidenzellen (PC) als auch die PC in räumlicher Nähe reziprok (Silberberg und Markram 2007; Gentet et al. 2012). Der wesentlich größere Teil der Projektionen von Martinotti-Zellen ziehen jedoch in die Schicht I des Kortex und terminiert letztendlich auf den Dendriten von Pyramidenzellen (Wang et al. 2004; Silberberg und Markram 2007). Martinotti-Zellen selbst werden bei aktiven Bewegung der Vibrissen durch andere GABAerge Interneurone inhibiert (Gentet et al. 2012). Dabei scheinen VIP-Zellen eine bedeutende Rolle einzunehmen und werden zurzeit verstärkt untersucht. Inhibitorische Eingänge von VIP-Zellen auf Martinotti-Zellen konnten sowohl im somatosensorischen (Staiger et al. 2004, Lee et al. 2013) als auch im visuellen (Pfeffer et al. 2013) und auditiven (Pi et al. 2013) Kortex nachgewiesen werden. Deren Bedeutung ist derzeit nur ansatzweise verstanden und werden mit dem Prinzip der vorwärts- (*feedforward*) gerichtete Inhibition diskutiert (Lee et al. 2013).

1.4 GABA-Rezeptoren

Die Erregungsbildung und Erregungsfortleitung gehört zu den wichtigsten Mechanismen zur Ausübung von Funktion im Nervensystem. Um dies ermöglichen zu können, ist ein Fluss von Ionen an der Membran der Nervenzellen nötig. Eine Membran, die aus einer Lipiddoppelschicht aufgebaut ist, ist für polare und geladene Moleküle nicht durchlässig. In Folge dessen stellt die Membran eine gute Isolation für Wasser, Ionen und andere polare Teilchen dar. Um dennoch für Ionen durchlässig zu sein, befinden sich in der Membran Ionenkanäle. Ionen sind geladene Teilchen und lassen sich grundsätzlich in

positiv geladene Kationen und negativ geladenen Anion unterteilen. Ionenkanäle sind Proteine, die durch die Membran gehen und eine Diffusion für Ionen ermöglichen. Diese können entweder selektiv für eine Art von Ionen, wie zum Beispiel Kalium sein, oder aber unselektiv verschiedene Ionen durchlassen. Für die Informationsverarbeitung und die Fortleitung von Aktionspotentialen ist eine Ruhespannung (Ruhemembranpotential) der Neurone als Ausgangsniveau wichtig. Um dies hervorzurufen, darf es nicht zum freien Fluss von Ionen durch die Membran kommen. Deswegen sind Ionenkanäle nicht durchgehend geöffnet. Es besteht die Möglichkeit diese in den geschlossenen, inaktiven Zustand zu versetzen. Die Aktivierung bzw. Inaktivierung kann auf verschiedene Weise erreicht werden und hängt von der Art des Ionenkanals ab. Es gibt spannungsabhängige Kanäle, sie werden durch eine bestimmte Spannung aktiviert oder inaktiviert, so wie bei den spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen für die Bildung von Aktionspotentialen. Diese sind meist nach Aktivierung für eine bestimmte Zeit offen und gehen anschließend wieder in den inaktiven Zustand zurück. Eine weitere Möglichkeit, einen Ionenkanal zu öffnen, ist eine Aktivierung mittels eines Botenstoffes. Dieser Botenstoff wird an der Präsynapse freigesetzt, gelangt in den synaptischen Spalt und besetzt den für den Botenstoff spezifischen Rezeptor an der Postsynapse. Der dadurch aktivierte Rezeptor kann entweder eine Signalkaskade in Gang setzen und indirekt einen Ionenkanal öffnen, diese Art der Rezeptoren werden als metabotrope Rezeptoren bezeichnet oder der Rezeptor selbst ist ein Ionenkanal und wird durch den Botenstoff geöffnet. Man bezeichnet sie als ligandenaktivierte/ionotrope Rezeptoren. Aufgrund zellspezifischer Botenstoffe bzw. Rezeptoren kann so die Erregung selektiv an eine bestimmte Zielzelle weitergeben werden. Zu den wichtigsten Botenstoffen im Kortex, den sogenannten Transmittern, gehören Glutamat und GABA. Glutamat stellt einen erregenden, GABA einen hemmenden Transmitter dar. So kommt es bei Glutamat Ausschüttung direkt oder über eine Signalkaskade zu einem Einstrom von Kationen oder einen Ausstrom von Anionen aufgrund des elektrochemischen Gradienten in der Postsynapse der Zielzelle. Bei hemmenden Transmittern, wie GABA, ist es umgekehrt und die Zelle wird in adulten Organismen unter physiologischen Bedingungen meist hyperpolarisiert.

Der Transmitter GABA wird im zentralen Nervensystem von Neuronen und Gliazellen durch das Enzym Glutamatdecarboxylase aus Glutamat gebildet. GABA wird in Neuronen in Vesikel verpackt und durch in die Präsynapse einlaufende Aktionspotentialen in den synaptischen Spalt freigesetzt. Nach erfolgter Aktivierung der Rezeptoren an der postsynaptischen Membran, wird GABA größtenteils in die Präsynapse rückresorbiert und erneut in Vesikel verpackt oder es erfolgt eine Aufnahme durch Gliazellen (Olsen et al.

1991; Iversen 2006; Bowery und Smart 2006; Zhou und Danbolt 2013). Ein Teil wird über den sogenannten GABA Nebenweg (*GABA-Shunt*) über den Zitratzyklus abgebaut (Bach et al. 2009). Es gibt drei Arten von GABA-Rezeptoren. Davon sind der GABA_A-Rezeptor und der GABA_C-Rezeptor ionotrop und der GABA_B-Rezeptor metabotrop (Bormann 1988; Olsen et al. 1991; Chebib und Johnston 1999; Bormann 2000; Bowery et al. 2002). Abbildung 1.2 zeigt eine schematische Darstellung der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren. Dabei sind die GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren in nahezu allen Bereichen des zentralen Nervensystems der Nager nachgewiesen worden (Bowery et al. 1987).

1.4.1 GABA_A-Rezeptoren

Die ionotropen GABA_A-Rezeptoren sind unselektive Ionenkanäle, welche für Anionen permeabel sind ($\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{F}^-$) (Bormann 1988). Unter physiologischen Verhältnissen im Organismus bekommen nur Chloridionen $[\text{Cl}^-]$ und in geringeren Mengen Bicarbonationen $[\text{HCO}_3^-]$ eine Relevanz beim Ionenfluss durch den Ionenkanal (Olsen und Sieghart 2008; Connolly 2013). Bei Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren hängt die anschließende Wirkung vom Membranpotential der Zelle und vom Gleichgewichtspotential für Chlorid ab. In der Regel ist das Gleichgewichtspotential negativer als das Ruhemembranpotential, so dass es zu einem Chlorideinstrom kommt und die Zelle hyperpolarisiert wird. In der frühen postnatalen Entwicklung oder bei pathologischen Prozessen kann das Gleichgewichtspotential von Chlorid positiver als das Membranpotential der Zelle sein, so dass eine Kanalöffnung zu einem Chloridausstrom und damit zu einer Depolarisation der Zelle führt. GABA_A-Rezeptoren werden aus fünf Untereinheiten (UE) aufgebaut, die wiederum aus vier membrandurchspannenden Domänen bestehen. Trotz dieses homologen Aufbaus der GABA_A-Rezeptoren gibt es eine große Vielfalt an unterschiedlichen UE Zusammensetzungen (Johnston 1996). Bei GABA_A-Rezeptoren sind 19 verschiedene Untereinheiten bekannt ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , θ , π und $\rho 1-3$). Die daraus resultierende große Vielfalt verschiedener GABA_A-Rezeptoren führt zu diversen pharmakologischen und physiologischen Eigenschaften (Sieghart 1995; Olsen und Sieghart 2008; Connolly 2013). Dabei bestehen ein Großteil der GABA_A-Rezeptoren aus zwei α , zwei β und einer γ oder δ Untereinheiten (Sieghart und Sperk 2002). GABA_C-Rezeptoren sind zunächst aufgrund ihrer Unempfindlichkeit gegenüber Bicucullin und Baclofen in eine dritte Gruppe der GABA-Rezeptoren eingeteilt worden. Jedoch hat sich gezeigt, dass sie zu der Familie der GABA_A-Rezeptoren gehören und lediglich eine Untergruppe dieser darstellen (Olsen und Sieghart 2008, Tan et al. 2011, Enna und McCarson 2013). Im Gegensatz zu GABA_A-Rezeptoren weisen GABA_C-

Rezeptoren eine heterogene UE-Zusammensetzung aus ρ -Untereinheiten auf. Durch ihre UE-Konstellationen zeigen sie unterschiedliche physiologische und pharmakologische Eigenschaften (Bormann und Feigenspan 1995; Bormann 2000; Olsen und Sieghart 2008; Olsen und Sieghart 2009). Um die GABA_A-Rezeptoren zu aktivieren, müssen zwei GABA Moleküle (Macdonald und Olsen 1994) an die Bindungsstelle auf dem extrazellulärem Abschnitt zwischen den α - und β -Untereinheiten binden (Bowery und Smart 2006).

1.4.2 GABA_B-Rezeptoren

GABA_B-Rezeptoren bilden weitestgehend eine heterodimere Struktur mit zwei unterschiedlichen Untereinheiten (GABA_{B1}+GABA_{B2}). Es sind jedoch auch tetramere und oligomere Strukturen beschrieben worden (Xu et al. 2014). Im Gegensatz zu den ionotropen GABA_A-Rezeptoren besitzen die GABA_B-Untereinheiten sieben membrandurchspannende Domänen. Die Bindungsstelle für GABA oder den Agonisten Baclofen befindet sich an dem N-terminalen Abschnitt der GABA_{B1}-Untereinheit. Durch die Bindung an dieser Untereinheit entsteht eine Konformationsänderung und es bildet sich eine coiled-coil Struktur der C-terminalen Enden zwischen den GABA_{B1}- und den GABA_{B2}-Untereinheiten aus. Der entstehende Effekt ist eine Trennung des G-Protein-Komplexes vom GABA_B-Rezeptor. Bei diesem Vorgang dissoziiert die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins von der membranständigen α -Untereinheit. Zum einem resultiert daraus eine Aktivierung der Adenylatcyclase, welche wiederum durch ihre enzymatische Aktivität ATP in cAMP umwandelt. Das cAMP wirkt als intrazellulärer Botenstoff (*second messenger*) mit vielen spezifischen Funktionen. Zum anderen aktivieren die dissoziierten $\beta\gamma$ -Untereinheiten direkt K⁺-Kanäle und inaktivieren Ca⁺-Kanäle (Olsen et al. 1991; Bormann und Feigenspan 1995; Bowery et al. 2002; Bowery und Smart 2006; Olsen und Sieghart 2008; Xu et al. 2014).

1.4.3 Agonisten und Antagonisten

Es gibt zahlreiche spezifische Agonisten und Antagonisten für die diversen GABA-Rezeptoren. Hier seien lediglich einige aufgeführt, die für diese Arbeit relevant sind. GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren lassen sich durch Muscimol und TACA (trans-4-Aminocrotonsäure, *trans-4-aminocrotonic-acid*) aktivieren. Als reversibler Antagonist für GABA_A-Rezeptor wurde GABAzin (SR-95531) beschrieben. Er zeigt auch eine geringe Sensitivität für GABA_C-Rezeptoren. CACA (cis-4-Aminocrotonsäure, *cis-4-aminocrotonic-acid*)

aktiviert selektiv den GABA_C-Rezeptor (Bormann und Feigenspan 1995). Durch Bicucullin wird der GABA_A-Rezeptor geblockt und hat keinen Effekt auf GABA_C-Rezeptoren (Chebib und Johnston 1999). TPMPA (1,2,5,6-tetrahydropyridine-4-yl) hingegen blockiert selektiv nur den GABA_C-Rezeptor (Bormann 2000). GABA_B-Rezeptoren sind unempfindlich gegenüber Muscimol, TPMPA und GABAzin. Baclofen hingegen aktiviert den GABA_B-Rezeptor und hat keine Wirkung auf die ionotropen GABA-Rezeptoren (Olsen und Sieghart 2008). Durch CGP35348 ((3-Aminopropyl)-(diethoxymethyl) phosphinic acid) und CGP52432 (3-[[[(3,4-Dichlorophenyl)methyl]amino]propyl]diethoxymethyl)-phosphonic acid) lässt sich der metabotrope GABA_B-Rezeptor selektiv blockieren. Dabei zeigt CGP52432 eine hohe Affinität zu den GABA_B-Rezeptoren auf den präsynaptischen Terminalen (Lanza et al. 1993) und wurde somit für den präsynaptischen Versuchsaufbau verwendet.

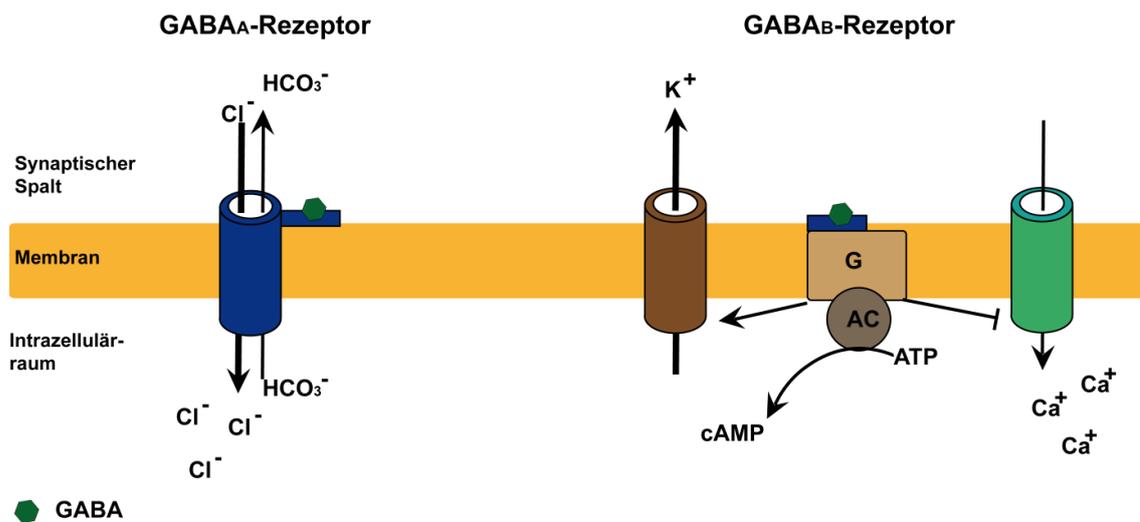


Abbildung 1.2 Übersicht der GABA-Rezeptoren

Vereinfachte Darstellung von GABA_A- (links) und GABA_B-Rezeptoren (rechts) mit den jeweils relevanten Ionenflüssen im physiologischen Zustand. Beim GABA_A-Rezeptor kommt es durch direkte transmittervermittelte Aktivierung des Ionenkanals zu Gradienten vermittelten Ionenströmen von Chlorid und Hydrogencarbonat. Der metabotrope GABA_B-Rezeptor entfaltet seine Funktion, indem er eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt, die wiederum ebenfalls Ionenkanäle öffnet und dadurch die Durchlässigkeit für Kalium erhöht und Kalzium erniedrigt.

1.5 Fragestellung

In dieser Arbeit sollen Martinotti-Zellen der Schicht II/III des somatosensorischen Kortex in Hinblick auf die Expression von GABA-Rezeptoren untersucht werden. Martinotti-Zellen stellen eine Untergruppe von inhibitorischen GABAergen Interneuronen dar, denen eine wesentliche Beteiligung an der sensorischen Informationsverarbeitung zugesprochen wird (Kepecs und Fishell 2014). Sie selbst werden unter anderem durch VIP-positive Interneurone inhibiert (Pfeffer et al. 2013, Lee et al. 2013, Pi et al. 2013), wobei deren synaptischer inhibitorischer Wirkungsmechanismus nicht vollständig geklärt ist.

Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die postsynaptische Membran der MC in Hinblick auf die Expression von ionotropen und metabotropen GABA-Rezeptoren untersucht. Hierzu wurden die Martinotti-Zellen mit Hilfe der Patch-Clamp Technik abgeleitet und deren Reaktionen auf ausgewählte Pharmaka detektiert. Dabei wurden sowohl lokale Druckapplikationen als auch Badapplikationen von spezifischen Agonisten und Antagonisten des ionotropen GABA_A-Rezeptors und des metabotropen GABA_B-Rezeptors durchgeführt. Weiterhin soll den Fragen nachgegangen werden: Sind metabotrope GABA_B-Rezeptoren an den inhibitorischen Eingängen der Martinotti-Zellen vorhanden? Inwieweit lässt sich darüber die GABAerge synaptische Transmission modulieren? Für die Untersuchung der präsynaptischen Eingänge wurden diese mittels einer bipolaren Stimulationselektrode elektrisch gereizt und die postsynaptisch ausgelösten inhibitorisch postsynaptischen Membranströme (eIPSC) aufgezeichnet. Anschließend erfolgte ein Einwasch spezifischer GABA_B-Rezeptor-Agonisten und Antagonisten, um die präsynaptischen inhibitorischen Terminalen zu beeinflussen.

Diese Arbeit soll einen Beitrag für das Verständnis der Verschaltung der Martinotti-Zellen mit ihren präsynaptischen vorgeschalteten Neurone leisten. Insbesondere stand die Aktivierung beider Rezeptortypen durch eine synaptische GABA-Ausschüttung und deren physiologische Wirkung auf die MC selber bzw. deren Eingänge im Fokus der Untersuchungen. Die erhobenen Ergebnisse sollen einen Beitrag für das Verständnis dieses komplexen Netzwerkes GABAerger Interneurone erbringen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Präparation

Für die Versuche wurden transgene Mäuse der Linie GIN (Tg(GadGFP)^{4570wn}) aus der Zucht der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen verwendet. Die Untersuchungen wurden an Tieren im postnatalen Alter von 21-27 Tagen (P21-27) unabhängig von ihrem Geschlecht durchgeführt. Die Haltung der Versuchstiere sowie der experimentelle Vorgang erfolgten unter Einhaltung der Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes (2010).

Die Versuchstiere wurden mit Isofluran betäubt und bei Ausbleiben des Lidschlussreflexes durch Dekapitation getötet. Anschließend wurde mittels einer Schere ein sagittaler Hautschnitt von dorsal nach rostral bis hin zu den Augen durchgeführt und das Fell vom anliegenden Knochen mobilisiert. Um das Gehirn aus der Schädelkalotte zu lösen, wurde mit einer feinen Schere der Schädelknochen durch einen sagittalen Schnitt entlang der Knochennaht eröffnet und anschließend mit einer feinen Pinzette nach lateral weggeklappt. Das nun freiliegende Gehirn wurde zunächst mit einem Spatel an den Riechkolben durchtrennt, unter Schonung des Großhirns aus der Schädelbasis gelöst und unmittelbar im Anschluss in eine gekühlte Präparierlösung überführt. Nach einer zwei-minütigen Verweildauer des Gehirns in der Präparierlösung wurde es mit einem Löffel entnommen und auf dem Deckel einer Petrischale positioniert. Darauf erfolgte eine Durchtrennung der beiden Hemisphären mit einer Rasierklinge. Die Hemisphären wurden mit der jeweiligen Schnittkante aufliegend auf einem Objektträger durch Sekundenkleber fixiert. Es folgte ein standardisierter Schnitt der Hemisphären rostral des Kleinhirns in einem annähernd 30 °-Winkel-Frontalschnitt. Im Anschluss wurden die Hirnhemisphären mit der Frontalschnittfläche auf der Probenplatte eines Vibratoms mit Sekundenkleber befestigt und in der Vibratomschale mit gekühlter Präparierlösung bedeckt. Nun begann die Anfertigung von thalamokorticalen Schnitten mit einer Dicke von 300 µm mittels des Vibratoms (Leica VT1200S, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland). Pro Hemisphäre konnten 4-5 Schnitte für die spätere Messung gewonnen werden. Diese wurden zuerst mit einer großlumigen Pipette in eine auf 34° C erwärmte, mit Carbogen gesättigte, künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (*artificial cerebrospinal fluid*, ACSF) überführt und für 30 Minuten dort belassen. Anschließend wurden die Schnitte auf Raumtemperatur für maximal sechs

Stunden gehalten, bis sie für die Experimente ausgewählt wurden. Der gesamte Präparationsvorgang dauerte nicht länger als 22 Minuten, um eine hohe Überlebenswahrscheinlichkeit der Nervenzellen zu gewährleisten. Sowohl die Präparations- als auch die ACSF-Lösung waren mit Carbogen gesättigt (95 % CO₂ + 5 % O₂).

2.2 Die Patch-Clamp-Methode

Die Patch-Clamp-Methodik (Methode der Spannungsfleckklemme) wurde im Jahr 1976 von Bert Sakmann und Erwin Neher entwickelt. Sie baut auf eine zuvor schon angewendete Techniken auf, wie zum Beispiel die Methode der Spannungsklemme, welche bereits in den Jahren um 1930 von Kenneth Chole und H. J. Curtis zum Nachweis und zur Ermittlung von Potentialabhängigkeit und Membranleitfähigkeit einzelner Nervenzellen diente. Für Sakmann und Neher als Grundlage dienend, entwickelten sie daraus die Patch-Clamp-Methode, die es fortan an ermöglichte, elektrische Ströme zu ermitteln, welche über einen bestimmten Zellmembranfleck (*Patch*) fließen. Mittels dieser elektrophysiologischen Messmethode können somit die elektrischen Eigenschaften von einzelnen Transmitterrezeptoren und Ionenkanälen erforscht werden.

Bei der Patch-Clamp-Methode nähert man sich mit einer mit Elektrolytlösung gefüllten Glaspipette einer Zelle an. Ist ein Kontakt zwischen Pipette und Zellmembran entstanden, bildet sich ein Widerstand. Durch Ablassen des Überdrucks in der Pipette, einen leichten Saugimpuls und den damit kurzzeitig ausgelösten Unterdruck erhöht sich der Widerstand, ($>1 \text{ G}\Omega$), und man kommt in den sogenannten *cell-attached*-Modus, indem ein Widerstand, der $1 \text{ G}\Omega$ überschreitet, entsteht. Dieser Widerstand, der auch als *seal* oder *gigaseal* bezeichnet wird, ist ein Gütekriterium für die Abdichtung zwischen der Glaskapillare und dem Membranfleck. Bei stabilem Abdichtwiderstand kann durch einen weiteren Saugimpuls die Membran durchbrochen werden und somit eine direkte Verbindung zwischen der Elektrolytlösung in der Pipette und der Intrazellularflüssigkeit hergestellt werden. Diese als *whole-cell*-Modus (*whole cell* = ganze Zelle) bezeichnete Konfiguration ermöglicht es, Ströme über die gesamte Zellmembran zu messen und so spontane oder evozierte Veränderungen zu detektieren. Aufgrund der Tatsache, dass die Pipettenlösung im direkten Kontakt mit dem Zytosol steht, sollte sie der Elektrolytlösung des Zytosols entsprechen, um die nativen Eigenschaften der Zelle nicht wesentlich zu beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Messungen in der *whole-cell*-Konfiguration durchgeführt. Bei dieser Messanordnung kann das Membranpotential und die Membranleitfähigkeit einer Zelle gemessen werden. Bei den Experimenten in der

Spannungsklemme (*voltage-clamp*) wird das Membranpotential auf einer zuvor vorgegebenen Spannung gehalten. Kommt es durch Öffnung von Ionenkanälen zu einem Ionenstrom, bewirkt dieser eine Änderung des Membranpotentials der Zelle. Um das Membranpotential auf der vorgegebenen Spannung zu halten, wird kompensatorisch der nötige Strom appliziert, um die abgeleitete Zelle in dem vorgegebenen Potential zu halten. Der applizierte kompensatorische Strom entspricht dem transmembranen Strom durch die Ionenkanäle und beschreibt somit die Leitfähigkeit der Zellmembran. Die Membranleitfähigkeit steht im Fokus der Untersuchung und kann aufgrund des direkten proportionalen Zusammenhangs zu den applizierten Strommengen bestimmt werden. Bei der Stromklemmmethode (*current-clamp*) wird die Zelle, im Gegensatz zur *voltage-clamp*-Konfiguration, bei ihrem Ruhemembranpotential belassen. Durch Applikation von definierten Stromimpulsen, welche in der Stromstärke variiert und gesteigert werden können, ändern sich die Ionenströme über die Membran, was wiederum zu variablen Membranpotentialänderungen führt. Wenn die Reizschwelle der Zelle überschritten wird, löst es in der Zelle Aktionspotentiale aus. Diese Messmethode kann unter anderem für die Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften der untersuchten Neurone dienen.

2.3 Elektrophysiologischer Versuchsaufbau

Nach einer Erholung vom Schneidestress der Hirnschnitte von mindestens 30 Minuten wurde ein Schnitt in die Probenkammer überführt. Die Probenkammer besteht aus einer mit Teflon beschichteten Vertiefung und als Boden dient ein rundes Deckglas. Es folgte eine standardisierte Ausrichtung des Schnittes mit anschließender Fixierung mittels eines Schiebekamms aus Nylonfäden, um ungewollte Bewegungen während des Experimentes zu minimieren. Die Schnitte wurden mit 34 °C warmer, carbogengesättigter ACSF-Lösung umspült, um deren Nährstoffzufuhr zu gewährleisten. Der Zu- und Ablauf (2-3 ml/min) wurde mittels einer Rollpumpe (Peristaltic Pump – Minipuls 3, Gilson International BV, DE) sichergestellt. Durch die zirkulierende Versorgung des Schnittes über die Rollpumpe war es auch möglich, die Zellen in der Probenkammer mit Pharmaka zu umspülen.

Zur Identifikation der zu untersuchenden Zellen erfolgte zunächst eine grobe visuelle Detektion in der Übersichtsvergrößerung mit einem (2,5fachen Objektiv, EC Plan-NEOFLUAR, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland). Zur visuellen Kontrolle der Bewegung des Mikroskops (Axio Examiner, Zeiss, Germany) und im speziellen der Ableitelektrode (Patchpipette) wurde mit Hilfe einer CCD-Kamera (Rolera-XR, QIMAGING, Surrey, Kanada) das Bild auf einen Videomonitor projiziert. Im

anschließenden Schritt wurde auf ein Wasserimmersionsobjektiv (40fach, LUMPlanFLN, Olympus Corporation) umgestellt, um die gewünschten Zellen darzustellen. Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden nur GFP positive Zellen in der Schicht II/III des somatosensorischen Kortex mit einer Tiefe von zwischen 50-80 μm unterhalb der Schnittoberfläche ausgewählt.

Nach der Identifikation einer Zelle wurde eine Pipette, nachfolgend als Patchpipette, Glaselektrode, Pipette oder Ableitelektrode bezeichnet, mit Intrazellulärlösung gefüllt. Die Patchpipette wurde in einen Elektrodenhalter (SEC-05X-BF, NPI Electronic GmbH, Tamm, Deutschland) eingespannt. Dieser war mit einem chlorierten Silberdraht mit dem Vorverstärker verbunden. Der Vorverstärker wiederum war mit dem Patch-Clamp-Verstärker (DPA-2FX, NPI Electronic GmbH, Tamm, Deutschland) verbunden. Der Elektrodenhalter inklusive des Vorverstärkers war auf einem Mikromanipulator (Mini-25-XL, Luigs & Neumann Feinmechanik-Elektrodentechnik GmbH, Ratingen, Deutschland) befestigt, der eine präzise Bewegung der Pipette in drei Achsen ermöglicht hat. An einem weiteren Mikromanipulator befand sich ein zweiter Elektrodenhalter, an dem eine Applikationspipette oder eine Stimulationselektrode befestigt war. Beide Mikromanipulatoren waren in räumlicher Nähe zur Probenkammer angebracht. Um Erschütterungen zu minimieren, waren das Mikroskop, die Probenkammer, sowie die Mikromanipulatoren fest an einem vibrationsdämpfenden Tisch befestigt (IsoSation™ Vibration Isolated Workstation, Newport Corporation, CA). Der Tisch wiederum war von einem Faradayschen Käfig (Heka Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) vor elektromagnetischen Störeinflüssen nach 3 Seiten abgeschirmt. Alle übrigen Geräte, wie Steuereinheiten der Mikromanipulatoren, Patch-Clamp-Verstärker, Druckapplikationssystem, Rollpumpe und Personal Computer inklusive Videomonitor für die CCD-Kamera befanden sich außerhalb des Faradayschen Käfigs.

Als Referenzelektrode wurde ein in der Badlösung eingetauchtes Silber-Chlorid-Pellet verwendet. Bevor die Glaselektrode mit der Badlösung in Berührung kam, wurde über eine am Elektrodenhalter bestehende Schlauchverbindung ein leichter Überdruck mittels einer Spritze erzeugt. Der Überdruck verhinderte das Verstopfen der Spitze und sorgte dafür, dass keine Verunreinigungen und Extrazellulärflüssigkeit in die Pipette gelangten. Die Pipette wurde unter visueller Kontrolle zur Zielzelle mittels Mikromanipulator herangefahren. Nach entstandenem Kontakt der Pipettenspitze mit der Membran der Zielzelle wurde der Überdruck aufgehoben, so dass sich ein *cell-attached*-Modus einstellte. Bei stabilem *gigaseal* mit einem Widerstand größer als 1 $\text{G}\Omega$, wurde die Membran durch eine kurze Applikation eines Unterdrucks durchbrochen und damit die *whole-cell*-

Konfiguration erreicht. In diesem Zustand konnten die Zellen für die elektrophysiologischen Experimente genutzt werden. Die elektrophysiologische Aufzeichnung und Speicherung der Zellen erfolgte mit dem Programm CED Signal (Signal 5.08, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Großbritannien). Zu Beginn der Versuchsdurchführung erfolgte zunächst eine elektrophysiologische Charakterisierung der Zellen im *current-clamp*-Modus. Bei den anschließenden Versuchen mit den Pharmaka wurden die Zellen im *voltage-clamp*-Modus auf einer Spannung von -55 mV gehalten und die Membranstromänderungen während der Applikation aufgezeichnet. Bei den Einwaschversuchen dauerten die Aufzeichnungen beim Ein- und Auswaschen jeweils 10 Minuten. Bei der Druckapplikation dauerte die Aufzeichnung 3 Sekunden. Dabei starteten die Aufzeichnungen 100 Millisekunden vor der Applikation, um den Zeitpunkt der Änderung feststellen zu können.

