

Aus dem Institut für Neuroanatomie
(Prof. Dr. med. Staiger)
im Zentrum Anatomie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Elektrophysiologische
Charakterisierung von GABA-
Rezeptor-vermittelter Inhibition an
Martinotti-Zellen der Schicht 5 im
Barrel-Kortex**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

für Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Kristina Glöckner

aus

Bielefeld

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in Prof. Dr. med. J. Staiger

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. S. Hülsmann

Prüfungskommission

Referent/in Prof. Dr. med. J. Staiger

Ko-Referent/in: Prof. Dr. S. Hülsmann

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 10.12.2020.

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Elektrophysiologische Charakterisierung von GABA-Rezeptor-vermittelter Inhibition an Martinotti-Zellen der Schicht 5 im Barrel-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 Der primär somatosensorische Kortex (Barrel-Kortex)..... | 2 |
| 1.3 GABAerge Interneurone..... | 5 |
| 1.3.1 Martinotti-Zellen | 6 |
| 1.4 Inhibition im Neokortex | 8 |
| 1.5 Kurzzeitplastizität | 9 |
| 1.6 GABA-Rezeptoren | 10 |
| 1.6.1 GABA _A -Rezeptoren | 12 |
| 1.6.2 GABA _B -Rezeptoren | 13 |
| 1.7 Fragestellung und Hypothesen | 13 |
| 2 Material und Methoden | 15 |
| 2.1 Versuchstiere | 15 |
| 2.2 Präparation der Hirnschnitte | 15 |
| 2.3 Die <i>Patch-clamp</i> -Methode..... | 16 |
| 2.4 Elektrophysiologischer Versuchsaufbau | 18 |
| 2.5 Befüllung und Verwendung der Pipetten..... | 20 |
| 2.6 Histologie..... | 21 |
| 2.7 Elektrophysiologische Charakterisierung der Zellen..... | 23 |
| 2.8 Druckapplikation | 24 |
| 2.9 Elektrische Stimulation..... | 25 |
| 2.10 Bestimmung des Umkehrpotentials | 27 |
| 2.11 Datenanalyse..... | 29 |
| 2.12 Chemikalien und Pharmaka | 30 |
| 3 Ergebnisse | 34 |
| 3.1 Identifizierung von Martinotti-Zellen..... | 34 |
| 3.2 Charakterisierung postsynaptischer GABA-Rezeptoren auf Martinotti-Zellen | 38 |
| 3.3 Charakterisierung der GABA- und Muscimol-induzierten Ströme | 45 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.4 | Inhibitorische Afferenzen auf Martinotti-Zellen | 48 |
| 3.5 | GABA-vermittelte Modulation der Kurzzeitplastizität | 54 |
| 4 | Diskussion | 61 |
| 4.1 | Methodische Betrachtung | 62 |
| 4.2 | Identifizierung abgeleiteter Zellen..... | 66 |
| 4.3 | Vergleich der GABA-Rezeptor-vermittelten Inhibition an Martinotti-Zellen der Schicht 5 und Schicht 2/3 des Barrel-Kortex..... | 69 |
| 4.3.1 | Postsynaptische GABA-Rezeptoren auf Martinotti-Zellen..... | 69 |
| 4.3.2 | Charakterisierung der GABA- und Muscimol-induzierten Ströme..... | 72 |
| 4.3.3 | Inhibitorische Afferenzen auf Martinotti-Zellen..... | 74 |
| 4.3.4 | GABA-vermittelte Modulation der Kurzzeitplastizität | 76 |
| 4.4 | Physiologische Relevanz und Ausblick..... | 79 |
| 5 | Zusammenfassung | 82 |
| 6 | Anhang | 84 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 88 |
| | Danksagung | 96 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|---|----|
| Abbildung 1: | Barrel-Kortex im Nativpräparat | 4 |
| Abbildung 2: | Position der Stimulations- und Ableitelektrode in den Versuchen der Puff- Applikation und der elektrischen Stimulation | 25 |
| Abbildung 3: | Visuelle Identifizierung von Martinotti-Zellen | 35 |
| Abbildung 4: | Elektrophysiologische Charakterisierung einer abgeleiteten Martinotti-Zellen | 37 |
| Abbildung 5: | Konzentrationsabhängige Wirkung von GABA | 40 |
| Abbildung 6: | Lokale Druckapplikation von GABA, Muscimol und Baclofen | 42 |
| Abbildung 7: | Blockierung GABA-/Muscimol-induzierter Ströme | 44 |
| Abbildung 8: | Umkehrpotential von GABA- und Muscimol-induzierten Strömen | 47 |