2.4 Herstellung und Befüllung der Pipetten

Für die Durchführung der Experimente wurden aus Borosilikat hergestellte Glaskapillaren (GB 150 F-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) verwendet. Die Glaskapillaren wurden mit Hilfe eines horizontal ziehenden Kapillarziehgeräts (P-97, Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA) aus einer filamentierten Glaskapillare vollautomatisch in 4-5 Schritten gezogen. Die fertigen Pipetten wurden mit einer feinen Plastiknüle mit Pipettenlösung befüllt. Um Verunreinigungen der Intrazellulärlösung in der Pipette zu vermeiden, wurde ein Spritzenfilter verwendet. Die Zusammensetzung der Lösung variierte je nach Verwendungszweck. Bei den elektrophysiologischen Ableitungen handelte es sich um Kaliumgluconatlösung oder Cäsium-basierte Lösung (detaillierte Zusammensetzung siehe Lösungen und Pharmaka). Für die *whole-cell*-Ableitungen der Neurone wurden Pipetten mit einem Widerstand von 4-8 M Ω verwendet. Die Widerstände konnten nach dem Eintauchen der befüllten Elektroden mit dem Verstärker kontrolliert werden und wurden bei Abweichungen vom erwünschten Sollwert verworfen. Weiterhin wurden Pipetten für die Druckapplikation von in ACSF-gelöstem Pharmakon verwendet. Die Applikationselektroden wurden mit dem gleichen Pipettenziehprogramm gezogen und visuell mit der Ableitelektrode verglichen, um die Verwendung konstanter Pipettenlösungen sicherzustellen.

2.5 Druckapplikation

Die lokale Applikation der Pharmaka erfolgte mit einer Pipette aus Borosilikatglas. Diese wurde an einem Pipettenhalter befestigt, der wiederum am Picospritzer (Toohey Company, Fairfield, NJ, USA) angeschlossen war. Die Pipettenspitze wurde unter visueller Kontrolle an die Zielzelle gebracht. Im Abstand von 30-40 μm zum Zellsoma der abgeleiteten Zelle wurden Applikationspulse mit einer Dauer 50 ms und mit einem Druck von 5 psi verabreicht. Die Applikation wurde dreimal im Abstand von einer Minute wiederholt. Mit dieser Methode war es möglich, der untersuchten Zelle gezielt ein Pharmakon zu applizieren. Während der Versuche wurden die Zellen auf einer Spannung von -55 mV gehalten.

2.6 Elektrophysiologische Charakterisierung abgeleiteter Zellen

Nach der GFP-positiven Detektion der Martinotti-Zellen, fand eine elektrophysiologische Charakterisierung der abgeleiteten Zellen statt. Dabei wurden sowohl die aktiven wie passiven zellspezifischen Eigenschaften von Martinotti-Zellen bestimmt.

Bei den durchgeführten Experimenten wurden zwei verschiedene intrazelluläre Lösungen benutzt, zum einem Kalium-basierte und zum anderen Cäsium-basierte Lösungen. Bei den Versuchen mit Kalium-basierter Lösung fand nach dem Erreichen der *whole-cell*-Konfiguration eine elektrophysiologische Charakterisierung der Zellen statt. Nach Stabilisierung der abgeleiteten Zellen wurden zunächst im *current-clamp*-Modus den abgeleiteten Zellen negative Stromimpulse mit einer Dauer von einer Sekunde appliziert. Es wurden jeweils zehn Stromimpulse mit einer negativen Stromstärke von -10 pA und -50 pA den Zellen appliziert. Mit den gemittelten Werten aus den beiden Stromstärken konnten nun auf diese Weise die passiven Zelleigenschaften, wie Membrankapazität (C_m), Eingangswiderstand (R_{in}), Membranzeitkonstante (τ_m) und das Ruhemembranpotential (V_{rest}) ermittelt werden. Für die Berechnung des Ruhemembranpotentials wurde ein Mittelwert aus den jeweils zehn Messungen vor dem Injektionspuls benutzt. Bei der Membranzeitkonstante fand eine Zeitmessung ab dem Einsetzen des Stimulus bis zum Erreichen von 63 Prozent der gesamten Potentialauslenkung statt. Aufgrund der bekannten Stromstärken bei der Applikation und den gemessenen Potentialauslenkungen konnte durch die Strom-Spannungsbeziehung nach dem Ohmschen Gesetz ($R=U/I$) der Eingangswiderstand ermittelt werden. Der Eingangswiderstand konnte auch durch das Anlegen einer Strom-Spannungskurve bestimmt werden. Bei diesem Vorgehen wurden zunächst negative Strominjektionen mit steigender Stromstärke in 10-pA-Schritten bis zu

einem Wert von -100 pA appliziert, danach positive Impulse bis zur AP-Feuerschwelle. Aus den daraus erhaltenen Werten konnte auf die gleiche Weise der Eingangswiderstand ermittelt werden. Mit dem nun bekannten Eingangswiderstand (R_{in}) und der Membranzeitkonstante (τ_m) konnte auch die Membrankapazität (C_m) errechnet werden. $C = \tau/R$

An der Aktionspotentialschwelle, der sogenannten Rheobase, wurden einige charakteristisch aktive Zelleigenschaften bestimmt. Um die Schwelle zu ermitteln, wurden positive Stromimpulse im *current-clamp*-Modus an die abgeleitete Zelle appliziert. Als Anfangsdosis wurde ein Wert um die 60 pA benutzt. Die Stimulusstärke wurde in 5 pA Schritten bis zum Erreichen eines Aktionspotentials erhöht. Die Stromstärke bei der genau ein Aktionspotential ausgelöst wurde, wurde mindestens fünfmal wiederholt. Aus diesen fünf Messungen wurden die Werte für weitere Berechnungen gemittelt. Bei den an der Rheobase ermittelten aktiven Eigenschaften wurde das Schwellenpotential, AP-Amplitude, AP-Latenzzeit, Zeit bis zum Erreichen des Amplitudenmaximums, maximal erreichte AP-Steigung, AP-Dauer, Nachhyperpolarisations-Amplitude (AHP-Amplitude), die schnelle Nachhyperpolarisations-Dauer (fAHP-Dauer), Nachdepolarisationsdauer (ADP) und zweite Nachhyperpolarisation (mAHP) ermittelt. Anschließend wurde die Stromstärke oberhalb der Rheobase stetig in 10 pA Schritten bis zum Erreichen der maximalen AP-Feuerfrequenz gesteigert. Aus den erhaltenen Daten konnte das AP-Feuermuster und Adaptationsverhalten bestimmt werden.

Die elektrophysiologische Charakterisierung konnte bei Cäsium-basierter Intrazellulärlösung nicht durchgeführt werden, da Cäsium die Kaliumkanäle blockiert und somit keine physiologischen Aktionspotentiale ausgelöst werden können.

2.7 Extrazelluläre Stimulation und Aufnahme von eIPSC

Bei der Untersuchung der evozierten postsynaptischen Ströme wurden die untersuchten Zellen mit einer Cäsium-basierten Intrazellulärlösung abgeleitet. Cäsium blockiert Kaliumkanäle (Hille 2001) und ermöglicht auf diese Weise die Registrierung auch distaler Dendriteneingänge, da auch spannungsabhängige Kaliumkanäle in ihrer Funktion gehemmt werden und man auf diese Art auch niedrige Chloridströme detektieren kann. Nach erfolgtem Patchvorgang wurden die Zellen auf einer Spannung von $+10\text{ mV}$ geklemmt. Bei diesem Haltepotential besteht ein hoher einwärtsgerichteter Gradient für Chlorid. Chloridkanäle werden im Neokortex bei inhibitorischen Eingängen über GABA_A -Rezeptoren aktiviert und erzeugen dadurch IPSC. Um die exzitatorisch evozierten

Eingänge zu unterdrücken, wurden die spezifischen Antagonisten (10 μM NBQX und 50 μM AP5) für glutamaterge NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren durch Einleitung in die Badlösung geblockt. Nach fünf-minütiger Einwirkzeit wurde eine bipolare Stimulationselektrode (Matrix Microelectrode, FHC Bowdoinham, ME 04008, USA) in gleicher mikroskopischer Ebene mit der Entfernung von 20-40 μm zur abgeleiteten Zelle platziert. Durch die örtliche Nähe zum Soma wurde versucht, nur eine inhibitorische Faser, welche auf die abgeleitete Zelle projiziert, zu aktivieren. Das Ziel war es, eine Amplitude mit einem stetigen An- und Abstieg zu erhalten. Der Amplitudenausschlag wurde in der unteren Hälfte zum Amplitudenmaximum eingestellt, um auf diese Weise bei der pharmakologischen Untersuchung sowohl einen Anstieg, als auch einen Abfall registrieren zu können. Die Einstellung wurde durch die Variation der Stromstärke (7-25 μA) und/oder der örtlichen Modifikation der Stimulationselektrode erreicht. Die Stimulusdauer wurde hingegen konstant bei 100 μs belassen. Um eine direkte Stimulation auszuschließen, wurde auf eine passend kurze Latenzzeit (0,85-2,1 ms) geachtet. Diese entsteht durch synaptische Verschaltung und ist ein Indiz für eine indirekte Stimulation der abgeleiteten Zelle. Weiterhin lässt sich durch die Latenzzeit das Stimulusartefakt von eIPSC separieren. Bei einer direkten Stimulation würden sich der Stimulusartefakt und eIPSC überschneiden und nur schwer voneinander separieren lassen. Nach erfolgreicher Einstellung der eIPSC wurden zehn einzelne eIPSC aufgezeichnet, welche als Referenz dienten. Nach anschließendem Einwaschen von Baclofen (10 μM) erfolgte eine erneute Stimulation der Faser. Zur Bestätigung des Effektes von Baclofen wurde entweder Baclofen aus der Badlösung, ausgewaschen oder es wurde zusätzlich CGP52432 (10 μM) eingewaschen, um dadurch potenzielle GABA_B-Rezeptoren zu inaktivieren. Neben der Einzelstimulation wurden außerdem Zweifach- (*paired pulse*) und Mehrfachstimulation mit 10 Stimuli (*train pulse*) mit den Frequenzen von 1, 8 und 40 Hz durchgeführt.



Abbildung 2.1: Angewendete Stimulationsmethode zur Untersuchung von eIPSC

Darstellung ausgelöster postsynaptischer eIPSC an Martinotti-Zellen durch Aktivierung präsynaptischer Fasern. **(A)** Induziertes eIPSC weist sowohl Anstieg als auch Abfall stetigkeit, auf. Dieses weist auf die Stimulation nur weniger bzw. nur einer präsynaptischen inhibitorischen Faser

hin und stellt die Ausgangssituation für die pharmakologische Untersuchung dar. Anders aussehende eIPSC (**B**), z.B. durch Überlagerung mehrerer Eingänge, wurden verworfen und die Position und Stimulationsstärke verändert, um IPSC wie in (**A**) dargestellt zu erhalten.

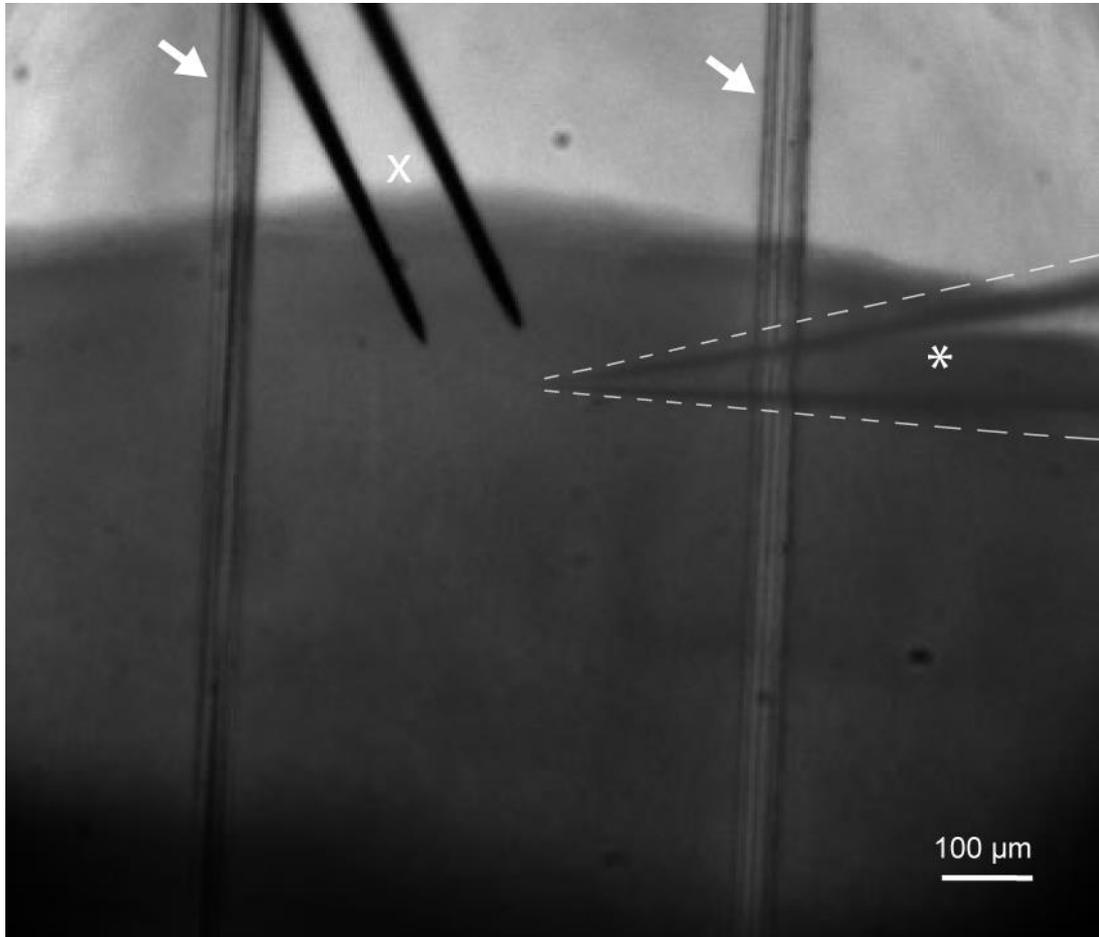


Abbildung 2.2: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit 2,5-Facher Vergrößerung eines thalamokortikalen Schnittes

Zu sehen ist eine Patchpipette (rechts; *) und eine bipolare Stimulationselektrode (links; x). Die Spitze der Patchpipette stellt den Punkt der abgeleiteten Zelle dar. Vertikal verlaufende Strukturen, welche → markiert sind, stellen das *Grid* (Fixierungsgitter) zur Fixierung des Gewebes dar.

2.8 Morphologie

Neben der Elektrophysiologie wurde die Morphologie zur Verifizierung der abgeleiteten Zellen als Martinotti-Zellen eingesetzt. Hierfür enthielt die intrazelluläre Lösung 0.1-0.2 % Biocytin. Biocytin zählt zur Gruppe der Carbonsäureamide und wird als nicht-fluoreszierender Indikator für die Markierung von Nervenzellen verwendet. Aufgrund des geringen Molekulargewichtes und des aktiven Transport durch zelluläre Transportproteine von Biocytin verteilt es sich schnell im Soma, im Dendritenbaum und in den axonalen Verzweigungen. Für eine möglichst vollständige Darstellung des abgeleiteten Neurons

wurde darauf geachtet, dass ein mindestens 30-minütiger Austausch des Zytoplasmas mit der intrazellulären Lösung stattfand. Durch die Biocytin-haltige Pipettenlösung werden die elektrophysiologischen Eigenschaften der abgeleiteten Zellen nicht verändert (Horikawa und Armstrong 1988). Nach Abschluss der elektrophysiologischen Experimente wurde die Patchpipette unter visueller Kontrolle vorsichtig gelöst, um keine Zellfragmente oder den Zellkern aus der Zelle herauszuziehen. Anschließend wurde der Schnitt in einer 4 %igen Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert und über Nacht im Kühlschrank bei 7 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte bis zu zehn Mal mit PB-Puffer (*phosphate buffer*; PB) bei Raumtemperatur gespült und bis zur weiteren Färbung darin aufbewahrt.

Für die morphologische Darstellung wurde eine ABC-DAB-Färbung durchgeführt und die Schnitte dafür folgendermaßen vorbehandelt: Zunächst erfolgte eine Spülung der Schnitte in PB-Puffer, die bis zu zehn Mal wiederholt wurde. Nachfolgend wurden die Schnitte mit einem Gefrierschutz (25 %-iger Saccharose) versetzt und für eine Dauer von mindestens 90 Minuten bei Raumtemperatur darin belassen. Nach der Einwirkzeit wurden die Schnitte in drei Zyklen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend wieder zum Tauen gebracht. Es folgte eine erneute mehrmalige Spülung der Schnitte in PB-Puffer. Bevor die ABC-Lösung (Avidin-Biotin-Complex) gebraucht wurde, wurden die Schnitte mit 1 %igem H₂O₂ in PB-Puffer vorbehandelt, um die im Gewebe vorkommenden Peroxidase zu blockieren und somit Hintergrundartefakte zu minimieren (Mulisch und Welsch 2010). Nach erneuten Spülungen mit PB-Puffer (3x), TB-Puffern (1x) und TBS-Puffer (2x) in aufgelisteter Reihenfolge, wurde ABC-Reagenz mit Vectastain ABC KIT (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA) mit einer Verdünnung von 1:400 je A und B in TBS-Puffer angesetzt. Die Schnitte verblieben über Nacht in der Lösung, bevor sie in TBS-Puffer (2x) und TB-Puffer (3x) gespült wurden. Es folgte die Farbreaktion mittels der DAB-Lösung. Zunächst inkubierten die Schnitte eine Minute lang in der DAB-Lösung, bevor die Farbreaktion mit 300 µl von 1 %igem H₂O₂ in TB-Puffer gestartet wurde. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde bei Erreichen der gewünschten Farbtintensität die Farbreaktion durch Auswaschen von H₂O₂ mit TB-Puffer unterbrochen und anschließend mit PB-Puffer (2x) gespült. Die anschließende Cytochromoxidasefärbung diente der besseren Darstellung der einzelnen neokortikalen Schichten und insbesondere der *Barrel*. Das Gewebe der *Barrel* ist besonders reichhaltig an synaptischen Verschaltungen, welche durch oxidativ metabotropen Bedarf eine mitochondrienreiche Region darstellt (Wong-Riley und Welt 1980; Petersen und Sakmann 2000). Das Enzym Cytochrom-C-Oxidase (CO) ist ein mitochondriales Membranprotein, nach deren Aktivität sich der Färbegrad des Gewebes richtet. Die Schnitte inkubierten über ein paar Stunden in 1 ml CO-Färbelösung.

Der Vorgang wurde unter mikroskopischer Kontrolle bei Erreichen der gewünschten Farbintensität durch Spülung mit PB-Puffer über eine Zeitspanne von 15 Minuten unterbrochen.

Nach der anschließenden Versilberung, die der Intensivierung der Färbung diente, wurden die Schnitte mit Aqua Poly Mount (Polysciences, Warrington, Pennsylvania, USA) eingedeckelt und bei 4 °C zum Trocknen und Aushärten gelagert.

Die morphologische Identifizierung und Archivierung der abgeleiteten Zellen erfolgte mit Hilfe eines videogestützten Lichtmikroskops (Zeiss Axio Imager, Carl Zeiss Micro-Imaging GmbH, Jena, Deutschland).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Herstellung der morphologischen Präparate nicht vom Autor selbst, sondern von einer Technischen Assistentin des Institutes für Neuroanatomie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

2.9 Datenanalyse

Die komplette Aufzeichnung und Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm CED Signal 5.084 (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge England). Neben der Verwaltung der Datensätze mit MS Excel 2010 (Version 14.0, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), erfolgte die weitere Analyse der erhobenen Daten mit Tabellenkalkulationsprogrammen Sigma Plot 12.0 (Systat Software, San Jose, USA.) und MicroCal Origin (Version 8.5, Microcal Software, Northampton, MA, USA) in welche die Daten überführt und statistisch ausgewertet wurden. Die aufgezeichneten Grafen und die bei der Auswertung entstandenen Abbildungen wurden zur einheitlichen Darstellung mit Adobe Illustrator CS4 14.0.0 (Adobe Systems Incorporated, San José, USA) bearbeitet.

2.10 Bestimmung der Umkehrpotentiale

Für die Bestimmung der Umkehrpotentiale von GABA und Muscimol wurden die Applikationen in der *whole-cell*-Konfiguration durchgeführt. Die Zellen wurden auf den Haltepotentialen -50 mV, -60 mV, -70 mV, -80 mV und -90 mV geklemmt und GABA bzw. Muscimol per Druck drei Mal pro Haltepotential appliziert. Um eine Verfälschung der Antworten durch eine Desensitivierung zu verhindern, wurden Intervallpausen von mindestens einer Minute zwischen den Applikationen und den verschiedenen Haltepotentialen eingehalten. GABA und Muscimol aktivieren selektiv die ionotropen GABA_A-Rezeptoren, wodurch es zum Ionenfluss von Chlorid und Bicarbonat kommt. Die

Triebkraft für den Ionenfluss hängt einerseits vom Membranpotential der Zelle ab, andererseits von der intra- und extrazellulären Ionenkonzentration. Der Zustand des Umkehrpotentials entspricht dabei einem Gleichgewicht der beiden Triebkräfte. Durch die Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen dem Haltepotential und den durch GABA/Muscimol ermittelten Ströme konnte das Umkehrpotential berechnet werden.

2.11 Analyse von eIPSC

Bei der Analyse der evozierten inhibitorischen postsynaptischen Ströme (eIPSC) wurden die zehn Wiederholungen zunächst auf eine Grundlinie (Baseline) gesetzt und anschließend gemittelt. Aus den mittleren eIPSC wurden die Amplitude, die Latenzzeit (Zeit vom Stimulus bis zum Eintreten des eIPSC), das Integral (Fläche unter dem eIPSC) und die Abfallzeit (*decay time*; vom Maximum (100 % bis 37 %). Bei den Doppel- und Mehrfachstimulationen kam es ab einer Frequenz von 8 Hz zur Überlagerung der IPSC, so dass zwischen zwei IPSC die *Baseline* nicht erreicht wurde, bevor es zur Auslösung des nächsten IPSC gekommen ist. In diesen Fällen wurde durch Anlegen eines exponentiellen *Fit* an die vorangegangenen IPSC die tatsächliche Abfallkurve abgeschätzt. Mit diesem Vorgehen war es möglich den nachfolgendem IPSC detailliert zu berechnen.

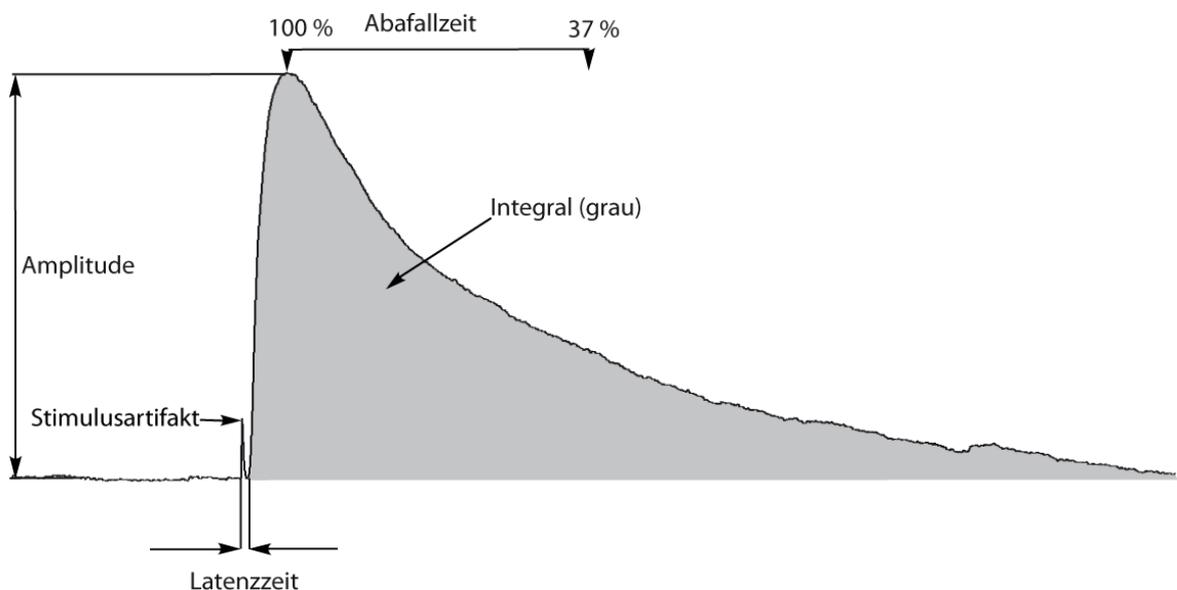


Abbildung 1

Abbildung 2.3: Ermittlung eIPSC-relevanter Parameter

Bei eIPSC wurden die Amplitude von der Grundlinie bis zum Amplitudenmaximum, das Integral (graue Fläche) und die Amplitudenabfallzeit vom Amplitudenmaximum bis 37 % der Amplitude bestimmt.

2.12 Lösungen und Pharmaka

Tab.2.1: Zusammensetzung verwendeter Lösungen

Präparationslösung	ACSF-Lösung: (extrazelluläre Badlösung)	Pipettenlösung: (intrazelluläre Lösung)
87 mM NaCl	125 mM NaCl	135 mM K-Gluconat
1,25 mM NaH ₂ PO ₄	1,25 mM NaH ₂ PO ₄	5 mM KCl
2,5 mM KCl	2,5 mM KCl	2 mM MgCl ₂
10 mM Glukose	25 mM Glukose	0,5 mM EGTA (Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure);
75 mM Saccharose		10 mM HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure);
0,5 mM CaCl ₂	2 mM CaCl ₃	2 mM Na ₂ ATP (Adenosintriphosphat);
7 mM MgCl ₂	1 mM MgCl ₃	0,5 mM NaGTP (Guanosintriphosphat);
26 mM NaHCO ₃	26 mM NaHCO ₃	10 mM Na-Phosphokreatinphosphat

Tab.2.2: Experimentabhängige Zusätze

GABA (γ-Aminobuttersäure)	Neurotransmitter	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Muscimol (5-Aminomethyl-3-hydroxyisoxazole)	GABA _A -Rezeptor Agonist	Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien
Baclofen	GABA _B -Rezeptor Agonist	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
GABAzin (SR95531) (6-imino-3-4-methoxyphenyl-1-6Hpyridazinebutanoic acid hydrobromide)	GABA _A -Rezeptor Antagonist	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
CGP 46381 (3-Aminopropyl-cyclohexylmethylphosphinic acid)	GABA _B -Rezeptor Antagonist	Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien
CGP52432 3-[[[(3,4-Dichlorophenyl)methyl]amino]propyl]diethoxymethylphosphinic acid	GABA _B -Rezeptor Antagonist	Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien
D-AP5 (D-2-Amino-5-phosphonopentaic acid)	Antagonist ionotroper Glutamatrezeptoren	Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien
NBQX (2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzof-quinoxaline-7-sulfonamide disodium salt)	Antagonist ionotroper Glutamatrezeptoren	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland

Phosphat Puffer (*phosphate buffer*, PB):

0,1M; pH=7,4

14,42 g Na₂HPO₄ * 2H₂O und 2,62 g NaH₂PO₄ * H₂O pro l Aqua destilliert

TRIS-Puffer (*tris buffer*, TB):

0,05 M; pH=7,6

6,06 g TRIS HCl und 1,39 g TRIS Base pro l Aqua destilliert; pH mit HCl eingestellt

TRIS = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TRIS-gepufferte Saline (*tris-buffered saline*, TBS):

pH=7,6

1l TB + 9 g NaCl

Für die Farbreaktion wurden 6 mg Cytochrom-C, 5 mg DAB, 444 mg Saccarose und 0,3 % Katalase in 10 ml PB gelöst.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte festgestellt werden, ob GABA-Rezeptoren auf der postsynaptischen Membran von Martinotti-Zellen in der Schicht II/III des *Barrel*-Kortex exprimiert sind. Hierfür wurden *whole-cell patch-clamp*-Ableitungen, kombiniert mit lokaler Druckapplikation diverser Agonisten und Antagonisten, durchgeführt. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Untersuchung von GABA_B-Rezeptoren auf präsynaptischen Terminalen, welche auf die Martinotti-Zellen projizieren. Dafür wurden evozierte inhibitorische postsynaptische Ströme (eIPSC) genutzt, die durch minimale elektrische Stimulation inhibitorischer Fasern ausgelöst wurden.

3.1 Identifizierung abgeleiteter Martinotti-Zellen

Die elektrophysiologischen Daten wurden an insgesamt 99 Martinotti-Zellen der Schicht II/III des somatosensorischen Kortex erhoben. Davon wurden 71 Zellen mit Kaliumgluconatbasierter- und 28 Zellen mit Cäsium-basierter Lösung abgeleitet. Für die Identifikation der Martinotti-Zellen in akuten neokortikalen Schnitten kamen folgende Kriterien zum Einsatz: (I) Ableitungen von GFP-positiven Zellen in der GIN-Maus, (II) elektrophysiologische Charakterisierung der Zellen und (III) histologische Färbung mit anschließender morphologischer Rekonstruktion.

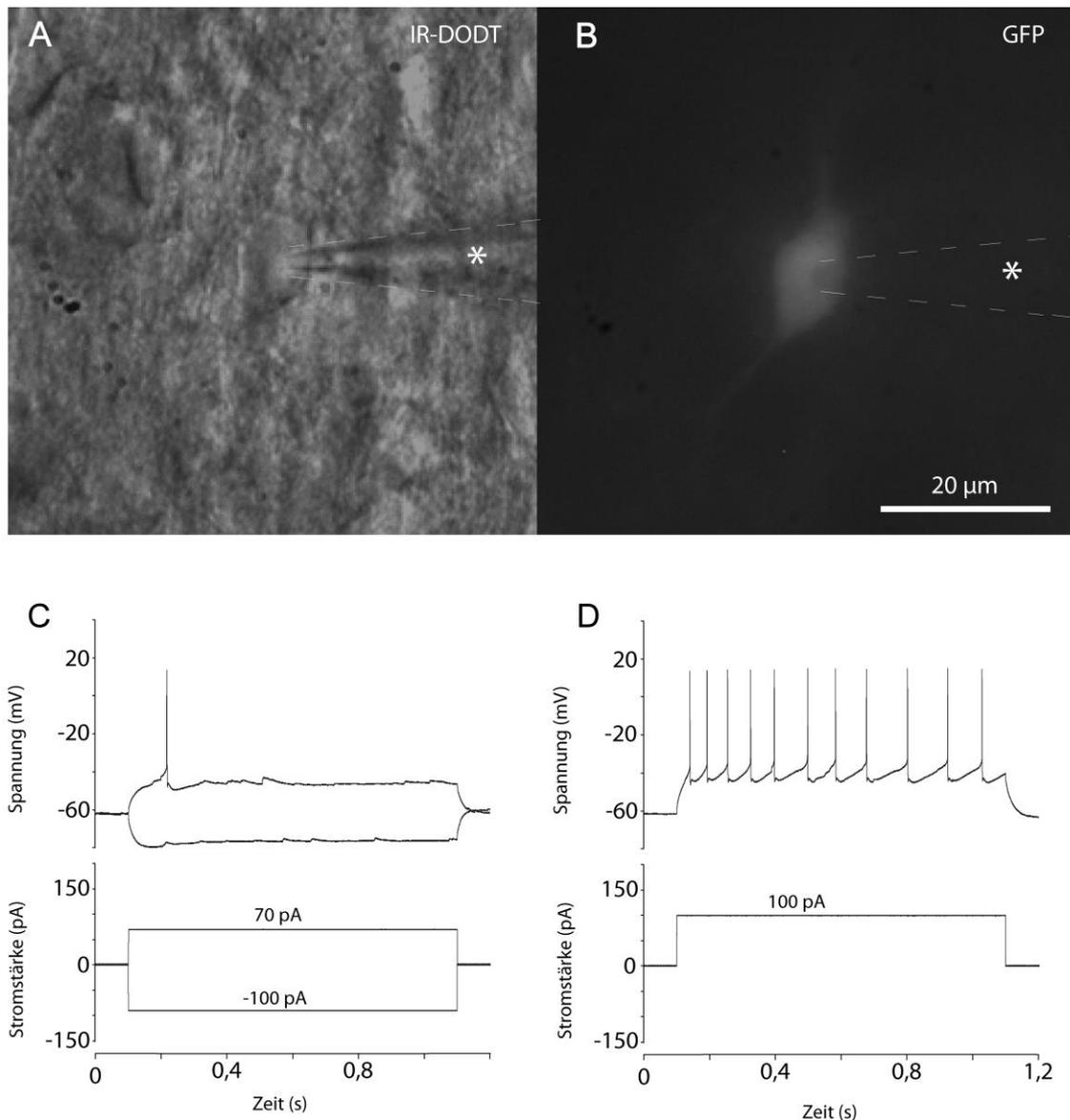


Abbildung 3.1: Elektrophysiologische Charakterisierung abgeleiteter Martinotti-Zellen
(A,B) Lichtmikroskopische Aufnahmen einer abgeleiteten Martinotti-Zelle mittels IR-Dodt **(A)** und unter GFP-Fluoreszenz **(B)**. Dargestellt sind die Grauwertbilder in der Infrarot-Schrägbeleuchtung (IR-Dodt) und in der Belichtung mit Grün-Filter (450-490 nm) zur Anregung des nativen GFP-Signals. Die Pipette ist mit einem Stern markiert. **(C)** Elektrophysiologische Charakteristika der Martinotti-Zellen auf Stromimpulse. Die Zelle ist mit Stromimpulsen von -100 pA und 70 pA mit einer Stimulusdauer 1 s stimuliert worden. Bei -100 pA ist eine leichte Senke (*sag*) zu erkennen. Die Feuerschwelle liegt in diesem Beispiel bei 70 pA . Bei dieser Stromstärke ist ein Aktionspotential ausgelöst worden. **(D)** Aufzeichnung von Strömen bei einer Stimulusstärke von 100 pA . Zu sehen ist das adaptive Verhalten der MC.

Martinotti-Zellen wurden zunächst anhand ihrer GFP-positiven Eigenschaften mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht (Abb. 3.1B). Um möglichst vollständig erhaltene Zellen für die Experimente zu erhalten, wurde eine Tiefe von mehr als $50\text{ }\mu\text{m}$ unter der Schnittoberfläche gewählt. Dieses erhöhte die Wahrscheinlichkeit eines komplett erhaltenen Dendritenbaumes. Eine Tiefe von über $75\text{ }\mu\text{m}$ stellte sich als schwierig für das

Ableiten dar, so dass die abgeleiteten Zellen sich meist in einer Tiefe von 50-75 μm befanden. Des Weiteren wurde auf ein stabiles Ruhemembranpotential der Zellen geachtet, um das Risiko von pathologischen Zellen für die Experimente zu minimieren. Das Ruhemembranpotential betrug im Mittel $-60,2 \pm 2,6 \text{ mV}$. Bei Abweichungen des Ruhemembranpotentials von mehr als 5 mV zu diesem Potential bzw. bei unphysiologischem Verhalten der Zelle, wurde der Versuch abgebrochen und die Zelle nicht in der Analyse verwendet. D.h. es wurden ausschließlich Zellen mit einem Ruhemembranpotential negativer als -55 mV für die Versuchsdurchführung genutzt. Trotz aller Gründlichkeit war es nicht möglich, an allen Zellen den kompletten Versuchsaufbau durchzuführen. Diese Zellen wurden bis zum Auftreten von pathologischen Effekten in die Auswertungen einbezogen. Bei den durchgeführten Experimenten wurde mit zwei verschiedenen intrazellulären Lösungen gearbeitet: Zum einem Kalium-basierte und zum anderen Cäsium-basierte Lösungen. Bei den Versuchen mit Kalium-basierter Lösung fand nach dem Patchvorgang eine elektrophysiologische Charakterisierung der Zellen statt. Bei Cäsium-basierten Lösungen war eine Charakterisierung nur bedingt möglich, da Cäsium Kaliumkanäle blockiert und somit artifiziell verlängerte Aktionspotentiale hervorruft. Die Charakterisierung erfolgte direkt nach dem Erreichen der *whole-cell*-Konfiguration, da sich die Cäsiumionen in der kurzen Zeit nicht in vollem Maße mit der intrazellulären Lösung vermischen konnte. Aufgrund der sehr kurzen Zeitspanne konnten die physiologischen Aktionspotentialmuster der Zellen nicht mit absoluter Sicherheit auf Martinotti-Zellen zurückgeführt werden. Die Zellen konnten jedoch mit anschließenden Färbetechniken durch die morphologischen Eigenschaften als Martinotti-Zellen bestätigt werden und wurden somit in die Auswertung einbezogen. Eine vollständige elektrophysiologische Charakterisierung der Zellen erfolgte mit Kaliumgluconat-basierter Lösung. Dabei wurden den Zellen stufenweise positive und negative Stromimpulse appliziert. Die charakteristischen physiologischen Eigenschaften von Martinotti-Zellen sind in Abbildung 3.1C und Abbildung 3.1D zu erkennen. Dabei ist in Abbildung 3.1C ein Aktionspotential an der Rheobase zu sehen und das Verhalten der Zelle auf einen hyperpolarisierenden Stromimpuls (-100 pA). Die Rheobase lag bei dieser Zelle bei 70 pA. Beim Erreichen der Feuerschwelle kommt es zur Auslösung eines Aktionspotentials, welche durch Aktivierung spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle hervorgerufen wird. Durch den rapiden Na^+ -Ausstrom depolarisiert die Zelle bis in den positiven Bereich, bevor durch die zeitlich verzögerte Aktivierung von K^+ -Kanälen der Einstrom von Kalium den zeitlich begrenzten Ausstrom von Natrium übersteigt und die Zelle wieder hyperpolarisiert. Die AP-Amplitude wurde ebenfalls als Gütekriterium der abgeleiteten Zellen angesehen. Es wurden nur Zellen mit

Amplitudenausschlägen in deutlich positiven Bereichen (>10 mV) für die experimentellen Versuche genutzt. Anschließend ist bei Martinotti-Zellen eine erste Nachhyperpolarisation (fAHP) zu beobachten, gefolgt durch eine nachdepolarisierende Komponente, bevor die zweite, langsamere Nachhyperpolarisation (mAHP) einsetzt. Hyperpolarisierende Stromimpulse lösen eine Senke bzw. Wanne (*sag*) aus (Wang et al. 2004). Diese wird durch erhöhte einwärtsgerichtete K^+ -Leitfähigkeit hervorgerufen und erhöht sich mit steigender Stromstärke. Die meisten Martinotti-Zellen weisen ein adaptives Verhalten der Aktionspotentialfrequenz bei Applikation mit steigenden depolarisierenden Stromimpulsen auf. Dabei kann die *steady state* Frequenz von Zelle zu Zelle variieren. Eine Übersicht der elektrophysiologischen Eigenschaften der mittels Kaliumgluconat-basierter Lösung abgeleiteten Martinotti-Zellen zeigt Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung elektrophysiologischer Membraneigenschaften untersuchter MC (n=71)

	MW	SD
Ruhemembranpotential [mV]	-60,29	2,67
Membranzeitkonstante [ms]	20,29	7,29
Eingangswiderstand [$M\Omega$]	225,95	67,67
Membrankapazität [pF]	90,25	20,86
Rheobase [pA]	86,97	33,60
Feuerschwelle [mV]	-35,31	4,93
AP-Amplitude [mV]	66,77	12,50
AP-Weite [ms]	0,54	0,10
<i>Steady-State</i> -AP-Frequenz [Hz]	32,66	6,17

Alle abgeleiteten Zellen wurden während der Experimente mit Biocytin gefüllt und anschließend mit der DAB-ABC-Färbetechnik dargestellt. So bestand die Möglichkeit eine morphologische Identifikation der Zellen nach Abschluss der Versuche durchzuführen. Zwei Beispiele sind in den Abbildungen 3.2 und 3.3 zu sehen. Diese zeigen die typischen morphologischen Muster mit einem ovalem Zellkörper und der multipolaren dendritischen Ausbreitung (orange). Der axonale Teil (grün) der Zelle zieht größtenteils in die Schicht I, welches das eindeutigste morphologische Erkennungsmerkmal von Martinotti-Zellen darstellt. Es sind jedoch auch einzelne Abgänge zu sehen, welche in tiefere Schichten ziehen.

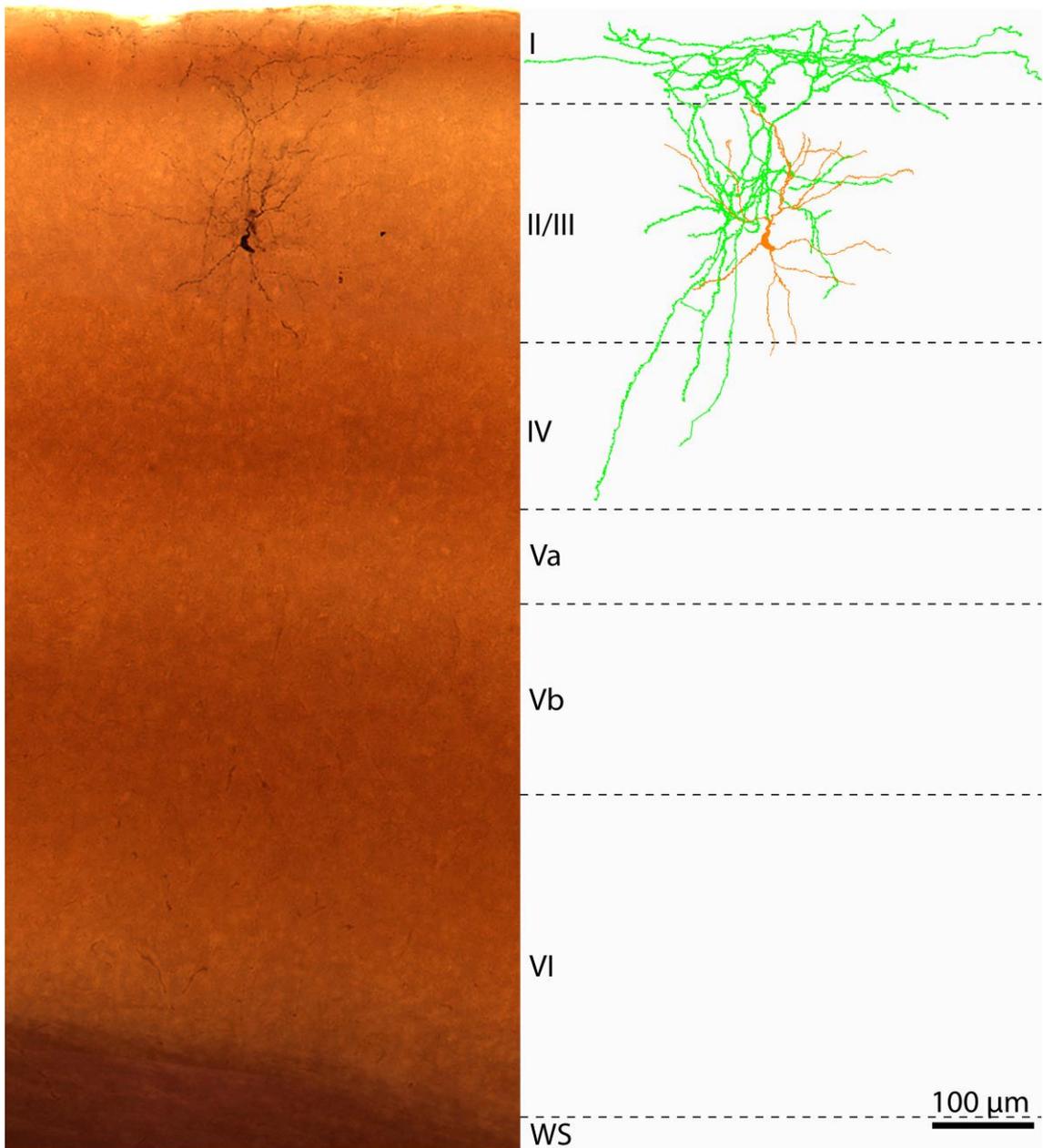


Abbildung 3.2: Lichtmikroskopisches Bild und Rekonstruktion einer Martinotti-Zelle in der Schicht II/III des somatosensorischen Kortex

Die mit Biocytin gefüllte Martinotti-Zelle wurde mittels ABC-DAB-Färbetechnik sichtbar gemacht und lichtmikroskopisch aufgenommen (links). Daneben ist die axo-dendritische Rekonstruktion dieser Zelle gezeigt. In der Rekonstruktion ist der Zellkörper und die dendritischen Abgänge in orange und der axonale Teil der Zelle in grün dargestellt (rechts). Die Lage der neokortikalen Schichten ist durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

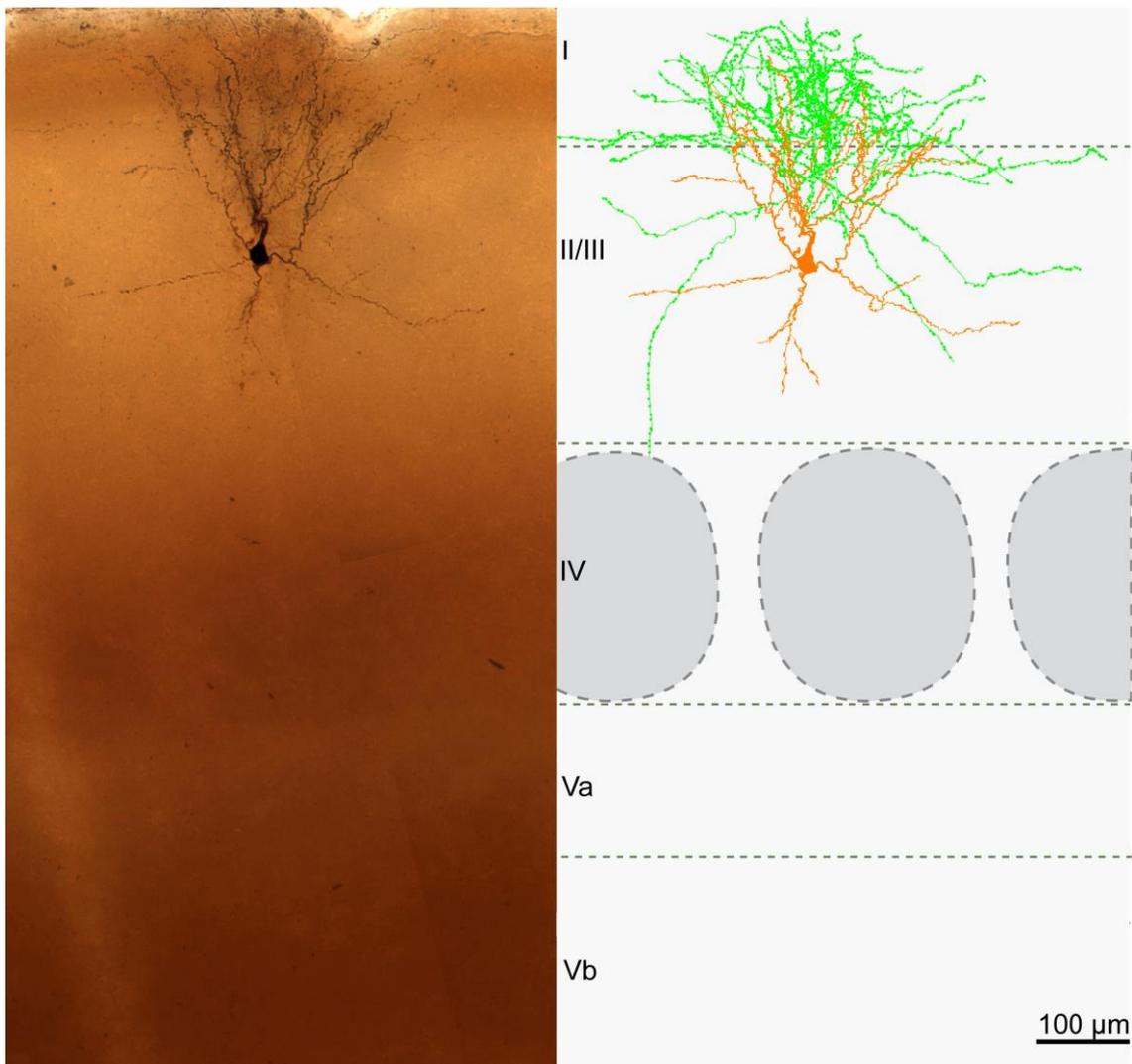


Abbildung 3.3: Lichtmikroskopisches Bild und Rekonstruktion einer Martinotti-Zelle in der Schicht II/III des somatosensorischen Kortex

Lichtmikroskopische Aufnahme einer mit Biocytin gefüllten Zelle, welche mittels ABC-DAB-Färbetechnik sichtbar gemacht worden ist (links). Die Abbildung auf der rechten Seite stellt die axo-dendritische Rekonstruktion der Zelle dar. Der axonale Anteil ist grün abgebildet und der dendritische mit dem Zellkörper in orange. Die Lage der neokortikalen Schichten ist durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

3.2 Charakterisierung postsynaptischer GABA-Rezeptoren

Zum Nachweis postsynaptischer GABA-Rezeptoren auf den Martinotti-Zellen in der Schicht II/III des *Barrel*-Kortex wurden verschiedene Agonisten und Antagonisten eingesetzt. Dabei wurden die Agonisten GABA, Muscimol und Baclofen mittels lokaler Druckapplikation verabreicht. Die Martinotti-Zellen wurden mit einer Kaliumgluconat-Lösung abgeleitet und auf einer Spannung von -55 mV geklemmt. Anschließend wurde eine zweite Glaskapillare, welche z.B. mit GABA als Agonist gefüllt war, in einer

räumlichen Nähe von 30-50 μm an die abgeleitete Zelle positioniert und GABA appliziert. Nach einer Latenzzeit von 10-30 ms konnten GABA-induzierte einwärtsgerichtete Ströme gemessen werden (Abb. 3.4). Es kam dabei zu einem rasanten Anstieg und einem im Vergleich stetigen Abfall der Aufzeichnungskurve. Die Applikation wurde zweimal in einem Abstand von jeweils 30 Sekunden wiederholt. Die Abstände wurden nach vorherigem Ausprobieren so gewählt, um eine Akkumulation des Pharmakons und Desensitivierung der Rezeptoren zu vermeiden. Anschließend wurde die mit GABA gefüllte Pipette durch spezifische GABA_A- und GABA_B-Rezeptor-Agonisten ersetzt und der experimentelle Ablauf in gleicher Weise durchgeführt. Die Applikation von Muscimol, einem spezifischem GABA_A-Rezeptor-Antagonisten führte ebenfalls zu induzierten einwärtsgerichteten Strömen (Abb. 3.4). Bei dem spezifischen GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen wurden keine sichtbaren Strömungsänderungen registriert (Abb. 3.4). Um sowohl die Konzentration als auch die unterschiedlichen Pharmaka miteinander vergleichen zu können, wurde versucht die lokalen Applikationen an der gleichen Zelle und gleicher Lokalisation der Pipettenspitze zu wiederholen (Abb. 3.4 rechts). Für das Auffinden der gleichen Lokalisation der Applikationspipette wurden zwei Markierungspunkte auf dem Bildschirm angebracht. Auf diese Weise war es ohne Einschränkungen möglich, stets die gleiche Applikationsstelle aufzufinden. Trotz der oben beschriebenen Vorgehensweise war es jedoch nicht möglich, den kompletten Umfang an unterschiedlichen Konzentration der einzelnen Agonisten durchzuführen, da die Ableitung instabil werden konnte und weitere Messungen verworfen wurden. Beim Applizieren der Agonisten wurde darauf geachtet, mit der niedrigsten Konzentration zu beginnen und anschließend zu erhöhen. Durch die Steigerung der Konzentrationen sollte eine potenzielle Desensitivierung ausgeschlossen werden.

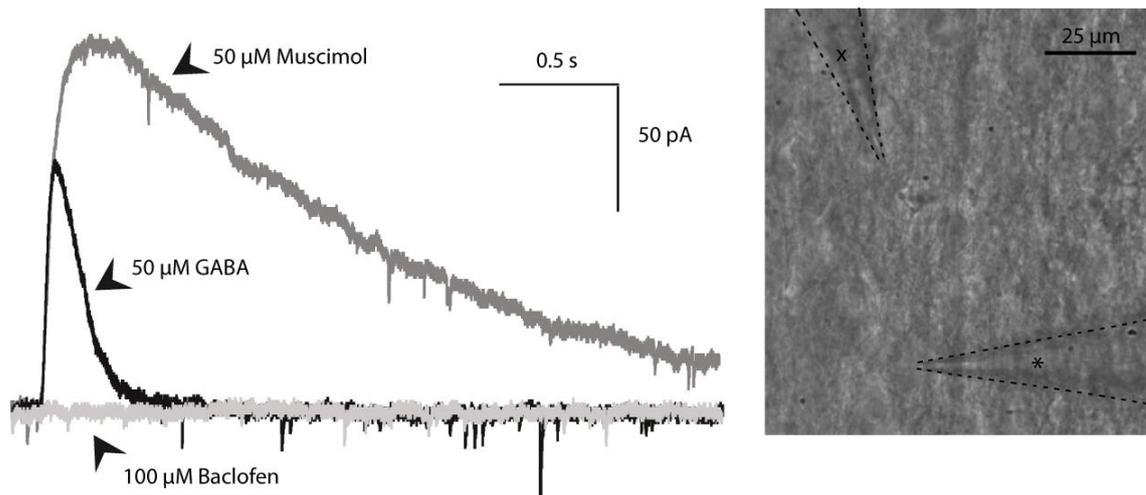


Abbildung 3.4: Lokale Druckapplikation von GABA, Muscimol und Baclofen

Aufzeichnungen von auswärtsgerichteten Strömen bei lokaler Druckapplikation mit GABA (50 µM), Muscimol (50 µM) und Baclofen (100 µM). Die Aufzeichnungen erfolgten in der *whole-cell*-Konfiguration bei einem Haltepotential von -55 mV. Bei der lokalen Druckapplikation (5 psi; 50 ms) wurde zunächst GABA (mittlerer Amplitudenpeak) verabreicht. Nach Austausch der Applikationspipette wurde an die gleiche Zelle Muscimol (50 µM) appliziert und die Ströme erneut aufgezeichnet (höchster Amplitudenpeak). Zuletzt erfolgte die Applikation von und Aufzeichnung unter Baclofen (100 µM) (Aufzeichnung mit keinen induzierten Strömen). Daneben ist eine lichtmikroskopische Aufnahme der Ableitkonfiguration bei lokaler Druckapplikation (Ableitelektrode *) und (Applikationspipette x). Der Elektrodenverlauf ist mit gestrichelten Linien angedeutet.

Schon ab einer Konzentration von 5 µM löste GABA an 6 Martinotti-Zellen auswärtsgerichtete Ströme von $13,9 \pm 16,1$ pA aus (Abb. 3.5 B). Ab der Konzentration von 10 µM kam es bereits zu einem deutlich höheren Anstieg von $121,7 \pm 24,1$ pA (n=4). Die Konzentration wurde bis zum Erreichen von 10 mM gesteigert, wobei es zwischen 1 mM mit $223,2 \pm 53,7$ pA und 10 mM mit $247,4 \pm 105,8$ pA zu keinen deutlichen Unterschieden kam (Abb. 3.5 B). Eine Applikation von Muscimol führte bei der Konzentration von 5 µM ebenfalls zu den ersten detektierten auswärtsgerichteten Strömen mit der Stärke von $18,7 \pm 12,9$ pA an 5 Martinotti-Zellen (Abb. 3.5 D). Die maximalen Ströme wurden im Vergleich zu GABA bereits ab 100 µM Muscimol erreicht und betragen maximal 160 pA. Bei 100 µM waren es $153 \pm 26,1$ pA an 17 Zellen und bei 500 µM $157,3 \pm 30,0$ pA an 6 Zellen. Die induzierten Ströme blieben bei der Applikation von Baclofen bei allen getesteten Konzentration bis zu 10 mM aus (Abb. 3.5 E).

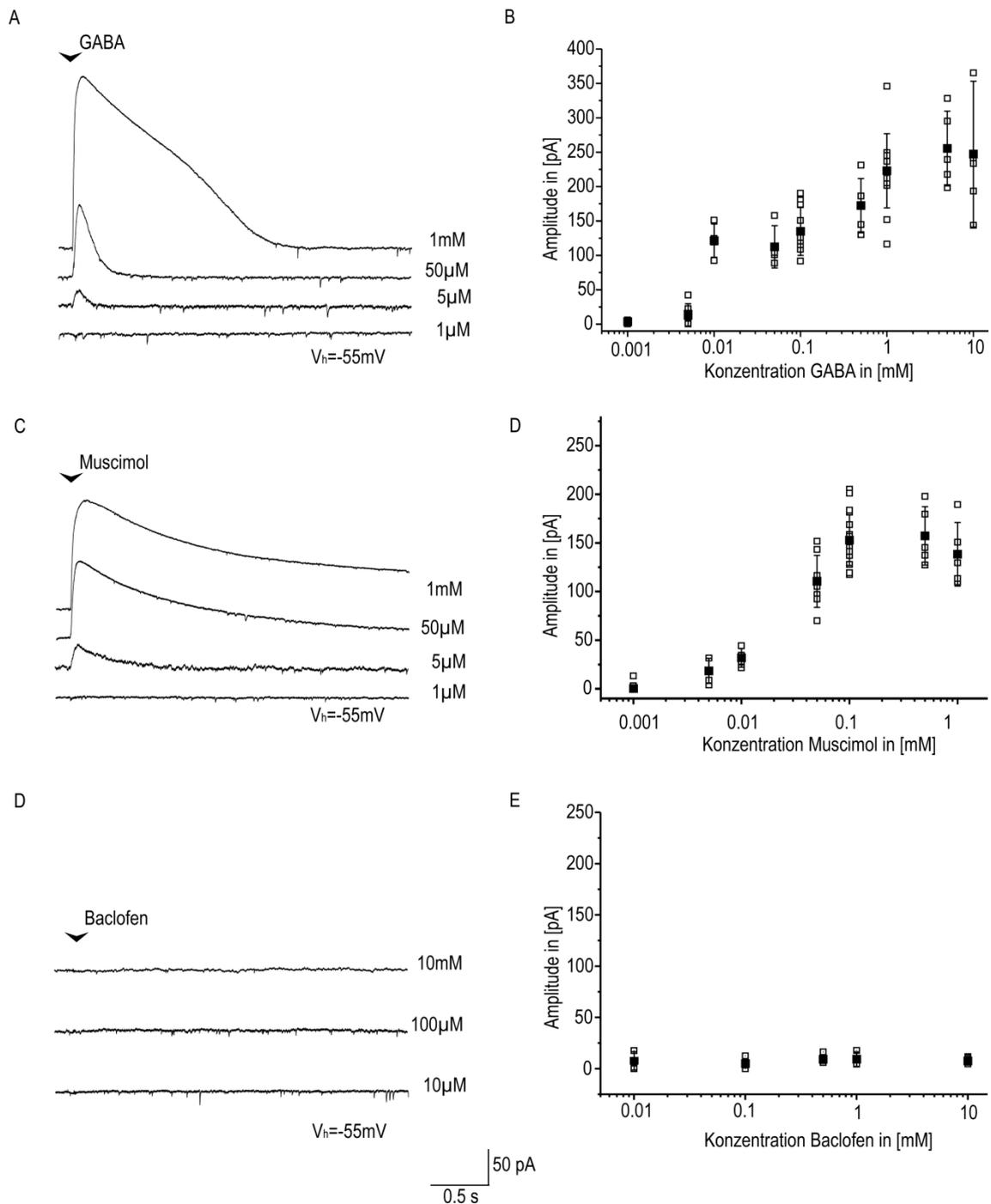


Abbildung 3.5: Konzentrationsabhängige Wirkung von GABA, Muscimol und Baclofen
 Aufnahmen induzierter Ströme bei lokaler Druckapplikation (5 psi; 50 ms) von GABA (**A**), Muscimol (**C**) und Baclofen (**E**) in Abhängigkeit ihrer Konzentration. Die Aufzeichnung der Ströme erfolgte in der *whole-cell*-Konfiguration bei einem Haltepotential von -55 mV. (**B**, **D**, **F**) Dosisabhängigkeitskurven genutzter Agonisten. Die mittlere Amplitude (MW+SD) der ausgelösten Ströme ist in Abhängigkeit zur Konzentration (mM) verschiedener Agonisten mit schwarzen Vierecken dargestellt. Einzelzellantworten der untersuchten Zellen sind durch weiße Vierecke gekennzeichnet.