| Abbildung 9: | Pharmakologische Modulation von eIPSC mittels GABAzin | 51 |
| Abbildung 10: | Pharmakologische Modulation von eIPSC mittels Baclofen | 53 |
| Abbildung 11: | Synaptische Kurzzeitplastizität von eIPSC bei repetitiver Stimulation | 57 |
| Abbildung 12: | Einfluss von CGP und Baclofen auf die Amplitude der eIPSC bei repetitiver Stimulation | 59 |
| Abbildung 13: | Einfluss von Baclofen und CGP auf die Kurzzeitplastizität | 60 |
| Abbildung A1: | Richtige Positionierung der bipolaren Stimulationselektrode bei der elektrischen Stimulation | 84 |
| Abbildung A2: | Abhängigkeit der elektrisch induzierten postsynaptischen Ströme von der extrazellulären Kalziumkonzentration | 85 |
| Abbildung A3: | Synaptische Kurzzeitplastizität von eIPSC bei Mehrfach-Stimulation unter Baclofen | 86 |
| Abbildung A4: | Synaptische Kurzzeitplastizität von eIPSC bei Mehrfach-Stimulation unter CGP | 87 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------|---|----|
| Tabelle 1: | Zusammensetzung Extrazellulärlösung und Präparationslösung | 30 |
| Tabelle 2: | Zusammensetzung Intrazellulärlösungen | 31 |
| Tabelle 3: | Experimentabhängige Zusätze | 32 |
| Tabelle 4: | Verwendete Pufferlösungen | 33 |
| Tabelle 5: | Aktive und passive elektrophysiologische Membraneigenschaften von Schicht 5 Martinotti-Zellen (n = 48) | 36 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| 5HT3a | Serotonin (5-Hydroxytryptamin)-3a-Rezeptor |
| ABC | Avidin-Biotin-Komplex |
| ACSF | künstliche Hirnflüssigkeit; <i>artificial cerebrospinal fluid</i> |
| AP | Aktionspotential |
| AMPA | Agonist ionotroper Glutamatrezeptor |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CCD-Kamera | charge-coupled-device-Kamera |
| CCK | Cholecystokinin |
| CGP35348 | 3-[[[(3,4Dichlorophenyl)methyl]amino]propyl]diethoxymethyl)-phosphinicacid |
| CsCl | Caesiumchlorid |
| DAB | 3,3`-Diamino-benzidin-tetrahydrochlorid |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| eIPSC | evoziertes inhibitorisches postsynaptischer Strom |
| EPSC | exzitatorischer postsynaptischer Strom |
| EPSP | exzitatorisches postsynaptisches Potential; excitatory postsynaptic potential |
| GABA | γ -Aminobuttersäure |
| GABAzin | 4-[6-imino-3-(4-methoxyphenyl)pyridazin-1-yl] butanoic acid hydrobromide 6-imino-3-4-methoxyphenyl-1-6Hpyridazinebutanoic acid hydrobromide |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| GIN | GFP-exprimierende inhibitorische Neurone |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| IPSC | inhibitorischer postsynaptischer Strom |
| IPSP | inhibitorisches postsynaptisches Potential; inhibitory postsynaptic potential |
| L | Schicht; <i>layer</i> |
| LJP | Flüssigkeitsgrenzschichtenpotential; <i>liquid junction potential</i> |
| MC | Martinotti-Zelle; <i>martinotti cell</i> |

| | |
|------|---|
| NBQX | 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzof- quinoxaline-7-sulfonamide disodium salt |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| PB | Phosphatpuffer |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PNS | peripheres Nervensystem |
| PV | Parvalbumin |
| STD | depressive Kurzzeitplastizität; <i>short term depression</i> |
| TB | TRIS Puffer |
| TBS | TRIS-gepufferte-Saline |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| VIP | vasoaktives intestinales Polypeptid |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

1 Einleitung

1.1 Das Nervensystem

Das Nervensystem ist die komplexeste organische Struktur von Wirbeltieren, welches die Abläufe des Körpers steuert und überwacht. Es dient der Wahrnehmung, Verarbeitung und Speicherung von externen Informationen und ermöglicht eine Interaktion zwischen dem Organismus und der Umwelt.

Morphologisch betrachtet kann das Nervensystem in das Zentrale Nervensystem (ZNS) und das Periphere Nervensystem (PNS) unterteilt werden. Das Periphere Nervensystem besteht aus zahlreichen Nervensträngen und Ganglien, welche als afferente und efferente Bahnen die Informationsübertragung zwischen Peripherie und ZNS gewährleisten. Sensible afferente Nervenbahnen leiten über Rezeptoren wahrgenommene Reize aus der Umwelt an das ZNS weiter, wo diese verarbeitet und z. B. durch motorische (efferente) Fasern als Befehle an die Muskeln weitergeleitet werden. Das ZNS ist eindeutig zu lokalisieren und setzt sich aus Gehirn und Rückenmark zusammen, welche strukturell und funktionell in Verbindung stehen. Es ist durch knöcherne Strukturen in Form des Schädelknochens und der Wirbelsäule geschützt und durch Hirn- und Rückenmarkshäute, auch als Meningen bezeichnet, umgeben. Als Dämpfung gegen die harten knöchernen Strukturen ist das ZNS im Liquor cerebrospinalis (Cerebrospinalflüssigkeit) gelagert.

Anatomisch betrachtet besteht das Gehirn aus sechs Abschnitten: Medulla oblongata (verlängertes Mark), Pons (Brücke), Mesencephalon (Mittelhirn), Diencephalon (Zwischenhirn), Cerebellum (Kleinhirn) und Telencephalon (Groß- oder Endhirn). Makroskopisch lässt sich das Gehirn in zwei strukturell voneinander zu unterscheidende Bereiche unterteilen. Es besteht zum einen aus der zentral gelegenen weißen Substanz (Substantia alba), welche vornehmlich Axone, auch als Neuriten bezeichnet, enthält. Die weiße Färbung ist auf die stützenden Gliazellen, welche z. B. die Axone umhüllen, zurückzuführen. Die äußere Substanz, welche die Großhirnrinde (Cortex cerebri) bildet, hat eine dunklere Färbung und wird als Substantia grisea (graue Substanz) bezeichnet und beinhaltet überwiegend Perikaryen (Nervenzellkörper) mit ihren dendritischen Fortsätzen. Der Cortex cerebri ist die äußere Schicht des Telencephalons und besteht aus dem Neocortex (junger Kortex), welcher auf Grund seines homogenen histologischen Aufbaus auch als Isocortex (gleichförmiger Kortex) bezeichnet wird, und dem Allocortex

(anderer Kortex). Der Allocortex wiederum setzt sich aus dem Paleocortex (älterer Kortex) und dem Archicortex (alter Kortex) zusammen.

Histologisch betrachtet besteht das Nervensystem aus Nervengewebe, welches von Nervenzellen (Neurone) und Gliazellen gebildet wird. Neurone bilden die Grundeinheit des Nervensystems und werden durch Gliazellen umgeben und gestützt, wobei eine neuronale Funktion nur im Zusammenspiel mit Gliazellen möglich ist (Trepel 2012).

1.2 Der primär somatosensorische Kortex (Barrel-Kortex)

Das Telencephalon ist beim erwachsenen Menschen größtenteils vom Neokortex umgeben, welcher phylogenetisch zum jüngsten Teil des Großhirns gehört. Er ist durchschnittlich 3-4 mm dick und weist eine besondere Struktur auf. Im vertikal zur Pia mater verlaufenden Hirnschnitt sind sechs horizontal verlaufende Schichten, auch als Laminae oder *layer* (L) bezeichnet, zu erkennen (von peripher nach zentral): (1) Molekularschicht, (2) Äußere Körnerschicht, (3) Äußere Pyramidenschicht, (4) Innere Körnerschicht, (5) Innere Pyramidenschicht, (6) Multifforme Schicht. Diese Schichtung ist auf eine unterschiedliche Verteilung von insbesondere exzitatorischen Zellen, aber auch Interneuronen zurückzuführen und den jeweiligen Schichten werden unterschiedliche Funktionen zugeschrieben. Schicht 4 und 6 des Neokortex sind darauf spezialisiert Informationen vom Thalamus aufzunehmen, Schicht 6 stellt Rückmeldungen an den Thalamus bereit (Staiger et al. 1996), Schicht 2 und 3 verbinden „assoziativ“ kortikale Areale, wohingegen die Schicht 5 vermehrt subkortikale Projektionen bildet und so als kortikale Hauptausgangsschicht angesehen wird (Wang et al. 2004).