Es zeigte sich, dass sich das Antwortverhalten auf GABA und Muscimol bei gleicher Konzentration sowohl in der Amplitude als auch in der Kinetik voneinander unterscheidet. So führten lokale Applikationen von 10 μM GABA bereits zu Ausschlägen von $121,7 \pm 24,1$ pA (n=4) (Abb. 3.6 A). Im Vergleich dazu lag bei der gleichen Konzentration die durch Muscimol-induzierte Amplitude bei $32,0 \pm 9,6$ pA (n=4). Durch Zunahme der Konzentration auf 100 μM erhöhte sich die GABA-induzierte Amplitude auf $134,5 \pm 31,9$ pA (n=12) und lag damit niedriger als bei den Muscimol-ausgelösten Strömen ($153,0 \pm 26,2$ pA, n=18). Durch weitere Steigerung der Konzentration auf 1 mM löste eine GABA-Applikation Ströme mit einer Amplitude von $223,2 \pm 53,7$ pA (n=13) auf, wohingegen Muscimol mit $138,4 \pm 34,6$ pA (n=5) postsynaptische Ströme auslöste, die kleiner ausfielen als mit 100 μM Muscimol. Somit erreichten die Amplituden der Muscimol-induzierten Ströme bei höherer Konzentration nicht die Stärke der GABA-induzierten, jedoch war der Abfall bis zur Grundlinie bei der Stimulation mit Muscimol bei steigenden Konzentrationen im Verhältnis stets langsamer als mit GABA (Abb. 3.6 C). Bei geringen Konzentrationen (10 μM) war der Unterschied gering $319,9 \pm 96,4$ ms (n=4) für Muscimol und $208,4 \pm 158,6$ ms (n=4) für GABA (Abb. 3.6 C). Bei 100 μM betrug die Abfallzeit $796,1 \pm 234,7$ ms (n=18) für Muscimol- und $173,5 \pm 108,0$ ms (n=12) für GABA-induzierte Ströme. Eine Steigerung der Konzentration auf 1 mM ergab Werte von $946,0 \pm 443,3$ ms (n=5) infolge einer Muscimol- und $586,1 \pm 177,3$ ms (n=13) nach GABA-Stimulation. Für die Anstiegszeit der GABA- und Muscimol-ausgelösten Ströme konnten folgende Werte ermittelt werden: für Muscimol $121,1 \pm 36,9$ ms (n=4) bei 10 μM , $118,1 \pm 63,7$ ms (n=18) bei 100 μM und $95,2 \pm 3,0$ ms (n=5) bei 1 mM (Abb. 3.6 B), für GABA lagen die Anstiegszeiten bei $67,8 \pm 19,5$ ms (n=4) für 10 μM , $58,9 \pm 6,4$ ms (n=12) für 100 μM und $69,4 \pm 36,7$ ms (n=13) für 1 mM. Damit erreichten die GABA-induzierten Ströme tendenziell schneller ihre maximale Amplitude als die durch Muscimol ausgelösten.

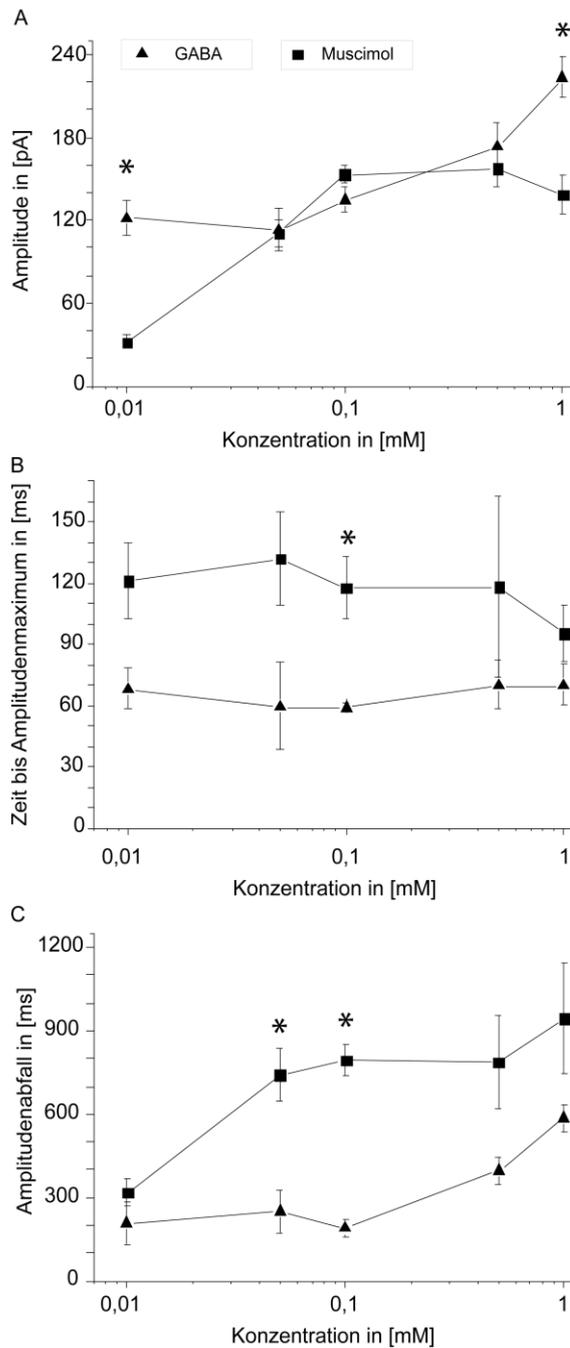


Abbildung 3.6:
Konzentrationsabhängige postsynaptische Wirkung verwendeter GABA_A-Rezeptor-Agonisten

(A) Amplitudenvergleich der aufgezeichneten postsynaptischen Ströme infolge einer lokalen Applikation von GABA und Muscimol in Abhängigkeit von ihrer Konzentration. Des Weiteren ist die Zeit bis Erreichen des Amplitudenmaximums (B) und des Amplitudenabfalls (C) dargestellt. GABA-induzierte Ströme weisen stets eine schnellere Kinetik auf, die nur bei 0,1 mM signifikant unterschiedlich zu Muscimol-induzierten Strömen sind. Dagegen weisen GABA-induzierte Ströme ausschließlich in der geringsten (10 μ M) und höchsten (1 mM) eingesetzten Konzentration eine höhere Amplitude auf.

Zur weiteren Untersuchung der Rezeptoren wurden der spezifische GABA_A-Rezeptor-Antagonist GABA_A (SR95531) und der spezifische GABA_B-Antagonist CGP35348 genutzt, um die potentiell vorhandenen Rezeptortypen reversibel zu inaktivieren. Zunächst wurde erneut GABA mittels lokaler Druckapplikation verabreicht. Nach dreimaliger Applikation von 100 μ M GABA im Abstand von 30 Sekunden wurden GABA-induzierte Ströme in Höhe von $130,5 \pm 12,9$ pA an einer Martinotti-Zellen registriert (Abb. 3.7 A). Danach wurde GABA_A mit einer Konzentration von 20 μ M in der ACSF-Lösung eingewaschen. GABA_A inaktiviert auf diese Weise GABA_A-Rezeptoren, so dass bei erneuter Applikation von GABA nur noch GABA_B-Rezeptoren aktiviert werden können.

Nach Perfusion des Schnittes über eine Dauer von zehn Minuten wurde die Applikation von GABA erneut durchgeführt. Bei allen untersuchten Zellen ($n=3$) reduzierten sich die GABA-induzierten Ströme auf die Stärke von $1,4 \pm 1,2$ % der Referenzamplitude unter Kontrollbedingungen (100 %) (Abb. 3.7 D). Im Anschluss wurde mit GABAzin vermischte ACSF-Lösung durch reine ACSF-Lösung ersetzt. Der Schnitt wurde mindestens zehn Minuten mit reiner ACSF-Lösung umspült, um auf diese Weise das GABAzin aus dem Schnitt möglichst komplett auszuwaschen. Nun fand erneut eine lokale GABA-Applikation mittels Druckpipette statt, und es wurden erneut induzierte Ströme aufgezeichnet. Es war ein Anstieg der induzierten Ströme auf $94,3 \pm 14,0$ % zur Referenz zu beobachten (Abb. 3.7 D). Diese können durch die reversible Blockierung der GABA_A-Rezeptoren erklärt werden. Zur Festigung der Annahme wurde im Anschluss Muscimol durch GABA ersetzt, so dass nur noch GABA_A-Rezeptoren aktiviert und geblockt werden konnten (Abb. 3.7 B). Es wurden Ströme mit $161,0 \pm 23,8$ pA gemessen. Nach Einwasch von $20 \mu\text{M}$ GABAzin zeigten alle Zellen ($n=5$) einen Amplitudenabfall der Muscimol-induzierten Ströme auf $13,6 \pm 19,6$ % (Abb. 3.7 E). Ein Auswasch von GABAzin hatte einen erneuten Anstieg auf $70,6 \pm 20,6$ % zur Folge. Aufgrund der minimalen Antworten besteht die Vermutung, dass nicht alle GABA_A-Rezeptoren blockiert werden konnten. In gleicher Vorgehensweise wurden die Versuche mit $10 \mu\text{M}$ CGP34358 anstatt GABAzin durchgeführt (Abb. 3.7 C). Auf diese Weise sollte durch Blockade der GABA_B-Rezeptoren eine Reduzierung der GABA-induzierten Ströme erreicht werden. Die Referenz entsprach $147,2 \pm 50,5$ pA an drei Martinotti-Zellen. Die GABA-induzierten Ströme änderten sich nach dem Einwaschen des GABA_B-Rezeptor-Antagonisten CGP34358 unwesentlich und lagen im Mittel ($n=3$) bei $99,0 \pm 7,0$ % (Abb. 3.7 F). Der Auswasch brachte ebenfalls keine signifikante Änderung mit sich und entsprach $102,8 \pm 18,7$ %.

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass auf der postsynaptischen Membran der Martinotti-Zellen Muscimol-induzierte Ströme ausgelöst werden, welche reversibel durch GABAzin blockiert werden können. Ein Effekt auf Baclofen und CGP35348 ließ sich nicht feststellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass GABA-induzierte Ströme auf der postsynaptischen Membran der Martinotti-Zellen durch GABA_A-Rezeptor vermittelt zu sein scheinen.

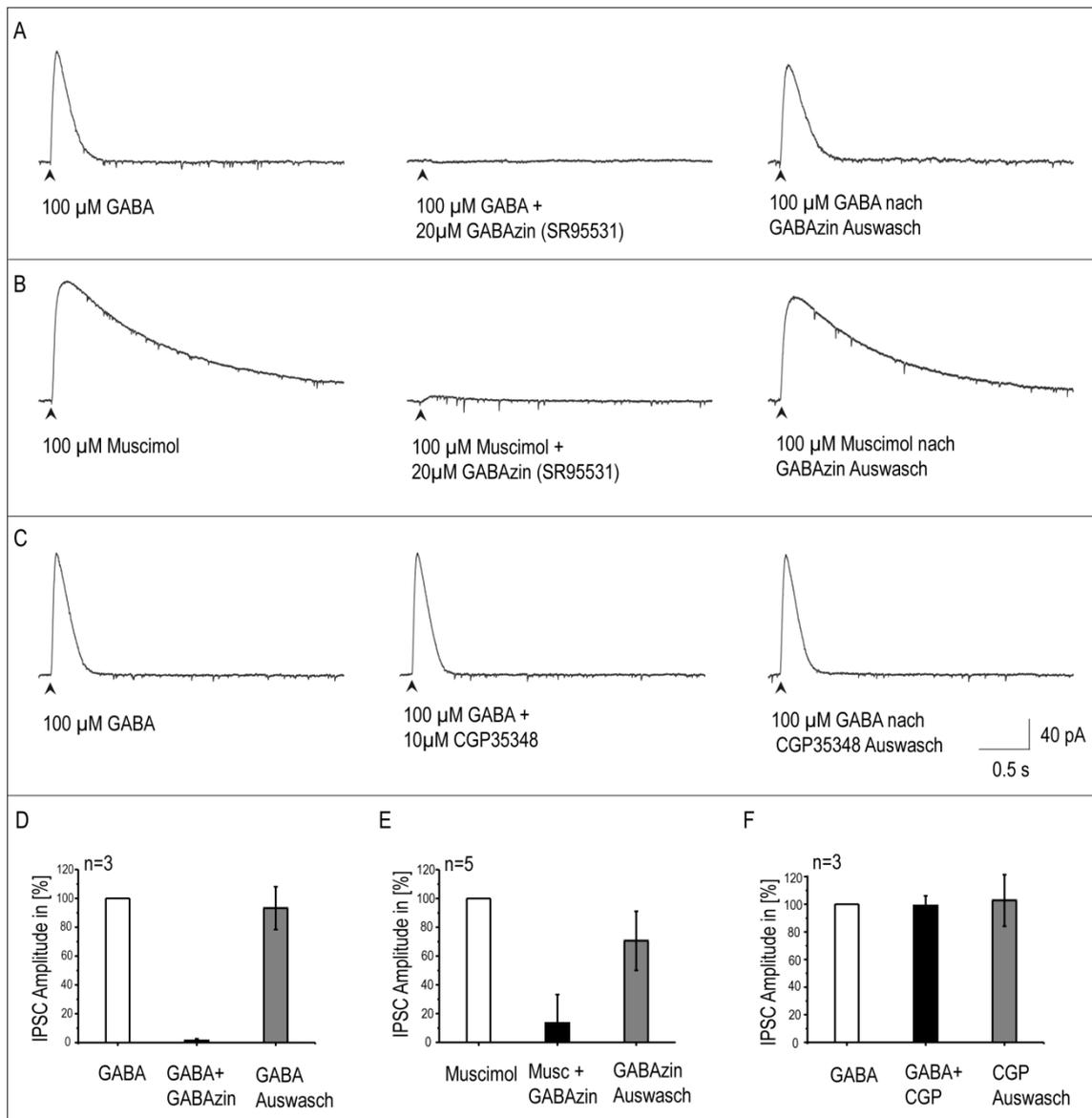


Abbildung 3.7: Blockierung GABA-/Muscimol-induzierter Ströme

(A) Aufzeichnung von GABA-induzierten Strömen (links) und erneute Messung nach Einwasch (5 min) von 20 μ M GABAzin (GABA_A-Rezeptorantagonist) (mitte). Nach Auswasch von GABAzin, welcher zehn Minuten betrug, erfolgt eine dritte Messung der GABA-induzierten Ströme (rechts). **(B)** Aufzeichnung von Muscimol-induzierten Strömen (GABA_A-Rezeptoragonist)(links). Erneute Applikation von Muscimol nach erfolgter Einwaschdauer (5 min) von GABAzin (20 μ M) (mitte). Nach Auswasch (10 min) nochmalige Registrierung Muscimol-induzierter Ströme (rechts). **(C)** Messung von GABA-induzierten Strömen vor dem Einwasch (10 min) von CGP35348 (GABA_B-Rezeptorantagonist) (links) und unter Einfluss von CGP35348 (10 μ M) (mitte). Erneute Aufzeichnung induzierter Ströme nach Auswasch des Antagonisten CGP35348. Die induzierten Ströme erfolgten bei allen Versuchsdurchführungen bei einem Haltepotential von -55 mV. **(D)** Im Balkendiagramm sind die Amplituden in Prozent gemittelt aus 3 Zellen bei GABA-induzierten (100 μ M) Strömen ohne GABAzin (weiß), mit GABAzin (20 μ M) in der extrazellulären Lösung (schwarz) und nach Auswasch von GABAzin aus der extrazellulären Lösung (grau) dargestellt. **(E)** Darstellung der Amplituden in Prozent gemittelt aus 5 Zellen bei Muscimol-induzierten Strömen ohne GABAzin (weiß), mit GABAzin (20 μ M) in der extrazellulären Lösung (schwarz) und nach Auswasch von GABAzin aus der extrazellulären Lösung (grau). **(F)** Das Diagramm zeigt die Amplituden in Prozent aus 3 Zellen bei GABA-induzierter Ströme ohne CGP35348 (weiß), mit CGP35348 (10 μ M) in der extrazellulären Lösung (schwarz) und nach Auswasch von CGP35348 aus der extrazellulären Lösung (grau).

3.3 Bestimmung des Umkehrpotentials für GABA- und Muscimol-induzierte Ströme

Bei den zuvor durchgeführten Versuchen lösten GABA und Muscimol auswärtsgerichtete Ströme aus. Diese wurden in der *whole-cell*-Konfiguration durch Klemmen der Zelle, bei einem Haltepotential von -55 mV registriert. Dies kann entweder durch einen Ausstrom von Kationen oder einen Einstrom von Anionen hervorgerufen werden. Durch die Kenntnis der Ionenzusammensetzung sowohl des Intra- als auch des Extrazellulärraumes lässt sich mit Hilfe der Nernst-Gleichung ein Rückschluss auf die beteiligten Ionen bei Aktivierung des Rezeptors vermuten.

Durch Modifikation des elektrischen Gradienten konnte man das Umkehrpotential für GABA- und Muscimol-induzierte Ströme bestimmen. Zunächst wurde die abgeleitete Zelle auf einem Potential von -50 mV geklemmt und 1 mM GABA in räumlicher Nähe zur abgeleiteten Zelle durch die lokale Druckapplikation verabreicht. Die Dauer und der Applikationsdruck wurden bei 50 ms und 5 psi beibehalten. Darauffolgend wurde die Applikation bei einem Haltepotential von -60, -70, -80 und -90 mV wiederholt (Abb. 3.8 A). Bei -60 mV nahmen die Ströme im Verhältnis zu der Spannung von -50 mV ab, waren jedoch durchgehend auswärtsgerichtet. Bei dem Haltepotential von -70 mV sanken die ausgelösten Ströme erneut, hatten jedoch ein biphasisches Muster. Nach einer ersten, schnellen auswärtsgerichteten Strömungsrichtung, folgte ein zweiter, langsamerer einwärtsgerichteter Ionenstrom. Ab -80 mV war die Strömungsrichtung durchgehend einwärtsgerichtet und nahm bei -90 mV weiter an Intensität zu. Der Versuch wurde an vier Zellen durchgeführt und zeigte nur minimale Abweichungen unter den Zellen. Aus den erhobenen Amplituden pro Zelle und Haltepotential wurden Mittelwerte bestimmt. Durch die Annahme einer linearen Abhängigkeit von Amplitude und Haltepotential konnte das Umkehrpotential für GABA bestimmt werden (Abb. 3.8 B). Dieses lag im Mittel bei $-72,5 \pm 1,3$ mV für 4 Martinotti-Zellen. Das bedeutet, dass bei einem Haltepotential von -72,5 mV es zu keinem Ionenfluss über der Membran kommt, da Einstrom und Ausstrom im Gleichgewicht stehen.

Für weitere Verifikation, dass es sich um GABA_A-Rezeptoren vermittelte Ströme handelt, wurde in analogen Versuchen der spezifische GABA_A-Rezeptor Agonist Muscimol verwendet. Die lokale Druckapplikation von 100 µM Muscimol zeigte die gleiche Tendenz des Ionenflusses, jedoch unterschieden sich erneut die kinetischen Strömungsverläufe im Vergleich zu GABA (Abb. 3.8 C). Bei dem Haltepotential von -70 mV war der biphasische

Effekt weitaus weniger ausgeprägt. Das Umkehrpotential für Muscimol lag mit $-77,7 \pm 3,3$ mV bei 6 Martinotti-Zellen etwas negativer als für GABA (Abb. 3.8 D).

Die induzierten postsynaptischen Effekte durch GABA und Muscimol hängen einerseits vom Membranpotential der abgeleiteten Zelle und andererseits vom Gleichgewichtspotential der durch die Membran fließenden Ionen ab. Wie im Abschnitt 3.2 gezeigt, weisen die durch GABA- und Muscimol-induzierten Ströme bei Martinotti-Zellen auf eine Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren hin. Diese sind hauptsächlich für Chloridionen durchlässig. Die errechneten Umkehrpotentiale liegen angrenzend dem Gleichgewichtspotential für Chlorid und deuten ebenfalls auf einen Effekt der sich mit einem GABA_A-Rezeptor in Verbindung bringen lässt.

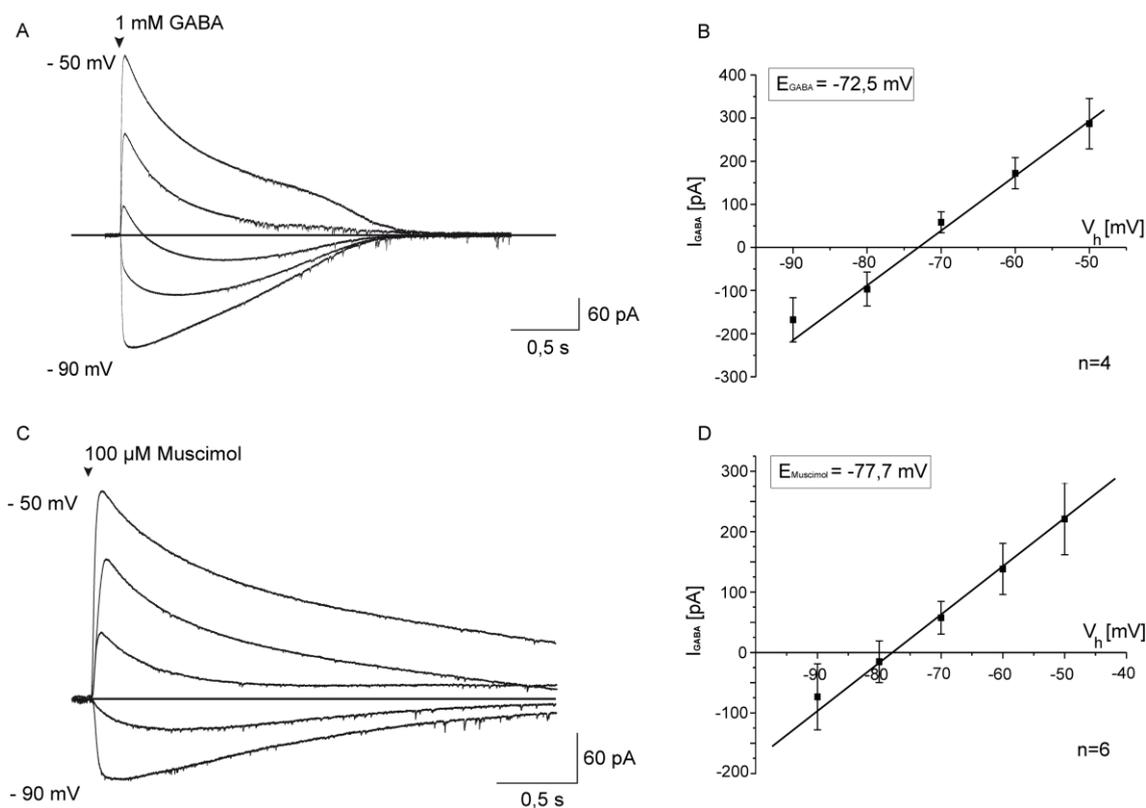


Abbildung 3.8: Umkehrpotentialbestimmung von GABA- und Muscimol-induzierten Strömen an Martinotti-Zellen

Aufzeichnung von GABA- und Muscimol-induzierten Strömen bei Haltepotentialen von -50 mV bis -90 mV (in 10 mV Abständen) (A,C). Gemittelte I_{GABA} und $I_{Muscimol}$ für die angelegten Haltepotentiale sind als U-I-Beziehung dargestellt. Mittels linearer Regression wurde E_{GABA} und $E_{Muscimol}$ berechnet. Für GABA liegt der Wert bei -72,5 mV und für Muscimol bei -77,7 mV (B,D).

3.4 Biphaseische GABA-induzierte Ströme

Bei lokaler Applikation von GABA mit einer Dauer von 50 ms und 5 psi waren biphaseische Effekte zu erkennen (Abb. 3.8). Zur näheren Untersuchung wurden diese durch eine Variation der Applikationsdauer weiter untersucht. Für die Untersuchung wurde eine Konzentration von 1 mM genutzt. Bei den üblichen Applikationseinstellungen von 50 ms und 5 psi wurde zunächst bei unterschiedlichen Haltepotentialen GABA appliziert. Die deutlichsten Effekte sind bei einem Haltepotential von -74 mV zu sehen gewesen (Abb. 3.9). Nach einem rasanten auswärts gerichteten Ionenstrom fällt dieser ab und geht in eine wesentlich langsamere einwärts gerichtete Komponente über. Durch Verkürzung der Applikationsdauer von 50 ms auf 10 ms, bei sonst gleich bleibenden Bedingungen an der gleichen Zelle, konnte die einwärtsgerichtete Komponente vollständig eliminiert werden. Was auf eine zeitliche Abhängigkeit der einwärtsgerichteten Ströme hinweist, die somit scheinbar nur bei längerer Aktivierung des GABA_A-Rezeptors auftreten.

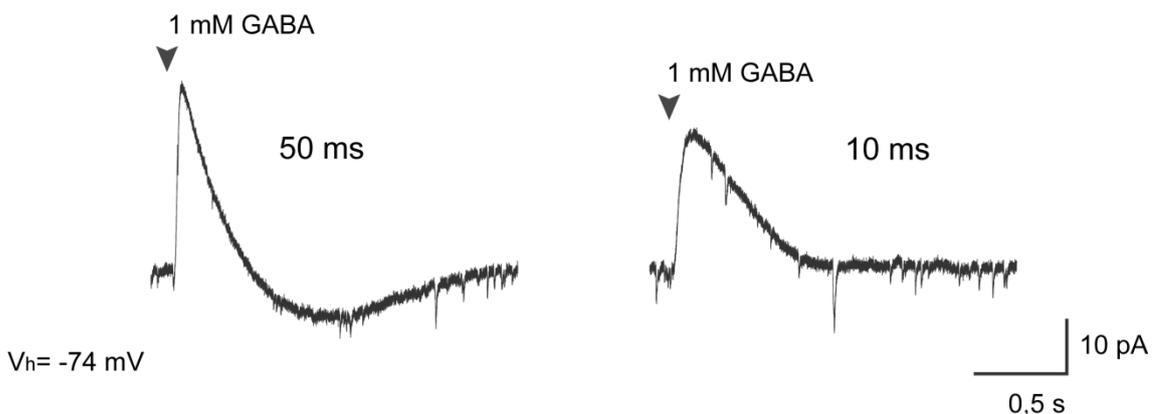


Abbildung 3.9 Biphaseische Effekte in Abhängigkeit von der Applikationsdauer
Biphaseische Antworten bei lokaler Druckapplikation (5 psi) von 1 mM GABA mit der Applikationsdauer von 50 ms (links). Das biphaseische Muster zeigt zunächst eine erste schnelle auswärts gerichtete Komponente, auf die dann eine langsamere und schwächere einwärts gerichtete Komponente folgt. Durch Verkürzung der Applikationsdauer auf 10 ms (rechts) verschwand die einwärtsgerichtete Komponente vollständig. Die Zelle wurde auf einem Potential von -74 mV in der *whole-cell*-Konfiguration gehalten.

3.5 Modulation inhibitorischer Afferenzen der MC

In den vorangegangenen Abschnitten war die postsynaptische Membran der MC Gegenstand der Untersuchung. Es konnte gezeigt werden, dass GABA-induzierte Ströme an den MC durch GABA_A-Rezeptoren vermittelt und die ausgelösten postsynaptischen Ströme Chloridionen basiert sind. Um die physiologische Innervation der MC durch inhibitorische (GABAerge) Afferenzen zu zeigen, wurden diese Axone mit Hilfe der elektrischen Stimulation angeregt. Des Weiteren sollten durch den Einwasch des GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen untersucht werden, ob die präsynaptischen inhibitorischen Terminalen GABA_B-Rezeptoren exprimieren und welchen Einfluss diese auf die synaptische Transmission haben. Bei der hier durchgeführten elektrischen Stimulation mittels bipolarer Elektrode (Abschnitt 2.7) wurden einzelne bis wenige Fasern, welche auf Martinotti-Zellen projizieren, gereizt. Um ausschließlich die inhibitorischen Eingänge als postsynaptische IPSC zu messen, wurde die exzitatorische synaptische Übertragung durch Antagonisten für NMDA- und AMPA-Rezeptoren blockiert. Ziel der Versuche war es, die präsynaptischen inhibitorischen Terminalen zu charakterisieren, dabei insbesondere die Expression von präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren und deren Einfluss auf die synaptische Transmission zu untersuchen.