Obwohl eine einheitliche sechsschichtige Struktur des Neokortex gegeben scheint, lässt sich dieser nach histologischen Gesichtspunkten in 52 Abschnitte gliedern, was erstmals im Jahre 1909 von Korbinian Brodmann vorgenommen wurde. Diese Bereiche sind jeweils funktionell bestimmten Aufgaben zugeordnet. Die Area 4 nach Brodmann wird zum Beispiel als primär motorischer Kortex bezeichnet und entspricht dem Gyrus precentralis. Der Barrel-Kortex (Fässchen) gehört zum primär somatosensorischen Kortex, in dem bei Säugetieren die Verarbeitung verschiedener Empfindungen, wie zum Beispiel Berührung, Druck, Temperatur oder auch Schmerzempfindung, lokalisiert sind. Der Name des Barrel-Kortex ist auf die säulenartigen Verdunklungen in der Schicht 4

zurückzuführen, welche optisch an Fässchen erinnern (Woolsey und Van der Loos 1970). Auch hierbei handelt es sich um Zellverdichtungen, welche durch zellärmere Regionen, die als Septen bezeichnet werden, unterbrochen werden (Abb. 1).

Wirbeltiere, insbesondere Nagetiere, sind in der Lage über ihre Sinushaare (Vibrissen) ihre unmittelbare Umgebung zu erkunden und deren Informationen zur Orientierung und zur Ausbildung komplexer Verhaltensweisen zu nutzen (Hutson und Masterton 1986). Die Vibrissen von Ratten und Mäusen unterscheiden neben der Größe und Form auch die Oberflächenbeschaffenheit des Objektes (Engel et al. 1997) und erreichen damit das Empfindlichkeitsniveau der Fingerspitzen von Primaten (Carvell und Simons 1990). Diese Sinnesleistung wird neben einem spezifischen Bau und Anordnung der Vibrissen durch eine anschließende komplexe aber hoch geordnete Verschaltung von der Peripherie bis zum somatosensorischen Kortex erreicht. Dabei kann bei der somatotopischen Projektion jeder Vibrisse eine funktionelle Kolumne innerhalb des somatosensorischen Kortex zugewiesen werden (Staiger et al. 2002). Die Organisation in kortikale Kolumnen zeigt sich besonders deutlich in Schicht 4, in der die spezielle Anordnung der Zellen zu einer fassartigen Struktur führt, die diesem Teil des somatosensorischen Kortex den Namen Barrel-Kortex eingebracht hat (Abb.1). Auf Grund der somatotopischen Organisation spricht man von der *Whisker-to-barrel*-Verschaltung (Dosenbach et al. 2007; Schubert et al. 2007). Die barrel-assoziierte Kolumne stellt eine basale Verarbeitungseinheit synaptischer Schaltkreise dar (Douglas und Martin 1991), die auf das Konzept der Kolumne als funktionellen Grundeinheit des Neokortex zurückgeht (Mountcastle 1957). Die kolumnaren Strukturen lassen sich durch die Zellaggregate in Schicht 4 im akuten Hirnschnitt (Abb.1) eindeutig identifizieren (Mountcastle 1957) und erlauben so die gezielte Untersuchung von neokortikalen Verschaltungsnetzwerken. Weiterhin hat sich dieser Teil des somatosensorischen Kortex als Modellsystem zur Untersuchung von Struktur, Funktion, Entwicklung und Plastizität von Neuronen und deren Synapsen etabliert. In unzähligen Studien ist die synaptische Verschaltung von exzitatorischen Neuronen, wie Pyramiden- und Sternzellen, innerhalb einzelner Schichten, innerhalb eines Barrels und über die Grenzen des Barrels hinweg Gegenstand der Untersuchungen (Staiger et al. 2000; Schubert et al. 2007; Lefort et al. 2009; Mao et al. 2011). Dabei gilt das vereinfachte Modell des kortikalen Informationskreislaufs, auch als lemniskaler Weg (Lemniscus = Schleife) bezeichnet, ausgehend von der Schicht 4 (thalamischer Eingang) über Schicht 2/3 zur Schicht 5 (neokortikaler Ausgang) als allgemein akzeptiert. Die Art