Evozierte IPSC wurden an Martinotti-Zellen, die mit einer Cs-basierten Intrazellulärlösung abgeleitet wurden, bei einem Haltepotential von +10 mV aufgezeichnet. Unter diesen Ableitbedingungen war ein ausreichend großer elektrochemischer Gradient für Chloridionen vorhanden ($E_{\text{GABA}} = -72,5$ mV, Abschnitt 3.3). Um auszuschließen, dass die elektrische Stimulation eine direkte Wirkung auf die abgeleitete Martinotti-Zelle hat, wurden Versuche mit einer 0,1 mM Ca²⁺ haltigen ACSF-Lösung durchgeführt (Abb. 6.1). Die ausgelösten auswärtsgerichteten Ströme konnten durch Reduktion der extrazellulären Kalziumkonzentration auf $0,5 \pm 1$ % (n=4) der ursprünglich ausgelösten Amplitude herabgesetzt werden. Nach dem Auswasch mit normalem 2 mM Ca²⁺ ACSF war die Blockade nahezu vollständig reversibel ($85,0 \pm 13,8$ %). Durch die verringerte extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration kommt es an der Präsynapse zu einem verminderten Ca²⁺-Einstrom und demzufolge zur Reduktion der Transmitterausschüttung. Diese Versuche mit 0,1 mM Ca²⁺ in der extrazellulären Lösung und der damit einhergehenden Reduktion der postsynaptischen Ströme gelten als Nachweis der synaptischen Übertragung infolge der elektrischen Stimulation.

Insgesamt konnten an 16 untersuchten Martinotti-Zellen inhibitorische postsynaptische Ströme ausgelöst werden. Dazu wurde die elektrische Stimulation wie folgt eingestellt: 20-40 μm entfernt vom Zellkörper, 7-25 μA Stimulationsstärke, 100 μs Dauer, 10 s Pause (Details Abschnitt 2.7). Nach Einstellung der eIPSC wurden zunächst 10 eIPSC aufgezeichnet. Diese wurden bei der Auswertung gemittelt und dienten für alle nachfolgenden Versuche als Referenz. Zum Nachweis potentieller GABA_B-Rezeptoren auf der präsynaptischen Terminalen wurde 10 μM Baclofen eingewaschen und die Auswirkungen auf die Amplitude der eIPSC untersucht. Es wurde stets so eine Stimulationsstärke ausgewählt, bei der sowohl eine Steigerung als auch eine Reduktion der eIPSC Amplitude detektiert werden konnte. Nach einem 10-minütigen Einwasch von 10 μM Baclofen wurden die präsynaptischen Fasern erneut mit der gleichen Stimulationsstärke gereizt. Dabei konnte eine Reduktion der mittleren Amplituden auf $33,5 \pm 16,3 \%$ bei allen 16 untersuchten Martinotti-Zellen beobachtet werden (Abb. 3.10). Anschließend wurde an 6 Zellen Baclofen aus der extrazellulären Lösung durch eine ACSF-Lösung mit 10 μM CGP52432 ausgewaschen (Abb. 3.10 B). Infolgedessen kann es zu einem Anstieg der detektierten Amplituden auf $68,8 \pm 21,4 \%$ der Ursprungsamplitude. An weiteren 6 Zellen wurde 10 μM CGP52432 zusätzlich zu 10 μM Baclofen eingewaschen. Bei diesen Zellen gehen die registrierten Amplituden wieder auf $82,4 \pm 33,5 \%$ der Ausgangsamplitude zurück.

Durch den Einsatz des GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen und des Antagonisten CGP52432 lassen sich diese Effekte eindeutig auf eine Aktivierung von präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren an den inhibitorischen Terminalen zurückführen.

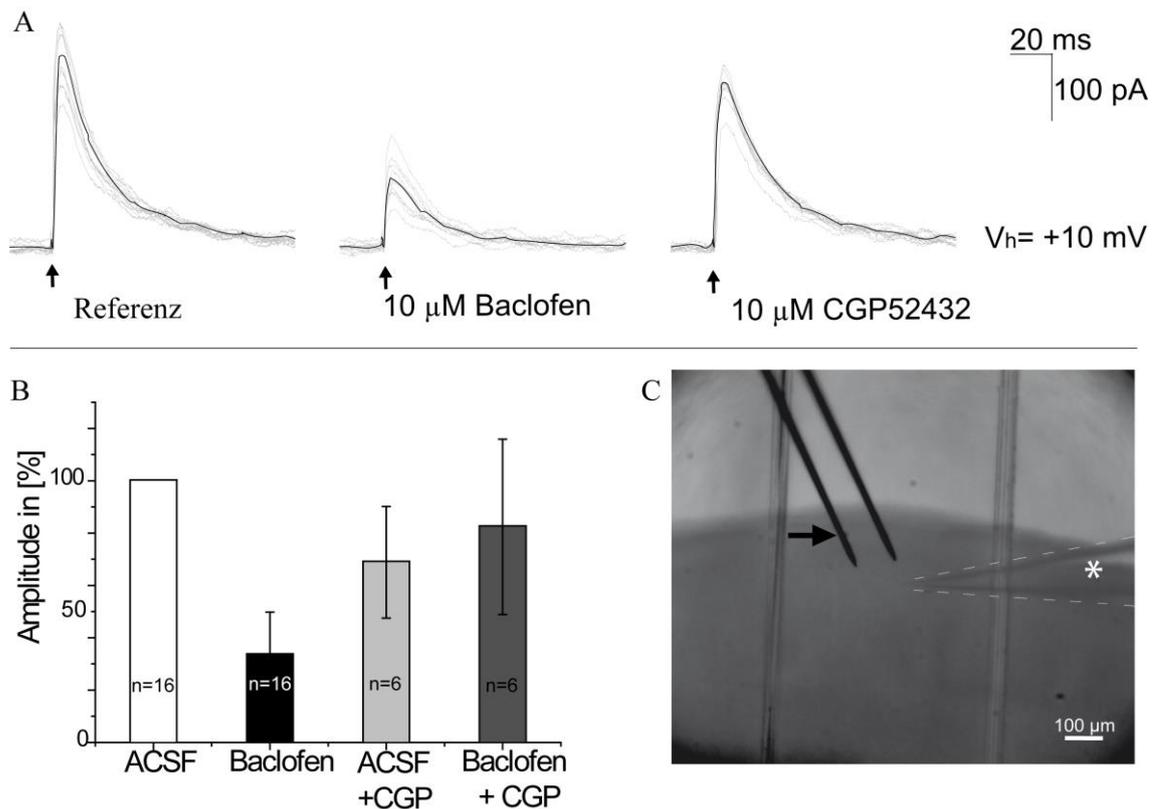


Abbildung 3.10: Pharmakologische Modulation von eIPSC mittels Baclofen

(A) Postsynaptische inhibitorische Ströme (eIPSC) wurden durch lokale Feldstimulation ($9 \mu\text{A}$) an einer Martinotti-Zelle bei einem Haltepotential von $+10$ mV ausgelöst. Schwarze Spuren stellen die mittlere Antwort aus 10 Einzelstimulationen (graue Spuren) dar. Ein Einwaschen von $10 \mu\text{M}$ Baclofen führte zu einer um 63 % reduzierten Amplitude der eIPSC (Mitte) im Vergleich zur Referenzstimulation (links). Dieser Effekt war durch ein Einwaschen des spezifischen GABA_B -Rezeptor-Antagonisten CGP52432 ($10 \mu\text{M}$) nahezu vollständig (85 %) reversibel (rechts). Stimulationsbeginn ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. **(B)** Das Balkendiagramm zeigt die Amplitudenstärke der eIPSC (Mittelwert \pm SEM) von 16 Martinotti-Zellen unter Kontrollbedingungen (ACSF), unter Baclofen und den Auswaschversuchen mit ACSF+CGP bzw. Baclofen+CGP. Unter den Einfluss von $10 \mu\text{M}$ Baclofen kommt es zur Reduktion der Amplitude auf $33,5 \pm 16,3$ %. Im nachfolgenden Auswasch mittels ACSF und $10 \mu\text{M}$ CGP52432 erreicht die Amplitudenstärke im Mittel $68,8 \pm 21,4$ % der Referenz. Bei einem Auswasch mit Baclofen und $10 \mu\text{M}$ CGP52432 liegt die Amplitudenstärke bei $82,4 \pm 33,5$ %. **(C)** Dargestellt ist eine lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme des *Barrel*-Kortexes bei Experimenten mit elektrischer Stimulation. Mit \rightarrow ist die Stimulationselektrode markiert, welche sich $30\text{-}40 \mu\text{m}$ entfernt zur abgeleiteten Zelle befindet. Mit * ist die Ableitelektrode gekennzeichnet.

Für die synaptische Transmission spielt neben der Übertragung einzelner Aktionspotentiale die Plastizität der Synapse eine entscheidende Rolle. Daher wurde zur weiteren Beurteilung der physiologisch relevanten Wirkungen von Baclofen bzw. von GABA_B -Rezeptoren an der Präsynapse Mehrfachstimulation in Form von Zweifach-Stimulationen (*Paired-Pulse stimulation*), sowie repetitive Stimulationen mit 10 Stimuli durchgeführt. Zunächst kamen Zweifach-Stimulationen mit den Frequenzen 1, 8 und 40 Hz zum Einsatz. Wie bei den Einzelstimulationen wurde zu Beginn eine Kontrollstimulation unter ACSF (Referenz)

ermittelt, um den anschließenden pharmakologischen Effekt beurteilen zu können. Bei der Frequenz von 1 Hz konnten an 7 Martinotti-Zellen Amplituden im Bereich von 43,1 bis 105,7 pA für den ersten Stimulus und 31,9 bis 99,2 pA für den zweiten Stimulus beobachtet werden (Abb. 3.11 A+B). Im Mittel (Mittelwert \pm SEM) entsprach dieses Amplituden von $78,1 \pm 8,0$ pA (1. Stimulus) und $64,7 \pm 9,3$ pA (2. Stimulus), d.h. es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Amplitude für den 2. Stimulus. Dieser Effekt war ebenso bei den Frequenzen 8 Hz und 40 Hz zu beobachten (Abb. 3.11 A+C+D). Die mittleren Amplituden betragen $77,4 \pm 7,9$ pA und $55,6 \pm 8,7$ pA bei der 8 Hz Stimulation, sowie $89,7 \pm 15,6$ pA und $66,2 \pm 9,2$ pA für die 40 Hz Stimulation (Abb. 3.11 C+D). Um die Reduktion der Amplitude in der Zweifach-Stimulationen zwischen den untersuchten Frequenzen zu vergleichen, wurde die zweite Amplitude ins Verhältnis zur ersten gesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Reduktion der Amplitude in der 8 Hz Stimulation ($69,5 \pm 0,0$ %) signifikant stärker ausfällt als für die Frequenzen 1 Hz ($81,6 \pm 0,0$ %) und 40 Hz ($80,3 \pm 0,1$ %) (Abb. 3.11 E). Der Effekt der Reduktion der Amplitude bei Mehrfachstimulationen wird als depressive Kurzzeitplastizität (*short-term depression*, STD) bzw. Kurzzeit-Depression der untersuchten Synapse bezeichnet.

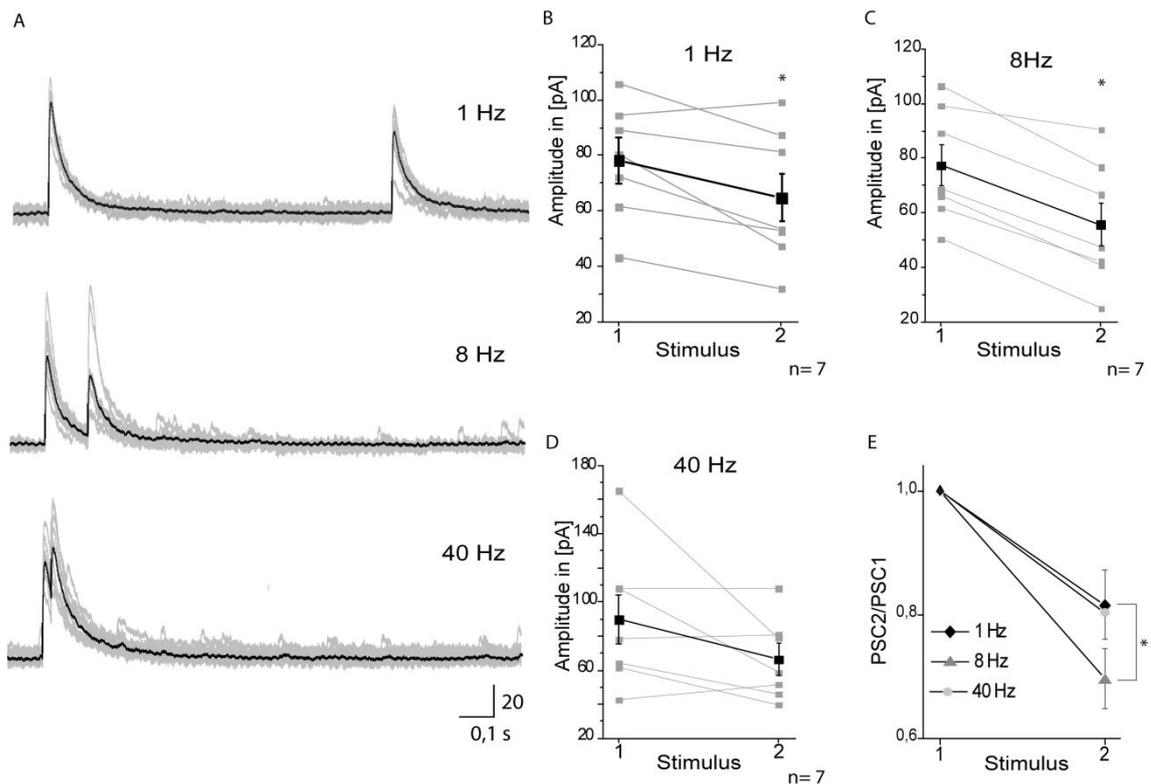


Abbildung 3.11: Synaptische Kurzzeitplastizität von eIPSC bei Zweifach-Stimulationen

(A) Evozierte inhibitorische postsynaptische Ströme wurden durch Zweifach-Stimulationen an einer Martinotti-Zelle bei einem Haltepotential von +10 mV ausgelöst. Schwarze Spuren stellen die mittlere Antwort aus 10 Einzelstimulationen (graue Spuren) dar. (B, C, D) Amplituden der gemittelten eIPSC mit Mittelwert und SEM (schwarz) aus sieben Martinotti-Zellen (Einzelzellen in grau) bei den Stimulationsfrequenzen 1, 8 und 40 Hz. Es kommt zu einer signifikanten Reduktion der 2. Amplitude für die Stimulationsfrequenzen 1 und 8 Hz ($p < 0,05$; Student's t-Test). (E) Relative Darstellung des Verhältnisses der Amplitude des zweiten eIPSC zum ersten eIPSC in Abhängigkeit von den Frequenzen. Es zeigt sich eine Kurzzeitplastizität in Form einer Depression der zweiten Amplitude, dabei kommt es zur Reduktion der Amplituden auf $81,6 \pm 0,06 \%$ für 1 Hz, $69,5 \pm 0,04 \%$ für 8 Hz und $80,3 \pm 0,1 \%$ für 40 Hz (Mittelwert und SEM).

Um den Einfluss von präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren auf die Kurzzeitplastizität zu untersuchen, wurden 10 μM Baclofen eingewaschen. Baclofen sorgte, analog zu den Einzelstimulationen, für kleinere evozierte postsynaptische Ströme im Vergleich zur Kontrollsituation (Abb. 3.12 A+B). Dabei wird deutlich, dass die Amplituden des ersten und zweiten Stimulus nicht mehr so deutlich unterschiedlich voneinander sind (Abb. 3.12 A+B). In der quantitativen Analyse konnte diese Beobachtung für 7 untersuchte Martinotti-Zellen bestätigt werden. In allen drei getesteten Frequenzen zeigten unter Baclofen die mittleren Amplituden (MW \pm SEM) beider Stimuli keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$; Student's t-Test) zu einander (Abb. 3.12 C). Bei der 1-Hz-Stimulation betrug die zweite Amplitude $86,6 \pm 0,1 \%$ von der ersten Amplitude, bei 8 Hz $93,4 \pm 0,1 \%$ und bei 40 Hz $95,4 \pm 0,1 \%$ (Abb. 3.12 C).

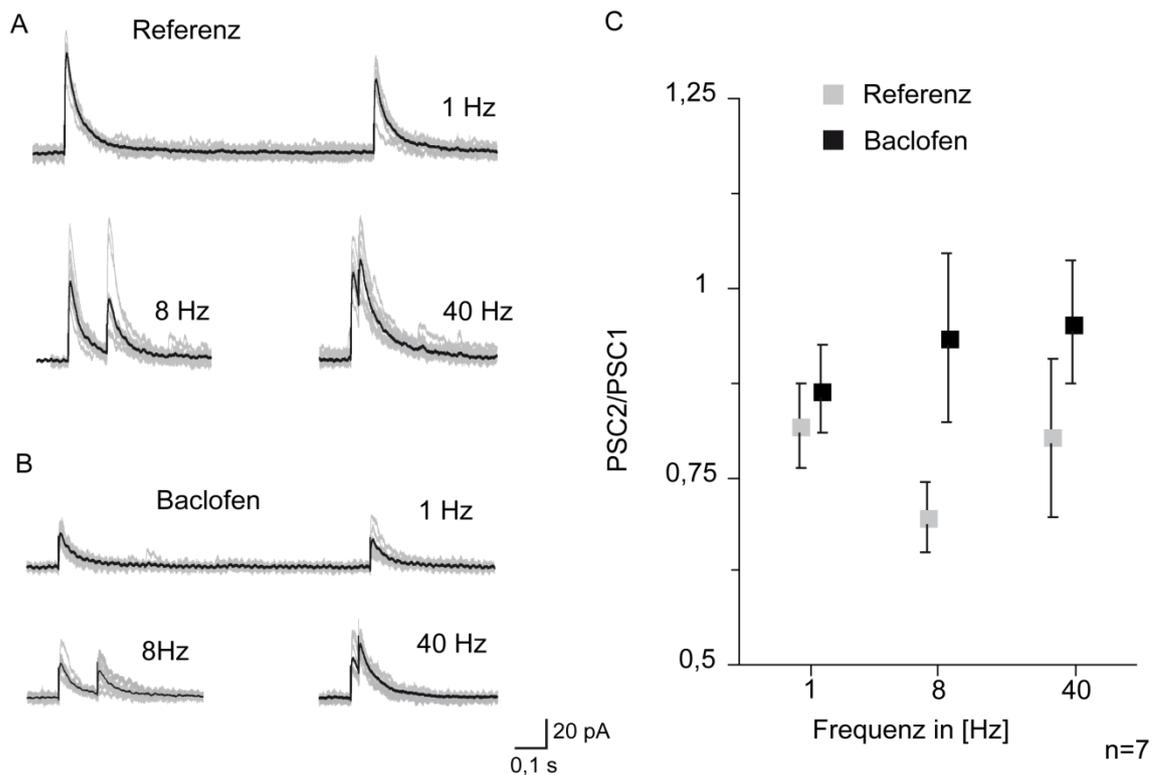


Abbildung 3.12: Effekt von Baclofen auf die eIPSC bei Zweifach-Stimulationen

(A,B) Evozierte inhibitorische postsynaptische Ströme wurden durch Zweifach-Stimulationen an einer Martinotti-Zelle bei einem Haltepotential von +10 mV unter Kontrollbedingungen (A) und unter 10 μ M Baclofen (B) ausgelöst. Schwarze Spuren stellen die mittlere Antwort aus 10 Einzelstimulationen (graue Spuren) dar. (C) Vergleich der relativen Änderung der Amplituden des zweiten eIPSC zum ersten eIPSC bei 7 abgeleiteten Martinotti-Zellen. Unter Baclofen (schwarze Quadrate) kommt es zu einer geringeren Reduktion der Amplituden im Vergleich zur Referenz (graue Quadrate). Dieser Effekt ist bei allen Frequenzen vorhanden; Kontrolle: $81,6 \pm 0,0\%$ für 1 Hz, $69,5 \pm 0,0\%$ für 8 Hz und $80,3 \pm 0,1\%$ für 40 Hz, unter Baclofen: $86,6 \pm 0,1\%$ für 1 Hz, $93,4 \pm 0,1\%$ für 8 Hz und $95,4 \pm 0,1\%$ für 40 Hz (Mittelwert und SEM).

Analog zu den Zweifach-Stimulationen wurden Mehrfachstimulationen mit 10 repetitiven Stimuli in den drei Frequenzen 1, 8 und 40 Hz an drei Martinotti-Zellen durchgeführt. Die Stimulationen wurden zehnmals pro Frequenz und Zelle wiederholt und für die Auswertung eine gemittelte Spur aus den zehn Aufzeichnungen der jeweiligen Frequenz berechnet.

An 3 Martinotti-Zellen konnten Mehrfachstimulationen mit 1, 8 und 40 Hz durchgeführt werden (Abb. 3.13 A). Analog zur vorangegangenen Versuchsreihe waren die mittleren Amplituden der Stimuli zwei bis zehn stets kleiner als bei der ersten Stimulation. In der quantitativen Auswertung wurden die Amplituden zwei bis zehn ins Verhältnis zu ersten Amplitude gesetzt und grafisch dargestellt (Abb. 3.13 B-E). Dabei zeigte sich, dass die Amplituden vom ersten zum fünften Stimulus immer stetig niedriger ausfielen. Ab dem sechsten Stimulus blieben die Amplituden annähernd auf einem Plateau. Die Reduktion der Amplituden war frequenzabhängig, mit dem größten Depressionseffekt bei 40 Hz (Abb. 3.13 E). Vergleicht man die erste Amplitude mit dem Mittelwert aus den Amplituden

6-10 für jede Frequenz, so lässt sich für 1 Hz eine synaptische Depression auf $72,0 \pm 0,0 \%$, für 8 Hz auf $45,7 \pm 0,0 \%$ und für 40 Hz auf $34,6 \pm 0,0 \%$ zur ersten Amplitude festhalten (Abb. 3.14 E). Dabei sind die synaptischen Depressionen frequenzunabhängig zu einander signifikant unterschiedlich.

Nach der Aufzeichnung der Ströme unter Kontrollbedingungen wurde $10 \mu\text{M}$ Baclofen eingewaschen und das Versuchsprotokoll mit gleicher Stimulusstärke und derselben Position der Stimuluselektrode wiederholt. Es zeigte sich wie auch bei der Einzel- und Zweifach-Stimulationen, dass die Amplituden unter Baclofen kleiner ausfielen als unter Kontrollbedingungen (Abb. 3.14 A). Jedoch zeigten die mittleren Amplituden der 3 abgeleiteten Martinotti-Zellen unter Baclofen eine geringere Reduktion für die Stimuli zwei bis zehn im Vergleich zum ersten Stimulus (Abb. 3.14 B-D, schwarze Quadrate). Dieser Effekt konnte bei 1, 8 und 40 Hz beobachtet werden. Jedoch war ausschließlich bei der 8 und 40 Hz Stimulation eine signifikant geringere Kurzzeit-Depression der IPSC unter Baclofen nachzuweisen (Abb. 3.14 E). Ein weiterer Einwasch von $10 \mu\text{M}$ CGP52432 und $10 \mu\text{M}$ Baclofen führte wieder zu einem Anstieg der Amplituden, ähnlich zur Amplitude unter Kontrollbedingungen (Ströme nicht gezeigt). Im Verhältnis der mittleren Amplituden der Plateauphase (PSC6-10) mit der Amplitude des ersten Stimulus (PSC1) wird deutlich, dass durch die Blockade der präsynaptischen GABA_B -Rezeptoren durch CGP52432 die Reduktion der Amplitude wieder auf Kontrollniveau zurückgeht (Abb. 3.14 E, graue Kreise). Insgesamt lässt sich unter Baclofen eine größere Variabilität in den Amplituden infolge der 10 repetitiven Stimuli feststellen, die bei höheren Frequenzen sich nochmals vergrößert.

Letztlich konnte mittels der Mehrfachstimulation eindeutig nachgewiesen werden, dass die auf den Martinotti-Zellen terminierenden inhibitorischen Fasern als Kurzzeitplastizität eine Depression aufweisen. Diese Kurzzeit-Depression tritt bereits beim zweiten Stimulus, d.h. beim zweiten einlaufenden Aktionspotential auf und erhöht sich weiter, bis sie zwischen dem 6.-10. Stimulus ein Plateau erreicht. Dabei führt eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz zu einer erhöhten Depressionswirkung auf bis zu $34,5 \pm 0,0 \%$. Bei einer Aktivierung präsynaptischer GABA_B -Rezeptoren durch Baclofen wird die depressive Kurzzeitplastizität der postsynaptischen Ströme bei Mehrfachstimulation signifikant verringert.

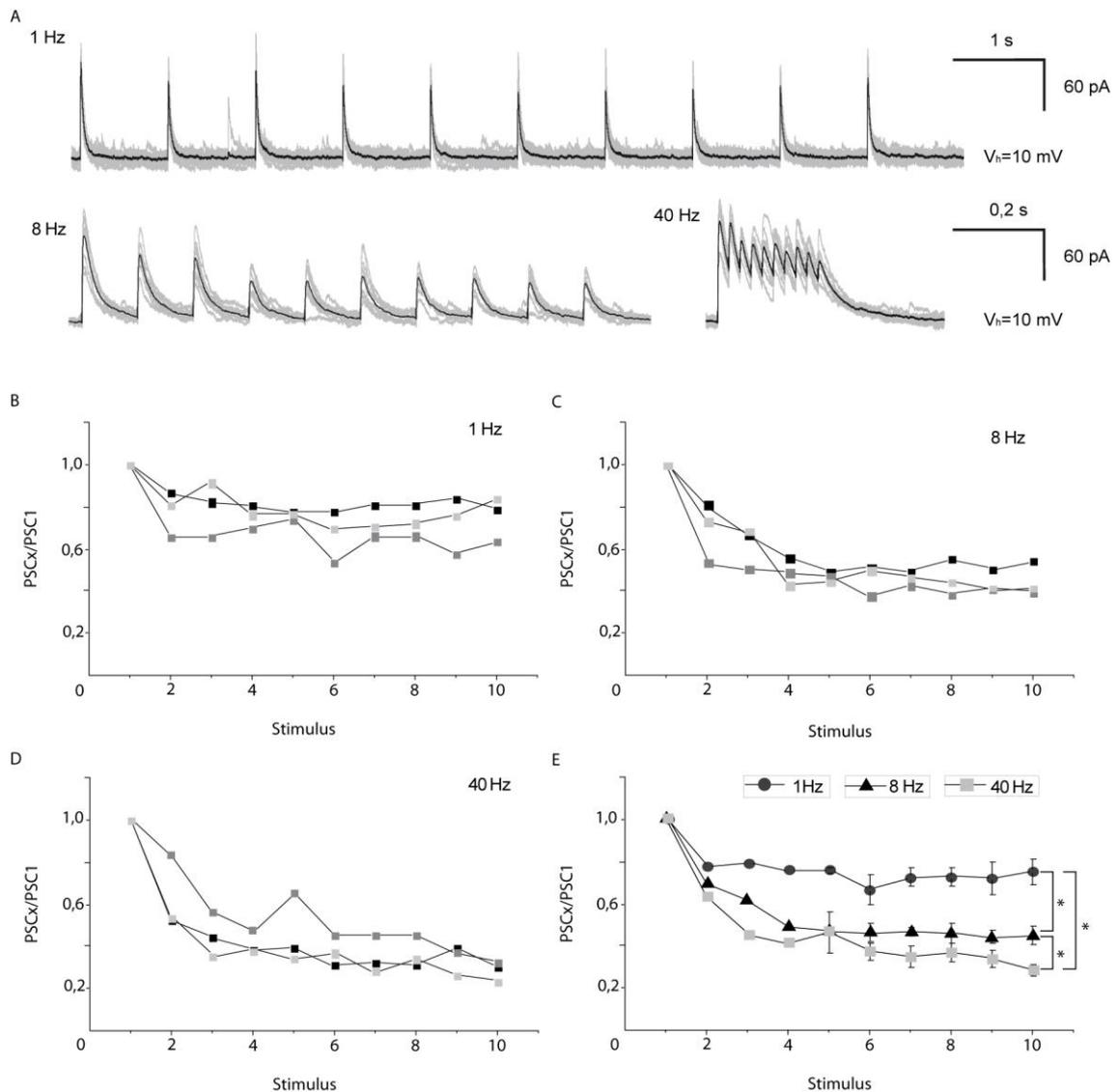


Abbildung 3.13: Synaptische Kurzzeitplastizität von eIPSC bei Mehrfach-Stimulationen

(A) Evozierte inhibitorische postsynaptische Ströme wurden durch 10 repetitive Mehrfachstimulation mit den Frequenzen 1, 8 und 40 Hz an einer Martinotti-Zelle bei einem Haltepotential von +10 mV ausgelöst. Schwarze Spuren stellen die mittlere Antwort aus 10 Wiederholungen (graue Spuren) dar. **(B, C, D)** Darstellung der gemittelten Amplituden der eIPSC für alle 10 repetitiven Stimuli von drei Martinotti-Zellen (schwarz, grau, hellgrau) bei den Frequenzen 1, 8 und 40 Hz. Dabei sind die Amplituden infolge der Stimuli zwei bis zehn im Verhältnis zur ersten Amplitude aufgetragen. **(E)** Vergleich der gemittelten Amplituden (Mittelwert+SEM) der 10 repetitiven Stimuli in den Frequenzen 1, 8 und 40 Hz aus drei MC. Die synaptische Kurzzeitplastizität zeigt einen größeren depressiven Effekt der gemittelten Amplituden der Stimuli 6-10 (Plateauphase) bei höheren Frequenzen, $72,0 \pm 0,0$ % für 1 Hz, $45,7 \pm 0,0$ % für 8 Hz und $34,6 \pm 0,0$ % für 40 Hz.