und Weise wie die Aktivität zwischen den Schichten koordiniert wird und in wieweit inhibitorische Feedbackschleifen daran beteiligt sind, ist nur ansatzweise verstanden.

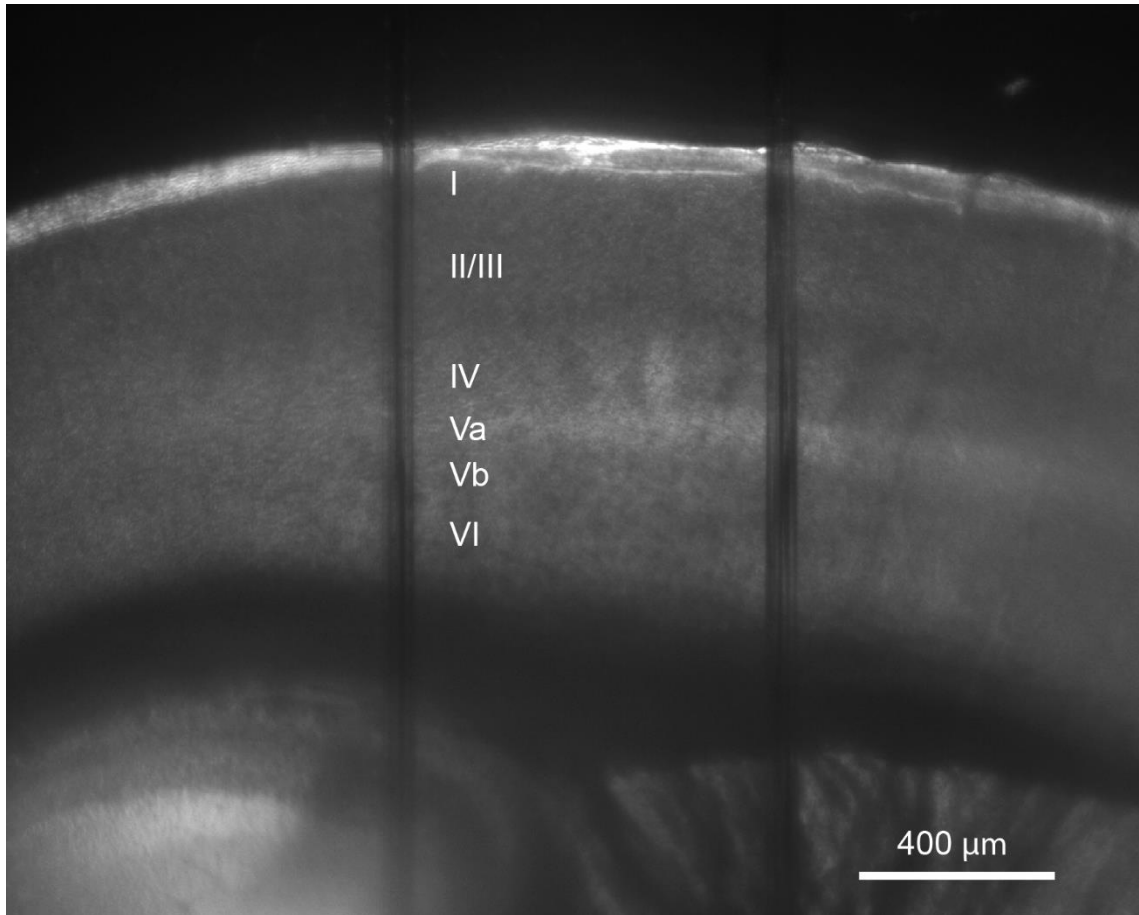


Abbildung 1: Barrel-Kortex im Nativpräparat

Lichtmikroskopische Aufnahme eines thalamokortikalen Hirnschnitts im Bereich des Barrel-Kortex, dargestellt unter 2,5-facher Vergrößerung. In der Schicht IV sind säulenartige Strukturen zu erkennen. Bei den zwei vertikal verlaufenden Strukturen handelt es sich um das Fixierungsgitter, welches den akuten Hirnschnitt in der Ableitung fixiert. Die Ziffern I-VI kennzeichnen den sechsschichtigen Aufbau des Barrel-Kortex.

1.3 GABAerge Interneurone

Im Neokortex gibt es eine Vielzahl an exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen, wobei die erregenden Zellen, auch Prinzipalneurone genannt, mit einem Anteil von 80-85 % überwiegen. Die bisher bekannten exzitatorischen Neuronen sind die Pyramidenzellen (*pyramidal cells*), Sternpyramidenzellen (*star pyramid cells*) und die bedornete Sternzellen (*spiny stellate cells*). Sie alle schütten Glutamat als exzitatorischen Neurotransmitter an ihre Terminalien aus. Die Population von inhibitorischen GABAergen Interneuronen ist mit 15-20 % deutlich kleiner, jedoch in ihrer Bedeutung für kortikale Schaltkreise nicht zu vernachlässigen (Staiger et al. 2015). Es gilt als gesichert, dass GABA-freisetzende Interneurone eine wichtige Rolle beim Gleichgewicht kortikaler Erregung spielen. Sie kontrollieren das zeitlichen Feuermusters von Pyramidenzellen und die dynamischen Änderungen in der Erregung. Darüber hinaus begünstigen sie die synchrone Aktivität und unterdrücken unkontrollierte Erregungen (McBain und Fisahn 2001; Pouille und Scanziani 2001; Markram et al. 2004; Trevelyan et al. 2006; Klausberger und Somogyi 2008). Veränderungen bzw. Abnormalitäten dieser Neurone werden im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern wie Epilepsie (Cossart et al. 2001), Angststörungen (Freund und Katona 2007), Autismus (Tabuchi et al. 2007) und Schizophrenie (Gonzalez-Burgos und Lewis 2008) gesehen. Während der letzten 20 Jahre zeigten Studien, dass GABAerge Interneurone hoch spezifische morphologische, elektrophysiologische und molekulare Eigenschaften aufweisen, anhand derer sie voneinander separiert werden können (Markram et al. 2004, Kawaguchi und Kubota 1997; Karagiannis et al. 2009). Anhand der Expression von neurochemischen Markern lassen sie sich in drei Subpopulationen einteilen. Die Zellen exprimieren entweder das Ca²⁺-bindende Protein Parvalbumin (PV), das Neuropeptid Somatostatin (SST) oder den ionotropen Serotoninrezeptor 3a (5HT3aR) (Rudy et al. 2011). Des Weiteren können die GABAergen Interneuronen ebenfalls aufgrund ihrer spezifischen axonalen Morphologie in sechs verschiedenen Grundtypen eingeteilt werden. Zu den SST-exprimierenden Zellen gehören die Martinotti-Zellen (*martinotti cells*, MC) sowie GABAerge Projektionsneuronen (*GABAergic projection neurons*). Die Gruppe der Parvalbumin-exprimierenden Zellen besteht aus den Korbzellen (*basket cells*) und Axo-axonischen (Chandelier) Zellen (*chandelier cells*). Zu den Zellen die den ionotropen Serotoninrezeptor 3a (5HT3aR) exprimieren gehören vorwiegend

bipolare/doppelgebüschelte Zellen (*bipolar-bitufted cells*), auch als VIP-Zellen bezeichnet, und Neurogliaforme Zellen (Staiger et al. 2015).