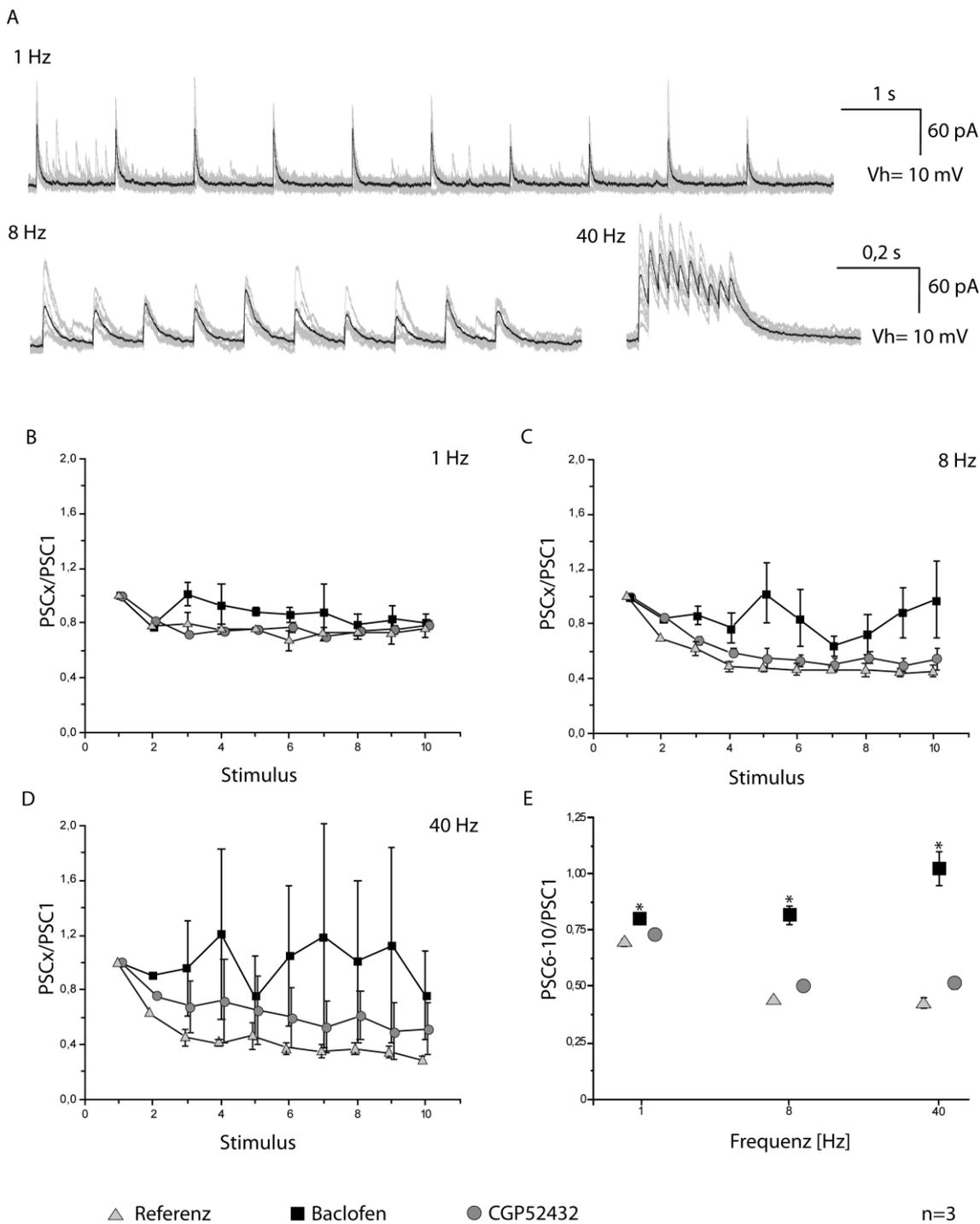


Abbildung 3.14: Modulation der Kurzzeitplastizität durch GABA_B-Rezeptoren

(A) Evozierte inhibitorische postsynaptische Ströme wurden durch 10 repetitive Mehrfachstimulation mit den Frequenzen 1, 8 und 40 Hz an einer Martinotti-Zelle bei einem Haltepotential von +10 mV unter 10 μM Baclofen ausgelöst. Schwarze Spuren stellen die mittlere Antwort aus 10 Wiederholungen (graue Spuren) dar. (B,C,D) Darstellung der mittleren Amplituden (Mittelwert+SEM) der eIPSC für alle 10 repetitiven Stimuli von drei Martinotti-Zellen unter Kontrollbedingungen (graues Dreieck), unter Baclofen (schwarzes Quadrat) und unter 10 μM CGP52432 (grauer Kreis) für die Frequenzen 1 (B), 8 (C) und 40 Hz (D). Dabei sind die Amplituden zwei bis zehn im Verhältnis zur ersten mittleren Amplitude aufgetragen. Unter Baclofen kommt es zu einer geringeren Reduktion der Amplituden, insbesondere für die Stimulationsfrequenzen 8 und 40 Hz. (E) Darstellung des Amplitudenverhältnisses zwischen erster Amplitude und gemittelter Amplitude der Stimuli 6-10 (Plateauphase) für die drei pharmakologischen Bedingungen. Bei höheren Stimulationsfrequenzen (8 und 40 Hz) ist die Depression in der Kurzzeitplastizität signifikant geringer als unter Kontrollbedingungen und unter CGP.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden postsynaptische GABA-Rezeptoren auf den Martinotti-Zellen im *Barrel*-Kortex mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode charakterisiert. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich metabotrope GABA_B-Rezeptoren auf den präsynaptischen Terminalien inhibitorischer Interneurone, die auf die Martinotti-Zellen projizieren, befinden. Die *in-vitro*-Versuche erfolgten an akuten Hirnschnitten der GIN-Maus.

Für Martinotti-Zellen (MC) konnten folgende Hauptaussagen getroffen werden:

1. Auf der postsynaptischen Membran von MC befinden sich ionotrope GABA_A-Rezeptoren und keine metabotropen GABA_B-Rezeptoren
2. Ausgelöste Ströme sind hauptsächlich durch Chloridionen getragen
3. GABA- und Muscimol- induzierte Ströme unterscheiden sich in ihrer Kinetik
4. Inhibitorische Synapsen auf den MC zeigen Kurzzeitplastizität in Form einer Depression
5. Präsynaptische GABA_B-Rezeptoren modulieren inhibitorische Terminalien auf die MC
6. Durch Aktivierung präsynaptischer GABA_B-Rezeptoren wird die Kurzzeit-Depression der eIPSC verringert.

Somit zeigen diese Ergebnisse, dass die inhibitorische Transmission auf die MC nach einem komplexen Zusammenspiel erfolgt. Eine GABA-Ausschüttung an der Präsynapse scheint nicht nur die postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren zu aktivieren, sondern könnte in der Lage sein die eigene Freisetzung über präsynaptische GABA_B-Rezeptoren zu regulieren. Ob diese Möglichkeit der eigenen präsynaptischen Modulation besteht oder ob die inhibitorischen Terminalien durch andere GABAerge Interneurone moduliert werden, insbesondere unter physiologischen Bedingungen, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

4.1 Methodische Betrachtung

Die Patch-Clamp-Methode mit extra- und intrazellulären Ableitungen an akuten Hirnschnitten stellt ein gut etabliertes Verfahren der Physiologie zur elektrophysiologischen Untersuchung ausgewählter Zellen dar (Numberger und Draguhn 1996; Molleman 2002; Verkhratsky et al. 2006). Im Vergleich zu *in-vivo*-Untersuchungen, bei denen das neuronale Netzwerk intakt und vollständig erhalten bleibt, beschränkt man sich bei den akuten Hirnschnitten auf nur einen Ausschnitt des Netzwerks. Jedoch ermöglicht dieser Ausschnitt eine gezielte Betrachtung ausgewählter Zellpopulationen. Mit der Technik der lokalen Druckapplikation war es möglich, gezielt Pharmaka in räumlicher Nähe der abgeleiteten Zellen zu applizieren und anschließend eine postsynaptische Reaktion zu detektieren. Mit Hilfe dieser Methode besteht die Möglichkeit, gezielt die pharmakologischen Einflüsse auf die Zelle zu untersuchen, welche unter *in-vivo*-Bedingungen nur schwer realisierbar sind. Das Vorgehen entsprach den hierbei üblichen Laborstandards und ist somit vergleichbar mit anderen Arbeiten.

In den Charakterisierungsversuchen wurden die Agonisten der zu untersuchenden GABA-Rezeptoren, wie GABA, Muscimol und Baclofen, über eine Glaskapillare per Druckapplikation mit einer Dauer von 50 ms und einem Druck von 5 psi an die abgeleitete MC appliziert. Die Position der Glaskapillare wurde so gewählt, dass die Substanzen die Zelle umspülten und ein klares monophasisches Antwortverhalten der Zellen beobachtet wurde. Die eingesetzten Antagonisten der GABA-Rezeptoren (GABA_Azine und CGP) wurden per Badapplikation eingewaschen. Für die Charakterisierungsversuche der postsynaptischen Membran der MC wurden Kaliumgluconat gefüllte Patch-Pipetten verwendet. Eine Aktivierung postsynaptischer GABA_B-Rezeptoren sorgt in der Regel für eine Öffnung von Kaliumkanälen (Williams und Colmers 1988; Dutar und Nicoll 1988). Kaliumgluconat-basierte Intrazellulärlösungen blockieren im Gegensatz zu häufig in Rezeptor-Charakterisierungsstudien verwendeten Cäsium-basierten Lösungen nicht die Kaliumkanäle, somit bleiben postsynaptischer GABA_B-Rezeptoren in ihrer Wirkung unbeeinflusst.

Für die Untersuchung der synaptischen Transmission von präsynaptischen inhibitorischen Interneuronen auf MC wurde mittels einer bipolaren Stimulationselektrode deren Fasern stimuliert. Des Weiteren wurde der modulatorische Effekt von präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren auf den Terminalien durch den Einwasch von Baclofen untersucht. Die Ableitungen der MC erfolgten mit einer Cäsium-basierten Intrazellulärlösung und die evozierten inhibitorischen postsynaptischen Ströme (eIPSC) wurden unter Kontrollbedingungen und unter pharmakologischen Einfluss registriert. Intrazelluläre

Cäsium-Ionen blockieren die *low-voltage* und *high-voltage* Kaliumleitfähigkeit und führen zu einer „kompakten“ Zelle (Hille 2001). Dadurch können geringe Amplituden von distalen synaptischen Eingängen registriert werden, da die repolarisierend wirkenden Kaliumkanäle entlang der Dendriten der MC durch Cäsium blockiert sind. Weiterhin können auf diese Weise die Zellen stabiler auf einem definierten Haltepotential geklemmt werden. Das eingestellte Haltepotential von +10 mV führt zu einem hohen einwärtsgerichteten Chloridgradienten, wodurch selbst schwach ausgebildete inhibitorische Synapsen detektiert werden können. Die Stimulationsexperimente, sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter pharmakologischen Applikation, verursachten bei den abgeleiteten Zellen stets den gleichen Effekt, jedoch unterschieden sich die Amplituden von Zelle zu Zelle, trotz des standardisierten Ablaufs (siehe Material und Methoden). Dies lässt sich zum einen durch die unterschiedliche Stärke der stimulierten Synapsen in Form von unterschiedlicher Vesikelausschüttung erklären. Zum anderen kann nicht davon ausgegangen werden, dass immer die gleiche Anzahl an inhibitorischen Fasern stimuliert wird. Beidem unterliegt die Tatsache, dass sich minimale Änderungen der Stimulationsstärke auf das postsynaptische Antwortverhalten auswirken. Deswegen wurde die Einstellung der Stimulationsstärke mit größter Sorgfalt vorgenommen und darauf geachtet, dass die 10 repetitiven Stimulationen unter Kontrollbedingungen stets eine annähernd gleiche Amplitude aufwiesen. In den nachfolgenden pharmakologischen Versuchen wurde sowohl die Stärke als auch die Position der Stimulationselektrode nicht mehr verändert.

Trotz des Einsatzes der Cäsium-basierten Intrazellulärlösung kann nicht davon ausgegangen werden, dass Limitationen der *in-vitro*-Elektrophysiologie umgangen werden konnten. Eine nicht zu unterschätzende Limitation in *whole-cell patch-clamp*-Ableitungen ist der sogenannte *space-clamp* Fehler. Dieser besagt, dass das vom Experimentator eingestellte Haltepotential am Soma, wo die Ableitelektrode die Zelle berührt, nicht zwangsläufig für die komplette Zelle als gegeben angesehen werden kann. Ebenso können ausgelöste postsynaptische Ströme von stimulierten, weit distal terminierenden Fasern nicht immer am Soma der abgeleiteten Zelle registriert werden. Durch Vorversuche der Arbeitsgruppe mit Hilfe der Photolyse von caged-GABA (Daten nicht gezeigt) konnte gezeigt werden, dass alle inhibitorischen Synapsen entlang des max. 250 µm weit ausladenden Dendritenbaumes und deren resultierende eIPSC am Soma der abgeleiteten MC detektiert werden konnten. Jedoch können die registrierten Amplitudenunterschiede der eIPSC zwischen den Zellen nicht abschließend auf eine Stimulation von weniger oder mehr Fasern oder auf eine Stimulation von Fasern mit mehr oder weniger Synapsen oder auf

eine Stimulation von mehr perisomatisch gegenüber mehr distal terminierenden Fasern angesehen werden. Daher werden die Amplituden der eIPSC der einzelnen Zellen meist normalisiert dargestellt.

4.2 Charakterisierung der abgeleiteten Zellen als Martinotti-Zellen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden ausschließlich an GFP-positiven Zellen der GIN-Maus durchgeführt. Die GIN-Maus ist eine gut charakterisierte transgene Mauslinie, in der eine Subpopulation von Somatostatin-exprimierenden Interneuronen mit GFP markiert ist (Oliva et al. 2000). Eine Untergruppe der Somatostatin-positiven Zellen stellen die Martinotti-Zellen dar (Wang et al. 2004; Rudy et al. 2011, Staiger et al. 2015). Dabei erfassen die GFP-positiven Zellen annähernd 50 % der SOM-positiven Zellen der Schicht II/III des somatosensorischen Kortex, und annähernd 80 % der GFP-positiven Zellen sollen Martinotti-Zellen repräsentieren (Wang et al. 2004; Ma et al. 2006). Somit stellt die GIN-Maus ein gutes Tiermodell zur Untersuchung von Martinotti-Zellen dar.

Eine Untergruppierung der Martinotti-Zellen ist aufgrund der Expression des Kalziumbindenden Proteins Calretinin beschrieben (Rudy et al. 2011). In dieser Arbeit wurde eine Unterscheidung zwischen Calretinin-positiven und Calretinin-negativen Martinotti-Zellen nicht durchgeführt, da sowohl die vorliegenden Ergebnisse für die Charakterisierung von GABA-Rezeptoren als auch für die Stimulation präsynaptischer inhibitorischer Fasern nicht auf Subpopulationen hindeuten. Eine weitere Gruppe Somatostatin-positiver-Zellen sind die X94-Zellen. Sie unterscheiden sich von den Martinotti-Zellen nicht nur durch ihre elektrophysiologischen und morphologischen Eigenschaften, sondern zeichnen sich auch dadurch aus, dass sie auf die Schichten IV und V des Neokortex begrenzt sind (Rudy et al. 2011).

Die von mir beschriebenen Ergebnisse wurden von morphologisch und elektrophysiologisch charakterisierten Martinotti-Zellen der Schicht II/III des *Barrel*-Kortex erhoben. Dafür wurden neben dem GFP-Signal der transgenen GIN-Maus zur Identifikation im Hirnschnitt die elektrophysiologischen Eigenschaften wie das Ruhemembranpotential sowie passive Eigenschaften und das Feuermuster (ausgelöste Aktionspotential) unmittelbar nach Etablierung der *whole-cell* Konfiguration genutzt. Insbesondere bei den mit der Kaliumgluconat-Intrazellulärlösung abgeleiteten Zellen konnte das für Martinotti-Zellen typische adaptierende Feuermuster während depolarisierender Strompulse beobachtet werden (Abb. 3.3). Dieses Feuermuster stellt mit 83,7 % (n=36) der Zellen in der Schicht II/III das häufigste Feuermuster dar. Einen

weitaus geringeren Teil stellt mit 16,3 % ($n=7$) das nicht-adaptierende Feuermuster (Wang et al. 2004) dar. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten, insbesondere zur Charakterisierung postsynaptischer GABA-Rezeptoren, stammen ausschließlich von GFP-positiven Zellen mit adaptierendem Feuermuster.

Bei Verwendung der Cäsium-basierten intrazellulären Lösung konnte diese detaillierte elektrophysiologische Charakterisierung nicht durchgeführt werden. Cäsium-Ionen blockieren die Kaliumleitfähigkeit der abgeleiteten Zelle, was weitreichende Folgen hat: (1) depolarisiertes Ruhemembranpotential, (2) erhöhter Eingangswiderstand, (3) langsamere Repolarisation der Aktionspotentiale, (4) reduzierte und zeitlich veränderte Nachhyperpolarisierung (AHP) und (5) letztendlich ein verändertes Feuermuster (Hille 2001). Daher wurden lediglich die passiven Eigenschaften der abgeleiteten Zellen unmittelbar nach dem Durchbrechen der Zellmembran bestimmt, wo der Effekt der Cäsium-Ionen am geringsten ist. Eine der charakteristischen passiven Eigenschaften ist das Vorhandensein einer Senke (*sag*) infolge einer Applikation negativer Strompulse (Wang et al. 2004, Ma et al. 2006). Diese Senke lässt sich auf I_H -Ströme zurückführen, die durch Kaliumströme infolge einer Hyperpolarisation vermittelt sind. Diese Ströme wurden auch für andere kortikale Neurone beschrieben (Yang et al. 1996). Dennoch stellen diese Ströme ein weiteres elektrophysiologisches Differenzierungsmerkmal dar, insbesondere bei abgeleiteten Martinotti-Zellen mittels Cs-basierten Pipettenlösungen.

Ein weiteres Erkennungsmerkmal der Martinotti-Zellen ist ihre spezifische Morphologie, mit dem aufsteigenden Axon und dessen mannigfaltiger Verzweigung in der Schicht I (DeFelipe et al., 2013). Für die morphologische Darstellung der abgeleiteten Zellen enthielt die Ableitelektrode Biocytin. Der neuronale Tracer Biocytin wird aktiv von der Zelle in jedes ihrer Kompartimente transportiert und erlaubt posthoc eine Visualisierung der Zelle mittels ABC-DAB-Färbung. Alle abgeleiteten Zellen konnten anhand ihrer charakteristischen Morphologie als Martinotti-Zellen identifiziert werden. Neben dem meist ovalen Zellkörper war der typische axonale Verlauf in die Schicht I des somatosensorischen Kortex zu erkennen, der sich in dieser Schicht weit über die Heimkolumne hinaus streckte (Wang et al. 2004; Markram et al. 2004).

Die hier vorliegenden Ergebnisse stammen aufgrund der verwendeten spezifischen Mauslinie (GIN-Maus), der durchgeführten elektrophysiologischen Charakterisierung und aufgrund des Nachweises der typischen Morphologie eindeutig von abgeleiteten Martinotti-Zellen.

4.3 Charakterisierung von GABA-Rezeptoren auf der postsynaptischen Membran

GABA_B-Rezeptoren sind sowohl an präsynaptischen als auch an postsynaptischen Membranen diverser Zellen des zentralen Nervensystems beschrieben worden (Lin und Dun 1998, Schuler et al. 2001, Eder et al. 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf der postsynaptischen Membran von Martinotti-Zellen lediglich GABA_A-Rezeptoren exprimiert werden (Abb. 4.1). Zu Beginn der Charakterisierung fand ein Einwasch von Baclofen in die Extrazellulärlösung von akuten Schnitten statt. Die abgeleiteten Zellen wurden bei diesem Versuchsaufbau bei einem Potential von -55 mV gehalten. Der Einwasch von Baclofen mit Konzentrationen von 10 bis 30 µM führte weder zu einer sichtbaren Änderung der Halteströme noch einer Änderung des Eingangswiderstandes (Abb. 6.1). Diverse Studien konnten in verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems von Nagern (Kleinhirn: Morishita und Sastry 1995, Connelly et al. 2013; Thalamus: Connelly et al. 2013; Gyrus dentatus: Connelly et al. 2013, Tao et al. 2013;) GABA_B-vermittelte Ströme durch eine Badapplikation von 5-20 µM Baclofen registrieren. Derartige Versuchsanordnungen sind im somatosensorischen Kortex bisher nicht beschrieben worden. Bei lokaler Gabe von 10 µM bis 1 mM Baclofen mittels Druckapplikationen konnten ebenfalls keine GABA_B-vermittelte Ströme ausgelöst werden (Abb. 3.6 D). Weiterhin konnte keine Reduzierung der GABA-induzierten Ströme durch den GABA_B-Rezeptor-Antagonisten CGP beobachtet werden (Abb. 3.7 C+F). Im Hirnstamm konnte durch Lin und Dun (1998) an Zellen der ventrolateralen Medulla oblongata direkte Baclofen-induzierte Ströme mit Konzentrationen von 10 µM ausgelöst werden. Aufgrund der zu anderen Studien analogen experimentellen Bedingungen kann für Martinotti-Zellen angenommen werden, dass sie keine postsynaptischen GABA_B-Rezeptoren exprimieren.

Eine lokale Applikation von GABA und des GABA_A-Rezeptor-Agonisten Muscimol führte zu GABA- und Muscimol-induzierten Strömen in den abgeleiteten Zellen. Diese konnten mit dem GABA_A-Rezeptor-Antagonisten GABAzin nahezu vollständig geblockt werden (Abb. 3.7 A+B). Die minimalen Restantworten können damit begründet werden, dass bei kompetitiven Blockern nicht alle Rezeptoren gleichzeitig inaktiviert werden können und somit eine Restaktivität vorhanden bleibt. Dabei spielt die Sensitivität der Pharmaka zum Rezeptor ebenfalls eine Rolle. Bei Muscimol scheint diese im Vergleich zu GABA höher zu sein, so dass dort höhere Restströme bei der Blockade mit GABAzin gemessen werden konnten. Bei der lokalen Applikation von GABA und Muscimol zeigte Muscimol bei

gleicher Konzentration wie GABA eine längere Abfallszeit und eine länger Anstiegszeit bis zum Amplitudenmaximum (Abb. 3.5). Im Gegensatz dazu löste GABA im Vergleich zu Muscimol bei geringeren (10 μM) und sehr hohen (1 mM) Konzentration signifikant größere Ströme aus. Diese Beobachtung kann nicht auf unterschiedliche Applikationsbedingungen zurückgeführt werden, da beide Substanzen mittels standardisierter Prozedur stets an den gleichen Zellen appliziert worden sind. Vielmehr liegt der Effekt an unterschiedlichen Bindungsstellen und Ligandenablösungen für GABA und Muscimol am aktivierten Rezeptor (Jones et al. 1998; Baumann et al. 2003).

Ein weiteres Indiz für das Fehlen von GABA_B -Rezeptoren lässt sich dadurch untermauern, dass die ermittelten Umkehrpotentiale für GABA und Muscimol eng beieinander liegen (Abb. 3.8). Muscimol aktiviert GABA_A -Rezeptoren und erzeugt auf diese Weise eine erhöhte Membranleitfähigkeit für Chloridionen und zu einem geringen Teil für Bicarbonationen (Bormann et al. 1987, Olsen und Sieghart 2008; Connelly et al. 2013). Die errechneten Umkehrpotentiale von Muscimol und GABA liegen nahe dem Gleichgewichtspotential für Chlorid. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass die induzierten Ströme Chlorid getragen sind und somit die Vermutung nahe liegt, dass lediglich GABA_A -Rezeptoren postsynaptisch exprimiert werden.

Bei den durchgeführten Experimenten, in denen eine lokale Applikation stattfand, wurden die Pharmaka stets unter gleichen Bedingungen genutzt (siehe Abschnitt 2.5). Die Aufzeichnung der postsynaptischen Ströme erfolgte über eine Zeit von drei Sekunden und startete 100 ms vor Applikation des gewählten Pharmakons. Zwischen den ionotropen GABA_A - und metabotropen GABA_B -Rezeptoren bestehen aufgrund des andersgearteten Aufbaus Unterschiede in der Aktivierungskinetik. Dieser Unterschied konnte an Pyramidenzellen des Neokortex von Ratten mittels Photostimulation von *caged*-GABA verdeutlicht werden (Eder et al. 2001). Die von der Arbeitsgruppe ermittelten Zeiten bis zum Amplitudenmaximum betragen für GABA_A -Antworten 35 ± 2 ms und für GABA_B -Antworten 327 ± 11 ms. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten lokalen Applikationen lag die Zeit bei $69,4 \pm 36,7$ ms bei den GABA-induzierten Strömen (1 mM). Die zeitlichen Unterschiede lassen sich durch die unterschiedliche Freisetzung von GABA bei den angewandten Techniken begründen. Eine Aktivierung durch UV-Licht erfolgt unmittelbar, während GABA über die lokale Druckapplikation erst in den synaptischen Spalt zu den postsynaptischen GABA_A -Rezeptoren diffundieren muss. Die durch metabotrope GABA_B -Rezeptoren vermittelte Antwort benötigt fast die 10-Fache Zeit im Vergleich zu ionotropen GABA_A -getragenen Strömen, jedoch liegen die Zeiten klar im Aufzeichnungsfenster der Aufnahmen. Somit hätten auch die langsamen GABA_B -

indizierten Ströme registriert werden müssen, wenn metabotrope GABA-Rezeptoren exprimiert sind. Weiterhin kamen bei eigenen Untersuchungen Konzentration von Baclofen bis zu 10 mM zum Einsatz und es ist anzunehmen, dass durch die 1000-Fache Konzentration im Vergleich zu anderen Studien selbst kurze Applikationszeiten zu registrierbaren Strömen geführt hätten.

Die lokale Applikation der Pharmaka erfolgte stets in räumlicher Nähe zum Zellsoma der abgeleiteten Zellen. Potentiell wäre es denkbar, dass GABA_A-Rezeptoren ausschließlich perisomatisch exprimiert werden und GABA_B-Rezeptoren ausschließlich distal vorkommen. Eine Registrierung von Strömen durch Ionenkanäle in weiter distal gelegenen Dendritenabschnitten ist bei dem gewählten Versuchsaufbau nur eingeschränkt möglich. Denn vom Ableitort weit entfernte Potentialänderungen bzw. Ströme werden durch die passive Weiterleitung in Dendriten proportional zur Entfernung, dem Längswiderstand (R_l), umgekehrt proportional zum Radius (a) des Dendriten und dem Membranwiderstand (R_m) abgeschwächt. Dadurch könnten distal gelegene GABA_B-Rezeptoren zwar vorkommen, jedoch deren ausgelöste Ströme nicht am Soma detektiert worden sein. Allerdings konnten Eder und Mitarbeiter (2001) in ihrer Arbeit zeigen, dass GABA_A-Rezeptoren vermehrt distal und GABA_B-Rezeptoren überwiegend perisomatisch an LV Pyramidenzellen vorkommen. Weiterhin wiesen sie nach, dass GABA_A- und GABA_B-vermittelte Antworten an über 300 μm vom Soma entfernten Dendriten wahrnehmbar waren, sich aber mit steigender Entfernung vom Zellsoma abschwächten. Jedoch verhalten sich Pyramidenzellen und GABAerge Interneurone aufgrund ihres unterschiedlichen Dendritenaufbaus in der Weiterleitung dendritischer Ströme komplett anders. So konnten Pettit und Augustine (2000) nachweisen, dass IPSC in Interneuronen des Hippocampus in einer Entfernung von $>100 \mu\text{m}$ vom Soma nicht mehr registriert werden können, wohingegen dies in Pyramidenzellen am apikalen Dendriten bis über 200 μm möglich ist. Untersuchungen innerhalb unserer Arbeitsgruppe zeigten ebenso, dass mit Kaliumgluconat-gefüllten Pipetten GABA-induzierte Ströme in caged-GABA Photolyse Experimenten maximal 75 μm entfernt vom Soma der Martinotti-Zelle registriert werden können. In der hier vorliegenden Arbeit wurde testweise eine Mobilisation der Applikationspipette vorgenommen. Jedoch konnten auch in größerer Entfernung keine Baclofen-induzierten Ströme registriert werden. Es waren lediglich GABA-induzierte Ströme messbar, welche sich mit steigendem Abstand der Applikationspipette abschwächten (Abb. 6.2). Mittels der hier angewendeten Methoden kann letztlich nicht geschlossen werden, ob GABA_B-Rezeptoren an weiter distalen Dendriten der abgeleiteten Martinotti-Zellen vorkommen. Für den perisomatischen Bereich ($<100 \mu\text{m}$) deuten die

erhobenen Ergebnisse klar auf keine Expression von GABA_B-Rezeptoren hin. Eine Möglichkeit die „Nicht-Registrierbarkeit“ distaler Ströme zu umgehen und damit die Martinotti-Zellen auf distale GABA_B-Rezeptoren zu untersuchen, wären Ableitungen von dendritischen Abschnitten. Die Entfernung zu den induzierten Strömen verringerte sich auf diese Weise und dadurch den elektrotonischen Verlust über die Entfernung umgehen. Dieser Versuchsaufbau ist jedoch sehr aufwendig und konnte im eigenen Labor aus technischen Gründen nicht realisiert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass an den Martinotti-Zellen postsynaptische GABA_A-Rezeptoren exprimiert werden. Eine Aussage, ob es sich um synaptische und/oder extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren handelt, kann nicht klar formuliert werden, da dies aus dem elektrophysiologischen Aufbau der Experimente nicht eindeutig hervorgeht. Dies könnte mittels immunhistochemischer Nachweisverfahren näher beleuchtet werden und könnte ein Teil zukünftiger Studien sein. Aufgrund der registrierten Ströme durch die Stimulation inhibitorischer Eingängen zu den Martinotti-Zellen, sind synaptische GABA_A-Rezeptoren auf der postsynaptischen Membran nahe liegend.

4.4 GABA_B-Rezeptoren auf der präsynaptischen Membran

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf den inhibitorischen Eingängen der Martinotti-Zellen GABA_B-Rezeptoren exprimiert werden (Abb. 4.1). Bei den durchgeführten Experimenten konnte durch Einwasch von Baclofen eine Reduktion der Amplitude der eIPSC beobachtet werden. Nach Auswasch von Baclofen bzw. Blockierung von GABA_B-Rezeptoren mittels CGP stieg die Amplitude wieder an.