1.3.1 Martinotti-Zellen

Martinotti-Zellen wurden erstmals im Jahr 1889 von Carlo Martinotti entdeckt und im Jahr 1891 durch Ramon y Cajal nach ihm benannt (Wang et al. 2004). Sie sind in vielen Spezies nachgewiesen. Mit Ausnahme der Schicht 1 sind sie in allen kortikalen Schichten vorhanden, so dass sie ein wichtiger Bestandteil des kortikalen Schaltkreises sind und vermutlich eine Schlüsselrolle in der neuronalen Informationsverarbeitung übernehmen (Feldmeyer et al. 2018). Eine Störung dieses Zelltyps wird mit neurodegenerativen Krankheiten wie Epilepsie und Schizophrenie in Verbindung gebracht (Flint Beal et al. 1988; Glausier und Lewis 2011; Tai et al. 2014).

Sie bilden eine Untergruppe der GABAergen Neuronen und obwohl MC zu den SST-exprimierenden Zellen gehören, können sie jedoch abhängig von ihrer Lage in den verschiedenen Schichten weitere Biomarker wie Calretinin (CR), Cholecystokinin (CCK) und Neuropeptid Y (NPY) aufweisen (Wang et al. 2004).

Anhand ihrer morphologischen, molekularen und physiologischen Eigenschaften können sie zumeist eindeutig identifiziert werden (DeFelipe et al. 2013; Nigro et al. 2018). Zu den charakteristischen morphologischen Merkmalen zählen ihr ovaler oder spindelförmiger Zellkörper und ein aufsteigendes Axon, welches sich insbesondere in Schicht 1 des Barrel-Kortex verzweigt (Wang et al. 2004). Trotz dieser recht einheitlichen anatomischen Merkmale wurden zum Teil unterschiedliche elektrophysiologische Subtypen beschrieben (Halabisky et al. 2006; Ma et al. 2006; McGarry et al. 2010). In einer Studie über Schicht 5 SST-Interneurone wurden zwei unterschiedliche Typen an MC beschrieben, die sich sowohl morphologisch als auch in ihrem Feuerverhalten unterscheiden. Morphologisch konnten die Autoren zum einen *Fanning-out*-Martinotti-Zellen (aufgefächerte MC) mit einem weit aufgefächerten Axon in L2/3 und zum anderen *T-shaped*-Martinotti-Zellen (T-förmige MC), deren Axon sich hauptsächlich in L1 verzweigt, beobachten (Nigro et al. 2018). Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen der morphologischen und elektrophysiologischen Diversität der L5 SST-Interneurone gezeigt werden. Es wurde festgestellt, dass *T-shaped*-Martinotti-Zellen

vorrangig L1 Neurone innervieren und eine niedrige Feuerschwelle (*low-threshold spiking*) besitzen. Dagegen innervieren *Fanning-out*-Martinotti-Zellen überwiegend Zellen der Schicht 2/3 und besitzen ein adaptierendes Feuermuster (*adapting firing pattern*) (Nigro et al. 2018).

Dieses adaptierende Aktionspotentialladungsmuster bei stark depolarisierenden Strömen, und ihre hohe spontane Aktivität mit einer AP-Frequenz von 3-10 Hz (sog. Theta-Frequenz) (Fanselow et al. 2008), zählt zu den charakteristischsten elektrophysiologischen Eigenschaften von MC (Staiger et al. 2015). In seltenen Fällen konnte auch ein kurzzeitiges schnellfeuerndes (*bursting*) Feuermuster beobachtet werden (Kawaguchi und Kubota 1997; Silberberg und Markram 2007). MC haben einen relativ geringen Eingangswiderstand und eine niedrige Rheobase, weshalb sie auch als *low-threshold spiking cells* (Zellen mit niedriger Reizschwelle) bekannt sind (Kawaguchi 1995; Goldberg et al. 2004).