In dem hier verwendeten Versuchsaufbau für die elektrische Stimulation ist die Amplitude der eIPSC vornehmlich von der ausgeschütteten Transmittermenge abhängig, da sowohl der Stimulationsort als auch die Stimulationsstärke während der pharmakologischen Versuche nicht verändert wurden. Für die beobachteten Änderungen in der Amplitude können demnach ausschließlich physiologische, d.h. zelluläre Mechanismen verantwortlich sein. Kalziumionen sind für die Fusion von mit Transmitter gefüllten Vesikeln mit der präsynaptischen Membran unerlässlich. Ohne Einstrom von extrazellulärem Kalzium in die Präsynapse findet keine Transmitterausschüttung in den synaptischen Spalt statt. Demzufolge werden keine postsynaptischen Rezeptoren aktiviert, und es können keine Spannungsänderungen bzw. Ionenströme an der Postsynapse detektiert werden. Dieser Effekt war bei einer niedrigen Kalziumkonzentrationen (0,2 mM Ca²⁺) zu beobachten (Abb. 6.3).

Demzufolge lässt sich schlussfolgern, dass die Reduktion der Amplitude in den pharmakologischen Versuchen durch eine Verringerung des Kalziumeinstroms in der Präsynapse hervorgerufen wird. Es ist beschrieben, dass GABA_B-Rezeptoren bei Aktivierung über G_{βγ}-Untereinheit des G-Proteins an der Präsynapse Kalziumkanäle blockieren und auf diese Weise für eine Inhibition bzw. Disinhibition der EPSC bzw. IPSC auf der postsynaptischen Membran sorgen (Wu und Saggau 1995, Ulrich und Bettler 2007, Chalifoux und Carter 2011). Weiterhin kann die G_{βγ}-Untereinheit Kaliumkanäle aktivieren und auf diese Weise eine Art Kurzschluss auf der präsynaptischen Membran erreichen (Ulrich und Bettler 2007, Chalifoux und Carter 2011). Die Folge ist, dass weniger spannungsabhängige Kalziumkanäle an der Präsynapse aktiviert werden.

Präsynaptische GABA_B-Rezeptoren sind im Neokortex für exzitatorische und inhibitorische Zellen beschrieben worden (Porter und Nieves 2004, Sato et al. 2013, Urban-Ciecko et al. 2015). Im *Barrel*-Kortex von Mäusen konnten präsynaptische GABA_B-Rezeptoren an thalamokortikalen Endigungen sowohl auf exzitatorische Zellen der Schicht IV und Pyramidenzellen der Schicht II-III und auf inhibitorische Neuronen der Schicht IV und auf exzitatorischen Neuronen der Schicht II-III nachgewiesen werden (Porter und Nieves 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass auf den inhibitorischen Eingängen der Martinotti-Zellen präsynaptische GABA_B-Rezeptoren vorhanden sind. Um welche Art von GABAergen Interneuronen es sich dabei handelt, war durch den Versuchsaufbau nicht ersichtlich. In verschiedenen neokortikalen Regionen konnte bereits gezeigt werden, dass Martinotti-Zellen inhibitorische Eingänge von VIP-Zellen erhalten; *Barrel*-Kortex (Staiger et al. 2004, Lee et al. 2013), visueller Kortex (Pfeffer et al. 2013) und auditiver Kortex (Pi et al. 2013). Des Weiteren konnte in Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass neben den VIP-positiven (VIP⁺) auch PV-positive (PV⁺)-Interneurone auf Martinotti-Zellen projizieren (Dissertation Florian Walker, 2016). In dieser Arbeit wurde zudem mittels Paarableitung Projektionen von PV⁺-Interneuronen auf Martinotti-Zellen mit einer Kurzzeit-Depression registriert. Da es sich bei den eigenen Versuchen ebenfalls um Projektionen mit synaptischer Depression handelt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den stimulierten Fasern um die Axone von PV⁺-Zellen handelt. Im Hippocampus wurde an PV⁺-Zellen die Expression von GABA_B-Rezeptoren an Axonen bestätigt (Booker et al. 2013). PV⁺-Zellen sind wie Martinotti-Zellen GABAerge Interneurone, weisen jedoch ein charakteristisches schnell feuernes Aktionspotentialmuster auf. Es wäre vorstellbar, dass bei hohen einlaufenden Aktionspotentialfrequenzen in der Präsynapse und der damit resultierenden vermehrten

Ausschüttung von GABA, sich GABA im synaptischen Spalt ansammelt bzw. aus den synaptischen Spalt diffundiert (*GABA-spillover*) und auf diese Weise extrasynaptische oder präsynaptische metabotrope GABA_B-Rezeptoren aktiviert. Aufgrund der unterschiedlichen Aktivierungszeiten der beiden GABA-Rezeptoren würde zunächst der synaptische GABA_A-Rezeptor aktiviert werden und somit eine Signalübermittlung auf die postsynaptische Membran erfolgen. Eine Aktivierung des präsynaptischen GABA_B-Rezeptors erfolgt mit einer gewissen Latenz und würde auf diese Weise den Kalziumeinstrom verringern (Abb. 6.3). Dadurch wird eine Art „Autoinhibition“ der Terminalien der PV⁺-Zellen erreicht und eine übermäßige bzw. lang andauernde Inhibition der Martinotti-Zellen durch PV⁺-Zellen verhindert.

Zahlreiche Arbeiten konnten bereits in anderen Regionen des zentralen Nervensystems zeigen, dass GABA_B-Rezeptoren auf der präsynaptischen Membran exprimiert werden, welche autoinhibitorische Effekte hervorrufen (Hippocampus: Wu und Saggau 1995, Gerrow und Triller 2014, Jurado-Parras et al. 2016, Hypothalamus: Mouginot et al. 1998, Thalamus: Ulrich und Huguenard 1996, Somatosensorischer Kortex: Porter und Nieves 2004, Urban-Ciecko et al. 2015)

Jedoch ist eine klare Differenzierung der stimulierten inhibitorischen Fasern (PV⁺- und/oder VIP⁺-Fasern), trotz der depressiven Eigenschaften der eIPSC, bei diesem Versuchsaufbau nicht möglich. Eine gezielte Untersuchung, ob PV⁺- und/oder VIP⁺-Fasern präsynaptische GABA_B-Rezeptoren exprimieren, könnte mittels neuerer Techniken wie der Optogenetik angegangen werden. Dabei würde eine gezielte Aktivierung von VIP⁺- bzw. PV⁺-Zellen über die Expression von lichtsensitiven Kanälen (Channelrhodopsin2) erfolgen. Die an den Martinotti-Zellen evozierten IPSC könnten nun auf den Einfluss des GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen hin untersucht werden. Bei VIP⁺-Zellen wurde die präsynaptische GABA_B-Rezeptorexpression noch nicht beschrieben, wäre jedoch in gleicher Weise vorstellbar wie für die PV⁺-Zellen.

Einen weiteren Ursprung inhibitorischer Projektionen könnten die Somatostatin-positiven Zellen an sich darstellen. Allerdings zeigten Pfeffer und Mitarbeiter (2013) im visuellen Kortex, dass Somatostatin-exprimierende Interneurone untereinander nicht über chemische Synapsen verbunden sind. Eine Differenzierung in Martinotti-Zellen und Nicht-Martinotti-Zellen wurde dabei nicht vorgenommen. Somatostatin-positive Interneurone bzw. GFP-positive Zellen in der GIN-Maus sollen dagegen über elektrische Synapsen miteinander verbunden sein (Gibson et al. 1999, Amitai et al. 2002; Hestrin und Galarreta 2005). In wie weit nun Martinotti-Zellen von anderen Somatostatin-exprimierenden Zellen

im Bereich des *Barrel*-Kortex inhibiert werden, darüber kann nur spekuliert werden und muss durch zukünftige Studien untersucht werden.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls versucht, auf den exzitatorischen Eingängen der Martinotti-Zellen GABA_B-Rezeptoren nachzuweisen. Bei Stimulation exzitatorischer Projektionsfasern auf die gleiche Art und Weise war es nicht möglich, nur eine einzelne bzw. geringe Anzahl an Fasern zu stimulieren. Ein Grund für diesen Effekt könnte die enorme Dichte an konvergenten exzitatorischen Eingängen von umliegenden Pyramidenzellen sein, welche auf Martinotti-Zellen projizieren (Kapfer et al. 2007, Silberberg und Markram 2007). Diese Eingänge erschweren eine Stimulation von einzelnen bzw. wenigen Fasern durch eine bipolare Stimulationselektrode. Die bipolare Stimulationselektrode verfügt über einen Abstand von 110 µm zwischen den beiden Elektrodenpolen. Dieser Abstand kann durch eine doppelumige Thetaglas-Elektrode (BT-150-10, Products GmbH, Hofheim, Deutschland) reduziert werden. Trotz der unscharfen Trennung einer einzelnen Stimulation lässt sich jedoch vermuten, dass auch exzitatorische Fasern GABA_B-Rezeptoren exprimieren (Abb. 6.4). Für eindeutige Aussagen sind jedoch nähere Untersuchungen nötig, die mittels Aufnahmen der spontanen Vesikelfreisetzung an exzitatorischen Synapsen durchgeführt werden könnten. Dabei müsste einer durch GABA_B-Rezeptor vermittelten geringeren Amplitude der EPSC bei der Vesikelfreisetzung dieser exzitatorischen Synapsen nachgegangen werden. Im frontalen Kortex von Ratten konnten modulierende Effekte von Baclofen auf eEPSC nachgewiesen werden (Li et al. 2007), welche auf präsynaptische GABA_B-Rezeptoren zurückzuführen sind. Ebenso werden thalamische Projektionen auf GABAerge Interneurone im somatosensorischen Kortex durch präsynaptische GABA_B-Rezeptoren moduliert (Porter und Nieves 2004).

Zusammenfassend belegen die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen, dass inhibitorische Projektionen auf die Martinotti-Zellen eine Depression in der Kurzzeitplastizität aufweisen und GABA_B-Rezeptoren exprimieren. Aufgrund vorausgegangener Studien innerhalb der Arbeitsgruppe handelt es sich sehr wahrscheinlich um inhibitorische Axone von PV-exprimierenden Interneuronen. Durch die Aktivierung der präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren kommt es zu einer Reduktion der Amplitude und des Depressionseffektes der postsynaptischen eIPSC. Beides ist tendenziell auf eine verringerte Transmitter-ausschüttung infolge eines geringeren Ca²⁺-Einstroms zurückzuführen. Zukünftige Untersuchungen müssen der genauen Konstellation an den inhibitorischen Synapsen auf den Martinotti-Zellen weiter nachgehen.

4.5 Physiologische Relevanz und Ausblick

Die eigenen Untersuchungen zeigen einen weiteren Mechanismus, der bei der kortikalen Informationsverarbeitung eine wichtige Rolle spielen könnte. Durch präsynaptische GABA_B-Rezeptoren kann die inhibitorische Transmission an den Martinotti-Zellen in ihrer Intensität beeinflusst werden. Dadurch unterliegt der disinhibitorische Schaltkreis über die Martinotti-Zellen einer Modulation, deren Ursprung weitestgehend unklar ist. Bei inhibitorischen Eingängen wäre eine Selbsthemmung (Autoinhibition) zu diskutieren, welche aus physiologischen Gesichtspunkten eine Dauerhemmung der Zellen verhindert. Bei der Autoinhibition geht man davon aus, dass bei repetitiven Aktionspotentialen präsynaptischer Interneurone es an den inhibitorischen Synapsen an den Martinotti-Zellen zu einem *spillover* von GABA aus den synaptischen Spalt kommt. GABA könnte dann an die präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren an den Endigungen des schnell feuernenden Axons binden und darüber die Freisetzung von GABA verringern, was eine Reduktion der postsynaptischen Amplitude zur Folge hätte. Zur besseren Differenzierung, ob es sich um eine Autoinhibition handelt oder nicht, könnte der GABA_B-Rezeptor Antagonist CGP bei dem Versuchsaufbau der Stimulation inhibitorischer Fasern eingewaschen werden. CGP blockiert die präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren und bei repetitiver Stimulation würde man bei einer vorherrschenden Autoinhibition die nachgewiesene Kurzzeit-Depression der inhibitorischen Synapsen modulieren können. Die Amplituden der eIPSC in der repetitiven Stimulation sollten keiner signifikanten Reduktion unter CGP unterliegen. Sollte sich bei dieser Versuchsdurchführung weiterhin eine signifikante Verringerung zeigen, wäre eine Autoinhibition ausgeschlossen und andere Möglichkeiten müssen diskutiert werden.

Da GABA_B-Rezeptoren auch auf den präsynaptischen Endigungen von exzitatorischen Fasern vermutet werden, wäre vorstellbar, dass spezifische GABAerge Interneurone mit ihren Projektionen präsynaptische GABA_B-Rezeptoren an den Terminalen auf die MC aktivieren können. Diese Zellen besitzen demnach modulierende Effekte sowohl auf hemmende als auch auf erregende Fasern. Sato und Mitarbeiter (2013) konnten eine solche synaptische Konstellation bereits an Pyramidenzellen des somatosensorischen Kortex von Ratten zeigen. Paarableitungen von zwei benachbarten, direkt verschalteten Pyramidenzellen zeigten, dass durch eine Verschaltung zwischen projizierender Pyramidenzelle und einem Interneuron bei Dauererregung durch eine Art vorwärts gerichtete Hemmung (*feedforward inhibition*) verhindert wird. Dabei projiziert Pyramidenzelle A nicht nur auf eine benachbarte Pyramidenzelle B, sondern auch auf ein Interneuron. Die inhibitorische Zelle wiederum projiziert auf präsynaptische Endigungen von Pyramidenzelle A, speziell an den Präsynapsen, welche auf Pyramidenzelle B Verbindungen

aufweisen. Bei initialer Aktivierung werden zunächst Interneuron und Pyramidenzelle B aktiviert. Bei Dauererregung hemmt jedoch die inhibitorische Zelle die Projektionen auf Pyramidenzelle B. Da es sich bei den selbst untersuchten Projektionen um inhibitorische Eingänge handelt, würde auch ein zwischengeschaltetes Interneuron nicht erregt, sondern gehemmt, und eine GABA_B-Rezeptor Aktivierung würde ausbleiben. Demzufolge müsste man zumindest bei inhibitorischen Eingängen nach anderen Quellen für GABA suchen.

Eine vorstellbare Gruppe von Interneuronen wären Neurogliaforme-Zellen, eine bisher wenig erforschte Zellpopulation. Neurogliaforme-Zellen werden als volumenfreisetzende Zellen beschrieben (Tamás et al. 2003), d. h. sie geben GABA nicht in den synaptischen Spalt, sondern frei in den extrazellulär Raum ab. Dadurch können extrasynaptische GABA-Rezeptoren, sowohl GABA_A-Rezeptoren als auch GABA_B-Rezeptoren, aktiviert werden. So wurde beschrieben, dass Neurogliaforme-Zellen in allen kortikalen Schichten vorkommen (Jiang et al. 2015) und thalamische *feedforward*-Inhibition über PV-positive-Zellen an *spiny stellate cells* in Schicht IV (Cruikshank et al. 2007; Porter et al. 2001; Sun et al. 2006) über GABA_B-Rezeptoren modulieren (Chittajallu et al., 2013).

Weiterhin wird angenommen, dass sie für eine unspezifische Inhibition des lokalen kortikalen Netzwerkes verantwortlich sind, da sie mit 90 % der umliegenden Zellen, exzitatorischen wie inhibitorischen, verbunden sind (Jiang et al. 2015). Aufgrund einer deutlich langsameren Latenzzeit der durch sie ausgelösten postsynaptischen Ströme ist eine Aktivierung von extrasynaptischen GABA-Rezeptoren die nächstliegende Vermutung. Durch diese Arbeit wird der angenommene volumenfreisetzende Mechanismus für Neurogliaforme-Zellen zusätzlich bestätigt (Jiang et al. 2015). Da kaum zellspezifische Marker vorhanden sind, gestaltet sich die Untersuchung dieses speziellen Subtyps von GABAergen Interneuronen sehr schwierig. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob die Neurogliaformen Zellen eine Quelle des extrazellulären GABA darstellen, welche die synaptische Transmission an den Martinotti-Zellen beeinflussen.

Als postsynaptische GABA-Rezeptoren konnten für Martinotti-Zellen GABA_A-Rezeptoren nachgewiesen werden, welche für die schnelle synaptische Übertragung inhibitorischer Eingänge essentiell sind. Nach den hier durchgeführten Versuchen können dagegen perisomatische GABA_B-Rezeptoren ausgeschlossen werden. Die elektrophysiologische Untersuchung distal gelegener Dendritenabschnitte stößt aufgrund der Abschwächung der Ströme über die Entfernung an ihre Grenzen. Die erhobenen Befunde über die Lokalisation der ionotropen und metabotropen GABA-Rezeptoren stimmen mit der derzeitigen Meinung bei den Neurowissenschaftlern überein: GABA_A-Rezeptoren werden

zumeist auf der postsynaptischen Membran im synaptischen Spalt angetroffen (Fritschy und Panzanelli 2014). Wohingegen die extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren eine weitaus untergeordnetere Rolle in der Informationsverarbeitung einnehmen (Farrant und Nusser 2005). GABA_B-Rezeptoren andererseits sind oft im Zusammenhang mit extrasynaptischen und präsynaptischer Lokalisation anzutreffen (Kulik et al. 2003, Ulrich und Bettler 2007, Porter und Nieves 2004, Sato et al. 2013, Urban-Ciecko et al. 2015).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Martinotti-Zellen das Ziel inhibitorischer Endigungen von wahrscheinlich mehr als einen Subtyp GABAerger Interneurone darstellen. Diese inhibitorische Verbindung, wahrscheinlich durch PV-positive Interneurone, unterliegt einer starken depressiven Kurzzeitplastizität. Sowohl die einzelne synaptische Übertragung als auch die Kurzzeitplastizität ist über präsynaptische GABA_B-Rezeptoren modulierbar. Die Quelle des extrasynaptischen GABA muss dringend aufgedeckt werden, da auch die exzitatorischen Eingänge über selbigen Mechanismus zu verfügen scheinen. Andernfalls ist es nicht möglich, die Verschaltung auf die Martinotti-Zellen und deren Prozessierung zu verstehen sowie die Wirkung der Martinotti-Zellen auf nachgeschaltete Pyramidenzellen und die resultierende kolumnenassoziierten Verarbeitung von Sinnesinformationen zu beschreiben.

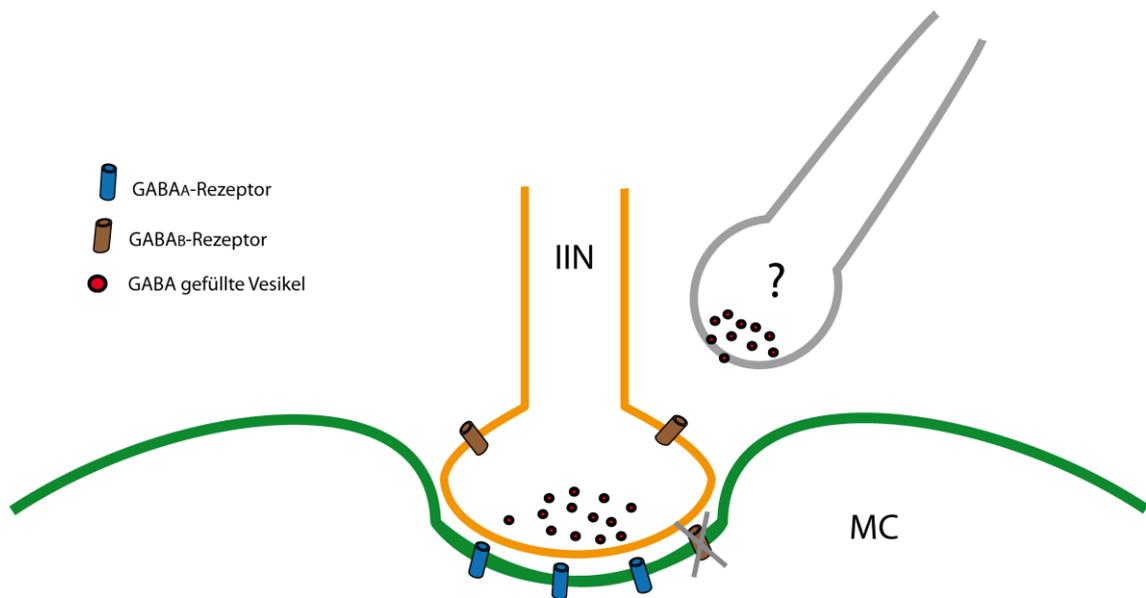


Abbildung 4.1: Schematische Modellvorstellung zur synaptischen Verschaltung von inhibitorischen Terminalen auf Martinotti-Zellen

Aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse kann vermutet werden, dass auf postsynaptischer Membran der MC, insbesondere im Synaptischen Spalt, lediglich $GABA_A$ -Rezeptoren exprimiert sind. Dagegen befinden sich auf der präsynaptischen Membran der inhibitorischen Fasern, welche auf MC projizieren, metapotrope $GABA_B$ -Rezeptoren. Diese werden durch eine GABA-Ausschüttung aktiviert und beeinflussen auf diese Weise die inhibitorische Transmission. Über den Ursprung von GABA für die Aktivierung der $GABA_B$ -Rezeptoren kann derzeit keine Aussage getroffen werden.

5 Zusammenfassung

Die Verarbeitung taktiler Information im somatosensorischen Kortex ist bis in die heutige Zeit nicht im Detail verstanden. Man geht jedoch davon aus, dass inhibitorische Interneurone dabei eine Schlüsselrolle spielen. Bei Fehlfunktion der GABAergen Neurone im Gehirn wurden verschiedene Krankheitsbilder wie Epilepsie (Cossart et al. 2001), Schizophrenie (Gonzalez-Burgos und Lewis 2008), Angststörungen (Freund und Katona, 2007) oder Autismus (Tabuchi et al. 2007) beschrieben. Aus diesem Grund rücken GABAerge Interneurone vermehrt in den Fokus der Wissenschaft. Martinotti-Zellen gehören zu dieser vielfältigen Gruppe der Interneurone und sind maßgeblich an Informationsverarbeitung im Kortex durch disynaptische Hemmung benachbarter Pyramidenzellen beteiligt (Silberberg und Markram 2007, Gentet et al. 2012, Kepecs und Fishell 2014). Dabei sind Martinotti-Zellen selbst das Ziel einer verhaltensabhängigen Inhibition (Gentet et al. 2012), die über VIP-positive Zellen vermittelt zu sein scheint (Pfeffer et al. 2013, Lee et al. 2013, Pi et al. 2013). Dieser als Disinhibition bezeichnete Mechanismus soll zur Verbesserung sensorischer Informationsverarbeitung sowie zu sensorisch-gelenktem Verhalten und Lernen beitragen (Letzkus et al. 2011, Fu et al. 2014). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von GABA-Rezeptoren auf der postsynaptischen Membran von Martinotti-Zellen in der Schicht II/III des somatosensorischen Kortex. Weiterhin wurden die inhibitorischen Eingänge der Martinotti-Zellen auf die Expression von GABA_B-Rezeptor untersucht. Die Versuche wurden an Hirnschnitten der GIN-Maus an GFP⁺-Zellen mittels Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Die Patch-Clamp-Technik stellt ein gut etabliertes elektrophysiologisches Messverfahren für die Untersuchung von zellulären Rezeptoren dar. Dabei wurden sowohl lokale Druckapplikationen als auch Badapplikation von spezifischen Agonisten und Antagonisten des ionotropen GABA_A-Rezeptors und des metabotropen GABA_B-Rezeptors genutzt, um Aussagen zur Expression dieser Rezeptoren auf den Martinotti-Zellen bzw. auf deren inhibitorischen Eingängen zu treffen.

Martinotti-Zellen der Schicht II/III des somatosensorischen Kortex besitzen postsynaptische ionotrope GABA_A-Rezeptoren, wohingegen GABA_B-Rezeptoren weitestgehend ausgeschlossen werden können. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die exprimierten GABA_A-Rezeptoren hauptsächlich für Chloridionen permeabel sind und konzentrationsabhängige (0,005-10 mM) Amplituden aufweisen. Es ist anzunehmen, dass

die postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren im synaptischen Spalt an den inhibitorischen Terminalen lokalisiert sind.

Mit der elektrischen Stimulation mittels bipolarer Elektrode konnten inhibitorische Fasern, welche auf die Martinotti-Zellen projizieren, gereizt werden. Die evozierten postsynaptischen Strömen (eIPSC) zeigten unter Aktivierung präsynaptischer metabotroper GABA_B-Rezeptoren eine Reduktion der Amplitude auf 37 %. Dieser Effekt wird durch eine verringerte Transmitterausschüttung der inhibitorischen Terminalen infolge eines reduzierten Kalzium-Einstroms in die Präsynapse hervorgerufen. Des Weiteren wiesen die eIPSC eine ausgesprochene depressive Kurzzeitplastizität auf, die durch Aktivierung präsynaptischer GABA_B-Rezeptoren, insbesondere bei hohen Frequenzen, weitestgehend eliminiert wurde. Inwieweit GABA_B-Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen bei der inhibitorischen Transmission auf die Martinotti-Zellen aktiviert werden, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass bei länger anhaltender präsynaptischer Aktivität GABA aus dem synaptischen Spalt diffundiert und die präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren aktiviert. Favorisiert wird dagegen die Möglichkeit, dass spezifische Interneurone (z.B. Neurogliaforme-Zellen) GABA über Volumentransmission in die Nähe GABA_B-Rezeptor-exprimierender Synapsen abgeben. Dadurch nehmen diese Zellen Einfluss auf die synaptische Transmission der Martinotti-Zellen und letztlich auf die Informationsverarbeitung im somatosensorischen Kortex.

6 Anhang

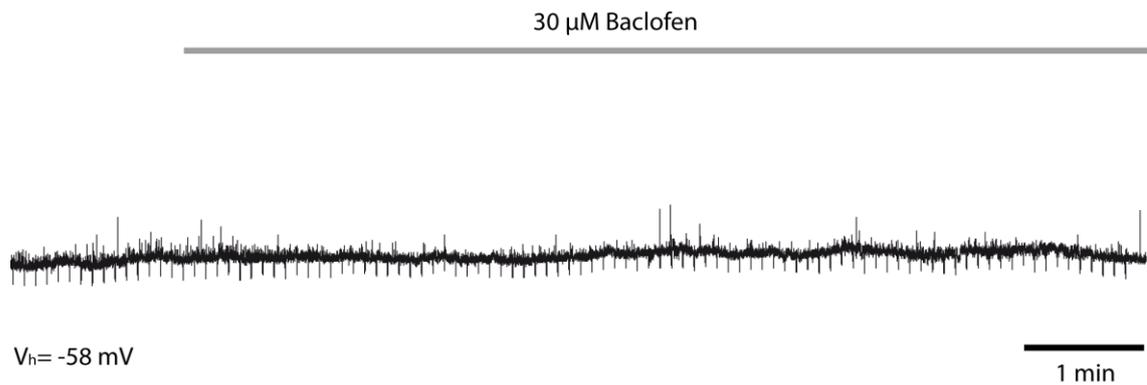


Abbildung 6.1 Badapplikation von Baclofen

Änderung des Ruhemembranpotentials durch eine Applikation von Baclofen (25 µM) in die Badlösung. Die Aufzeichnungen erfolgten in der *whole-cell*-Konfiguration bei dem zellspezifischen Ruhemembranpotential von -58 mV.

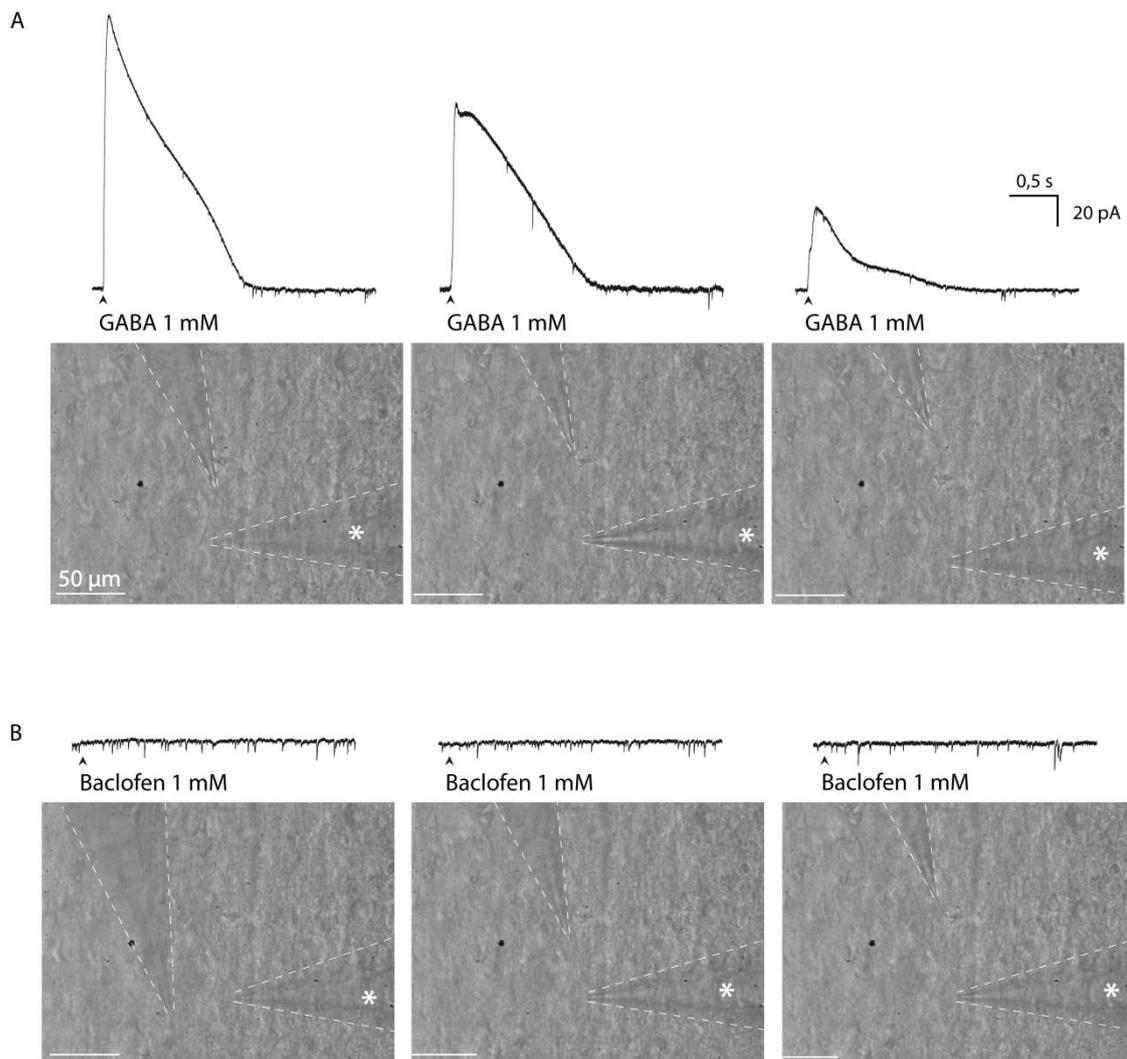


Abbildung 6.2 Lokale Druckapplikation von GABA und Baclofen in unterschiedlichen Distanzen zur abgeleiteten Zelle

Aufzeichnungen von postsynaptischen Strömen bei lokaler Druckapplikation (5 psi; 50 ms) von GABA (1 mM) und Baclofen (1 mM) in der *whole-cell*-Konfiguration bei einem Haltepotential von -5 mV. **(A)** Eine lokale Druckapplikation von GABA in unterschiedlichen Entfernungen (~25 μm, ~50 μm und ~75 μm) führt zu Distanz abhängigen Amplituden der GABA-induzierten auswärtsgerichteten Strömen. Die größte Amplitude, sowie Integral, konnte bei der 25 μm entfernten Applikationspipette registriert werden (links). Zur besseren Visualisierung der Entfernung sind die lichtmikroskopischen Bilder mit den dazugehörigen Lokalisation der Ableitelektrode (*) und der Position der Applikationspipette dargestellt. **(B)** Analoger Versuchsaufbau wie A, jedoch mit 1 mM Baclofen in der Applikationspipette. Durch eine Druckapplikation von Baclofen konnten in keiner Distanz zur abgeleiteten Zelle Baclofen-induzierte Ströme registriert werden. Unter den aufgezeichneten Spuren sind lichtmikroskopische Bilder mit den dazugehörigen Lokalisation der Ableitelektrode (*) und der Position der Applikationspipette abgebildet.

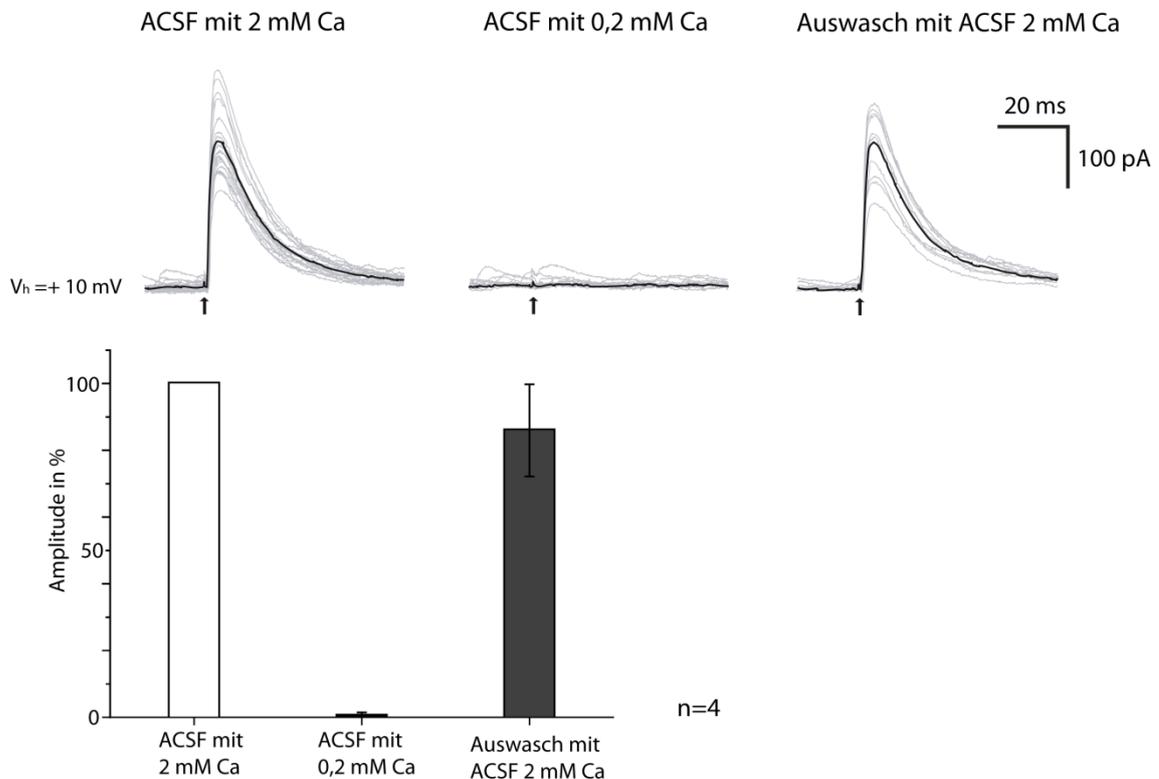


Abbildung 6.3 Abhängigkeit der elektrisch induzierten postsynaptischen Ströme von der extrazellulären Kalziumkonzentration

Evozierte postsynaptische inhibitorische Ströme (eIPSC) wurden durch lokale Feldstimulation ($7 \mu\text{A}$) an einer Martinotti-Zelle bei einem Haltepotential von +10 mV ausgelöst. Schwarze Spuren stellen die mittlere Antwort aus 10 Einzelstimulationen (graue Spuren) dar. Ein Austausch der normalen 2 mM Ca^{2+} -haltigen ACSF-Lösung durch eine 0,2 mM Ca^{2+} -haltige ACSF-Lösung führte zu einer um 99,5 % reduzierten Amplitude der eIPSC (Mitte) im Vergleich zur Referenzstimulation (links). Dieser Effekt war durch ein Einwaschen der ursprünglichen ACSF-Lösung nahezu vollständig (86 %) reversibel (rechts). Stimulationsbeginn ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet.

Tabelle 6.1 Statistische Analyse der einzelnen eIPSC bei repetitiver Mehrfachstimulation

In der Tabelle sind die p-Werte der statistischen Analyse der normalisierten Amplitude der eIPSC bei repetitiver Mehrfachstimulation (10 Stimuli) bei unterschiedlichen Frequenzen (1,8, 40 Hz) aufgeführt. Die gemittelten Amplituden der Stimuli 2-10 wurden im Verhältnis zur Amplitude des ersten Stimulus gesetzt und die Amplituden der einzelnen Stimuli untereinander verglichen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Student's t-Test) zwischen den Amplituden sind grau unterlegt. In allen Stimulationsfrequenzen waren die Amplituden des 3. (8 + 40 Hz) bzw. 4. (1 Hz) Stimulus bereits signifikant kleiner in Relation zum ersten Stimulus. Des Weiteren waren in der Plateauphase (6.-10. Stimulus) die Amplituden unabhängig von der Stimulationsfrequenz nicht signifikant unterschiedlich zueinander. Die p-Werte belegen den qualitativen Eindruck einer Depression in der Kurzzeitplastizität der eIPSC an Martinotti-Zellen.

1 Hz
eIPSC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	--	0,07036	0,11279	0,01551	0,00192	0,04168	0,02451	0,02459	0,07084	0,05777
2	0,07036	--	0,67199	0,61508	0,79432	0,00515	0,24767	0,23564	0,07351	0,57972
3	0,11279	0,67199	--	0,5408	0,62508	0,12566	0,4001	0,39574	0,2856	0,11136
4	0,01551	0,61508	0,5408	--	0,87291	0,15792	0,23217	0,224	0,58304	0,9741
5	0,00192	0,79432	0,62508	0,87291	--	0,26823	0,44055	0,47894	0,66055	0,92995
6	0,04168	0,00515	0,12566	0,15792	0,26823	--	0,23312	0,18555	0,02065	0,15469
7	0,02451	0,24767	0,4001	0,23217	0,44055	0,23312	--	0,4638	0,98404	0,64073
8	0,02459	0,23564	0,39574	0,224	0,47894	0,18555	0,4638	--	0,90683	0,6614
9	0,07084	0,07351	0,2856	0,58304	0,66055	0,02065	0,98404	0,90683	--	0,54135
10	0,05777	0,57972	0,11136	0,9741	0,92995	0,15469	0,64073	0,6614	0,54135	--

8 Hz
eIPSC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	--	0,06172	0,02185	0,00542	0,0008	0,00644	0,00131	0,00839	0,00314	0,00661
2	0,06172	--	0,15161	0,12895	0,10681	0,02871	0,06881	0,03255	0,06293	0,04986
3	0,02185	0,15161	--	0,21603	0,13559	0,01137	0,0681	0,06424	0,08545	0,08643
4	0,00542	0,12895	0,21603	--	0,43778	0,66332	0,53551	0,50602	0,08743	0,24876
5	0,0008	0,10681	0,13559	0,43778	--	0,91104	0,86316	0,86252	0,2806	0,64802
6	0,00644	0,02871	0,01137	0,66332	0,91104	--	0,94815	0,93901	0,62572	0,77594
7	0,00131	0,06881	0,0681	0,53551	0,86316	0,94815	--	0,90251	0,37471	0,68699
8	0,00839	0,03255	0,06424	0,50602	0,86252	0,93901	0,90251	--	0,51193	0,53541
9	0,00314	0,06293	0,08545	0,08743	0,2806	0,62572	0,37471	0,51193	--	0,57627
10	0,00661	0,04986	0,08643	0,24876	0,64802	0,77594	0,68699	0,53541	0,57627	--

40 Hz
eIPSC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	--	0,06712	0,01178	0,00244	0,03063	0,00447	0,00649	0,00456	0,00373	0,0015
2	0,06712	--	0,08334	0,09408	0,01434	0,05819	0,03462	0,04724	0,09712	0,05778
3	0,01178	0,08334	--	0,37374	0,81316	0,23064	0,01299	0,13512	0,1237	0,04535
4	0,00244	0,09408	0,37374	--	0,52484	0,20076	0,13886	0,10009	0,22821	0,03234
5	0,03063	0,01434	0,81316	0,52484	--	0,30866	0,1251	0,23869	0,28579	0,14877
6	0,00447	0,05819	0,23064	0,20076	0,30866	--	0,54912	0,61775	0,6393	0,17909
7	0,00649	0,03462	0,01299	0,13886	0,1251	0,54912	--	0,51842	0,8572	0,19684
8	0,00456	0,04724	0,13512	0,10009	0,23869	0,61775	0,51842	--	0,66698	0,15779
9	0,00373	0,09712	0,1237	0,22821	0,28579	0,6393	0,8572	0,66698	--	0,10121
10	0,0015	0,05778	0,04535	0,03234	0,14877	0,17909	0,19684	0,15779	0,10121	--

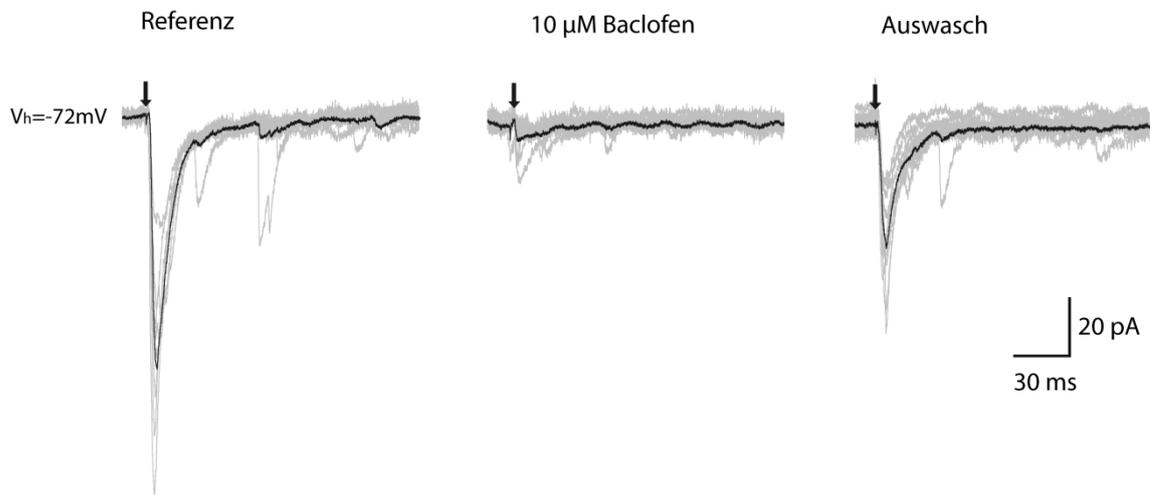


Abbildung 6.4 Pharmakologische Modulation von eEPSC mittels Baclofen

Postsynaptische exzitatorische Ströme (eIPSC) wurden durch lokale Feldstimulation (15 μ A) an einer Martinotti-Zelle bei einem Haltepotential von -72 mV ausgelöst. Schwarze Spuren stellen die mittlere Antwort aus 10 Einzelstimulationen (graue Spuren) dar. Ein Einwaschen von 10 μ M Baclofen führte zu einer reduzierten Amplitude der eEPSC (Mitte) im Vergleich zur Referenzstimulation (links). Dieser Effekt war durch den Auswasch von Baclofen rückläufig. Stimulationsbeginn ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet.

7 Literaturverzeichnis

Amitai Y, Gibson JR, Beierlein M, Patrick SL, Ho AM, Connors BW, Golomb D (2002). The spatial dimensions of electrically coupled networks of interneurons in the neocortex. *J Neurosci* 22, 4142–4152

Armstrong-James M, Fox K, Das-Gupta A (1992). Flow of excitation within rat barrel cortex on striking a single vibrissa. *J Neurophysiol* 68, 1345–1358

Bach B, Meudec E, Lepoutre J-P, Rossignol T, Blondin B, Dequin S, Camarasa C (2009). New insights into γ -aminobutyric acid catabolism: Evidence for γ -hydroxybutyric acid and polyhydroxybutyrate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 75, 4231–4239

Baumann SW, Baur R, Sigel E (2003). Individual properties of the two functional agonist sites in GABA(A) receptors. *J Neurosci* 23, 11158–11166

Booker SA, Gross A, Althof D, Shigemoto R, Bettler B, Frotscher M, Hearing M, Wickman K, Watanabe M, Kulik Á, Vida I (2013). Differential GABAB-Receptor-Mediated Effects in Perisomatic- and Dendrite-Targeting Parvalbumin Interneurons. *The Journal of Neuroscience* 33(18), 7961–7974

Bormann J (1988). Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci.* 11, 112–116

Bormann J (2000). The “ABC” of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21, 16–19

Bormann J, Feigenspan A (1995). GABAC receptors. *Trends Neurosci.* 18, 515–519

Bormann J, Hamill OP, Sakmann B (1987). Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* 385, 243–286

Bowery NG, Smart TG (2006). GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol* 147 (1), 109–119

Bowery NG, Hudson AL, Price GW (1987). GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 20, 365–383

- Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ (2002). International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* 54, 247–264
- Carvell GE, Simons DJ (1987). Thalamic and corticocortical connections of the second somatic sensory area of the mouse. *J Comp Neurol* 265, 409–427
- Carvell GE, Simons DJ (1990). Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci* 10, 2638–2648
- Chalifoux JR, Carter AG (2011). GABAB receptor modulation of synaptic function. *Current Opinion in Neurobiology* 21, 339–344
- Chebib M, Johnston, GA (1999). The “ABC” of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26, 937–940
- Chittajallu R, Pelkey KA, McBain CJ (2013). Neurogliaform cells dynamically regulate somatosensory integration via synapse-specific modulation. *Nat Neurosci* 16, 13–15
- Connelly WM, Errington AC, Di Giovanni G, Crunelli V (2013). Metabotropic regulation of extrasynaptic GABAA receptors. *Front Neural Circuits* 7, 171
- Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchán-Pérez A, De Felipe J, Ben-Ari Y, Esclapez M, Bernard C (2001). Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci* 4, 52–62
- Cruikshank SJ, Lewis TJ, Connors BW (2007). Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. *Nat Neurosci* 10, 462–468
- DeFelipe J, López-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larrañaga P, Anderson S, Burkhalter A, Cauli B, Fairén A, Feldmeyer D, et al. (2013). New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat Rev Neurosci* 14, 202–216
- Dutar P, Nicoll RA (1988). Pre- and postsynaptic GABAB receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron* 1, 585–591
- Eder M, Rammes G, Zieglgänsberger W, Dodt HU (2001). GABA(A) and GABA(B) receptors on neocortical neurons are differentially distributed. *Eur. J Neurosci* 13, 1065–1069
- Enna SJ, McCarson KE (2013). Characterization of GABA Receptors. *Curr Protoc Pharmacol* 63, 1.7.1–1.7.20

- Fabri M, Burton H (1991). Ipsilateral cortical connections of primary somatic sensory cortex in rats. *J Comp Neurol* 311, 405–424
- Farrant M, Nusser Z (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6, 215–229
- Feldmeyer D (2012). Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Front Neuroanat* 6, 24
- Fox K, Woolsey T: *Barrel Cortex*. 1. Auflage; Cambridge University Press, New York 2008
- Freund TF, Katona I (2007). Perisomatic inhibition. *Neuron* 56, 33–42
- Fritschy J-M, Panzanelli P (2014). GABAA receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system. *Eur J Neurosci* 39, 1845–1865
- Fu Y, Tucciarone JZ, Espinosa JS, Sheng N, Darcy DP, Nicoll RA, Huang ZJ, Stryker MP (2014a). A cortical circuit for gain control by behavioral state. *Cell* 156, 1139–1152
- Gentet LJ, Kremer Y, Taniguchi H, Huang ZJ, Staiger JF, Petersen CCH (2012). Unique functional properties of somatostatin-expressing GABAergic neurons in mouse barrel cortex. *Nat Neurosci* 15, 607–612
- Gerrow K, Triller A (2014). GABAA receptor subunit composition and competition at synapses are tuned by GABAB receptor activity. *Mol Cell Neurosci* 60, 97–107
- Gibson JR, Beierlein M, Connors BW (1999). Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* 402, 75–79
- Gonzalez-Burgos G, Lewis DA (2008). GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull* 34, 944–961
- Hestrin S, Galarreta M (2005). Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons. *Trends Neurosci* 28, 304–309
- Hille B: *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3. Auflage; Sinauer Associates, Sunderland 2001
- Iversen L (2006). Neurotransmitter transporters and their impact on the development of psychopharmacology. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, 82–88
- Jiang X, Shen S, Cadwell CR, Berens P, Sinz F, Ecker AS, Patel S, Tolias AS. (2015). Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex. *Science* 350(6264), aac9462

- Johnston GAR (1996). GABAA receptor pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics* 69(3), 173–198
- Jones MV, Sahara Y, Dzubay JA, Westbrook GL (1998). Defining affinity with the GABAA receptor. *J Neurosci* 18, 8590–8604
- Jurado-Parras MT, Delgado-García JM, Sánchez-Campusano R, Gassmann M, Bettler B, Gruart A (2016). Presynaptic GABAB Receptors Regulate Hippocampal Synapses during Associative Learning in Behaving Mice. *PLoS ONE* 11, e0148800
- Kapfer C, Glickfeld LL, Atallah BV, Scanziani M (2007). Supralinear increase of recurrent inhibition during sparse activity in the somatosensory cortex. *Nat Neurosci* 10, 743–753
- Kepecs A, Fishell G (2014). Interneuron cell types are fit to function. *Nature* 505, 318–326
- Kugler P: Nervensystem: Grundzüge der Organisation. In: Drenckhahn D (Hrsg.): Benninghoff/Drenckhahn Anatomie. Band 2. 16. Auflage; Elsevier Urban & Fischer, München 2004, 232-247
- Kulik A, Vida I, Luján R, Haas CA, López-Bendito G, Shigemoto R, Frotscher M (2003). Subcellular localization of metabotropic GABA(B) receptor subunits GABA(B1a/b) and GABA(B2) in the rat hippocampus. *J Neurosci* 23, 11026–11035
- Lanza M, Fassio A, Gemignani A, Bonanno G, Raiteri M (1993). CGP 52432: a novel potent and selective GABAB autoreceptor antagonist in rat cerebral cortex. *Eur J Pharmacol* 237, 191–195
- Lee S, Kruglikov I, Huang ZJ, Fishell G, Rudy B (2013). A disinhibitory circuit mediates motor integration in the somatosensory cortex. *Nat Neurosci* 16, 1662–1670
- Letzkus JJ, Wolff SBE, Meyer EMM, Tovote P, Courtin J, Herry C, Lüthi A (2011). A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. *Nature* 480, 331–335
- Li Q, Kuhn CM, Wilson WA, Lewis DV (2007). Effects of gamma hydroxybutyric acid on inhibition and excitation in rat neocortex. *Neuroscience* 150, 82–92
- Lin HH, Dun NJ (1998). Post- and presynaptic GABA(B) receptor activation in neonatal rat rostral ventrolateral medulla neurons in vitro. *Neuroscience* 86(1), 211–220.

- Ma Y, Hu H, Berrebi AS, Mathers PH, Agmon A (2006). Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice. *J Neurosci* 26, 5069–5082
- Macdonald RL, Olsen RW (1994). GABAA receptor channels. *Annu. Rev Neurosci* 17, 569–602
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5, 793–807
- Molleman A: Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology. John Wiley & Sons, New York 2002
- Morishita W, Sastry BR (1995). Pharmacological characterization of pre- and postsynaptic GABAB receptors in the deep nuclei of rat cerebellar slices. *Neuroscience* 68, 1127–1137
- Mouginot D, Kombian SB, Pittman QJ (1998). Activation of presynaptic GABAB receptors inhibits evoked IPSCs in rat magnocellular neurons in vitro. *J Neurophysiol* 79, 1508–1517
- Mountcastle VB, Davies PW, Berman AL (1957). Response properties of neurons of cat's somatic sensory cortex to peripheral stimuli. *J Neurophysiol* 20, 374–407
- Mulisch M, Welsch B (Hrsg.): Romeis - Mikroskopische Technik. 18. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010
- Numberger M und Draguhn A: Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1996
- Oliva AA, Jiang M, Lam T, Smith KL, Swann JW (2000). Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *J Neurosci* 20, 3354–3368
- Olsen RW, Sieghart W (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -Aminobutyric AcidA Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. *Update Pharmacol Rev* 60, 243–260
- Olsen RW, Sieghart W (2009). GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56, 141–148
- Olsen RW, Bureau MH, Endo S, Smith G (1991). The GABAA receptor family in the mammalian brain. *Neurochem Res* 16, 317–325

- Petersen CCH (2007). The functional organization of the barrel cortex. *Neuron* 56, 339–355
- Petersen CC, Sakmann B (2000). The excitatory neuronal network of rat layer 4 barrel cortex. *J Neurosci* 20, 7579–7586
- Pettit DL, Augustine GJ (2000). Distribution of functional glutamate and GABA receptors on hippocampal pyramidal cells and interneurons. *J Neurophysiol* 84, 28–38
- Pfeffer CK, Xue M, He M, Huang ZJ, Scanziani M (2013). Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons. *Nat Neurosci* 16, 1068–1076
- Pi H-J, Hangya B, Kvitsiani D, Sanders JI, Huang ZJ, Kepecs A (2013). Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature* 503, 521–524
- Porter JT, Nieves D (2004). Presynaptic GABAB receptors modulate thalamic excitation of inhibitory and excitatory neurons in the mouse barrel cortex. *J Neurophysiol* 92, 2762–2770
- Porter JT, Johnson CK, Agmon A (2001). Diverse types of interneurons generate thalamus-evoked feedforward inhibition in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* 21, 2699–2710
- Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 71, 45–61
- Sato H, Toyoda H, Saito M, Kobayashi M, Althof D, Kulik Á, Kang Y (2013). GABA(B) receptor-mediated presynaptic inhibition reverses inter-columnar covariability of synaptic actions by intracortical axons in the rat barrel cortex. *Eur J Neurosci* 37, 190–202
- Schuler V, Lüscher C, Blanchet C, Klix N, Sansig G, Klebs K, Schmutz M, Heid J, Gentry C, Urban L, et al. (2001). Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1). *Neuron* 31, 47–58
- Sieghart W (1995). Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev* 47, 181–234
- Sieghart W, Sperk G (2002). Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2, 795–816
- Silberberg G, Markram H (2007). Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron* 53, 735–746

- Simons DJ (1978). Response properties of vibrissa units in rat SI somatosensory neocortex. *J Neurophysiol* 41, 798–820
- Staiger JF, Zilles K, Freund TF (1996). Distribution of GABAergic elements postsynaptic to ventroposteromedial thalamic projections in layer IV of rat barrel cortex. *Eur J Neurosci* 8, 2273–2285
- Staiger JF, Flagmeyer I, Schubert D, Zilles K, Kötter R, Luhmann HJ (2004). Functional diversity of layer IV spiny neurons in rat somatosensory cortex: quantitative morphology of electrophysiologically characterized and biocytin labeled cells. *Cerebral Cortex* 14(6), 690–701
- Staiger JF, Möck M, Proenneke A, Witte M (2015). What types of neocortical GABAergic neurons do really exist? *E-Neuroforum* 6(2), 49–56
- Sun Q-Q, Huguenard JR, Prince DA (2006). Barrel cortex microcircuits: thalamocortical feedforward inhibition in spiny stellate cells is mediated by a small number of fast-spiking interneurons. *J Neurosci* 26, 1219–1230
- Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, Südhof TC (2007). A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science* 318, 71–76
- Tamás G, Lorincz A, Simon A, Szabadics J (2003). Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science* 299(5614), 1902–1905
- Tan KR, Rudolph U, Lüscher C (2011). Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. *Trends Neurosci* 34, 188–197
- Tao W, Higgs MH, Spain WJ, Ransom CB (2013). Postsynaptic GABAB receptors enhance extrasynaptic GABAA receptor function in dentate gyrus granule cells. *J Neurosci* 33, 3738–3743
- Ulrich D, Bettler B (2007). GABAB receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Current Opinion in Neurobiology* 17, 298–303
- Ulrich D, Huguenard JR (1996). GABAB receptor-mediated responses in GABAergic projection neurones of rat nucleus reticularis thalami in vitro. *J Physiol* 493 (3), 845–854
- Urban-Ciecko J, Fanselow EE, Barth AL (2015). Neocortical somatostatin neurons reversibly silence excitatory transmission via GABA_B receptors. *Curr Biol* 25, 722–731
- Verkhratsky A, Krishtal OA, Petersen OH (2006). From Galvani to patch clamp: the development of electrophysiology. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 453, 233–247

- Walker F (2016). Functional connectivity of layer II/III and V GABAergic Martinotti cells in the primary somatosensory (barrel) cortex of mice. Biol. Diss. Göttingen 2016
- Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, Luo J, Markram H (2004). Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol* 561, 65–90
- Welker C, Woolsey TA (1974). Structure of layer IV in the somatosensory neocortex of the rat: description and comparison with the mouse. *J Comp Neurol* 158, 437–453
- Williams JT, Colmers WF, Pan ZZ (1988). Voltage- and ligand-activated inwardly rectifying currents in dorsal raphe neurons in vitro. *J Neurosci* 8, 3499–3506
- Wineski LE (1985). Facial morphology and vibrissal movement in the golden hamster. *J Morphol* 183, 199–217
- Wong-Riley MT, Welt C (1980). Histochemical changes in cytochrome oxidase of cortical barrels after vibrissal removal in neonatal and adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 2333–2337
- Woolsey TA (1967). Somatosensory, auditory and visual cortical areas of the mouse. *Johns Hopkins Med J* 121, 91–112
- Woolsey TA, Van der Loos H (1970). The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* 17, 205–242
- Woolsey TA, Dierker ML, Wann DF (1975). Mouse SmI cortex: qualitative and quantitative classification of golgi-impregnated barrel neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 2165–2169
- Wu LG, Saggau P (1995). GABAB receptor-mediated presynaptic inhibition in guinea-pig hippocampus is caused by reduction of presynaptic Ca²⁺ influx. *J Physiol* 485 (3), 649–657
- Xu C, Zhang W, Rondard P, Pin J-P, Liu J (2014). Complex GABAB receptor complexes: how to generate multiple functionally distinct units from a single receptor. *Front Pharmacol* 5, 12
- Yang CR, Seamans JK, Gorelova N (1996). Electrophysiological and morphological properties of layers V-VI principal pyramidal cells in rat prefrontal cortex in vitro. *J Neurosci* 16, 1904–1921

Zhou Y, Danbolt NC (2013). GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front Endocrinol* 4, 165.

Danksagung

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. J. Staiger danken, der ermöglicht hat, dass ich meine Doktorarbeit im Institut für Neuroanatomie des Zentrums für Anatomie unter seiner Leitung durchführen konnte. Durch seine enorme Fachkompetenz und seine durchgehende Hilfsbereitschaft habe ich enorm profitiert.

Für die hervorragende Betreuung und die Einführung in die Wissenschaft gilt ein besonderer Dank Dr. Mirko Witte. Er hat es zu jedem Zeitpunkt geschafft, mich auch in schwierigen Situationen zu motivieren und die Ziele nicht aus den Augen zu verlieren. Ich danke ihm für seine grenzenlose Geduld mit mir, die allzeit kompetenten Vorschläge und das geduldige Korrekturlesen.

Herrn Dr. Martin Möck möchte ich für die tatkräftige Unterstützung und Einweisung in die Auswertung der Rohdaten durch die von ihm erstellten Auswertskripte danken. Diese erleichterten mir die Auswertung ungemein und machten die Verarbeitung der Daten in diesem Umfang überhaupt möglich.

Florian Walker danke ich für seine gut verständliche und geduldige Einarbeitung in die elektrophysiologischen Techniken und den sorgfältigen Umgang mit den Geräten.

Für die Anleitung und Erstellung der morphologischen Präparate danke ich Frau Patricia Sprysch.

Allen Mitgliedern der Abteilung möchte ich für die herzliche Aufnahme, die allzeit freundliche und Atmosphäre und Hilfsbereitschaft danken.