Eine Funktion der MC im Kortex ist die Modulation von Exzitation durch laterale Inhibition (Roux und Buzsáki 2015). Dabei erhalten MC von Pyramidenzellen aus Schicht 5 und Schicht 2/3 exzitatorische Eingänge und projizieren inhibitorisch auf deren benachbarte Pyramidenzellen, was ebenfalls als disynaptische Inhibition bezeichnet wird (Silberberg und Markram 2007). Ihre genaue Rolle in Bezug auf die Kontrolle der Pyramidenzellenaktivität ist jedoch weitestgehend unbekannt (Hilscher et al. 2017). Andere Studien konnten zeigen, dass MC selbst bei Vibrissenstimulation durch andere Interneurone inhibiert werden (Gentet et al. 2012). Diese inhibitorischen Afferenzen erhalten sie überwiegend von VIP-Zellen und PV-Zellen (Walker et al. 2016). In den vergangenen Jahren wiesen mehrere Studien Verbindungen zwischen VIP-Interneuronen und Somatostatin exprimierenden Martinotti-Zellen in verschiedenen neokortikalen Regionen nach (somatosensorischer Kortex: (Lee et al. 2013); visueller Kortex: (Pfeffer et al. 2013); auditiver Kortex: (Pi et al. 2013)). Dabei konnte für MC der Schicht 2/3 des primär somatosensorischen Kortex klar gezeigt werden, dass die Inhibition durch PV-Zellen schneller und stärker ist im Vergleich zur inhibitorischen Wirkung von VIP-Zellen (Walker 2016). In Paarableitungen sind die synaptisch ausgelösten IPSCs 4-mal so groß und mehr als doppelt so schnell. Diese Unterschiede in den Eigenschaften der zwei Verbindungen ermöglichen unter Umständen verschiedene disinhibitorische Wirkungen auf den nachgeschalteten Pyramidenzellen (nach der inhibierten MC) (Walker 2016). Generell wird vermutete, dass der Mechanismus der Disinhibition zur verbesserten Verarbeitung von sensorischen Informationen beiträgt (Pfeffer et al. 2013; Pi et al. 2013).

1.4 Inhibition im Neokortex

Inhibition ist an vielen Vorgängen im ZNS wie Lernprozessen oder der Verarbeitung von Sinnesinformationen maßgeblich beteiligt. Nach den Autoren Roux und Buzsáki (2015) kann Inhibition im Neokortex vereinfacht betrachtet als Abbruchmechanismus verstanden werden. Nichtsdestotrotz werden durch die vielfältigen Möglichkeiten der Inhibition die Aktivität von Prinzipalneuronen koordiniert. Je nachdem wann und wo eine Inhibition an den Neuronen auftritt, wirkt sie meist der Exzitation entgegen bzw. moduliert die exzitatorischen Eingänge, die gleichzeitig auf die Nervenzellen treffen, und bestimmt maßgeblich die Bildung sowie die zeitliche Abfolge der Aktionspotentiale von exzitatorischen (wie auch inhibitorischen) Zellen. Somit spielen für die kortikale Verarbeitung sensorischer Informationen die inhibitorischen Interneurone eine wichtige Rolle (Roux und Buzsáki 2015).

Im Neokortex können mehrere Formen der Inhibition unterschieden werden, welche maßgeblich durch unterschiedliche kortikale GABAerge Interneurone und deren Netzwerk vermittelt sind. Im Allgemeinen werden fünf verschiedene Motive der Inhibition beschrieben:

- 1) Bei der vorwärtsgerichteten Inhibition (*feed-forward inhibition*) wird ein Interneuron durch einen externen Reiz aktiviert, was zur Hemmung von Prinzipalneuronen führt.
- 2) Die rückwärtsgerichtete Inhibition (*feed-backward inhibition*) folgt einem ähnlichen Prinzip, jedoch ist die auslösende exzitatorische Zelle und die später gehemmte Zelle dieselbe Zelle.
- 3) Bei der lateralen Inhibition (*lateral inhibition*) erregt ein Prinzipalneuron ein Interneuron, welches die Aktivität eines benachbarten Prinzipalneurons unterdrückt. Im neuronalen Netzwerk ist die laterale Hemmung meist wechselseitig bedingt.
- 4) Die direkte Inhibition (*direct inhibition*) kann Prinzipalneurone und Interneurone betreffen. Durch Axone von Neuronen aus entfernten Gehirnregionen werden die Zellen lokal gehemmt.
- 5) Disinhibition (*disinhibition*) bedeutet, dass ein Interneuron von einem anderen Interneuron bei zeitgleichem Eintreffen der Information gehemmt wird. Der Effekt ist die Erregung eines nachgeschalteten Prinzipalneurons, da dessen Inhibition vermindert wird (Roux und Buzsáki 2015).

1.5 Kurzzeitplastizität

Im menschlichen Körper ist die Anzahl der Neuronen bereits vor der Geburt festgelegt, wohingegen Synapsen lebenslang auf- und abgebaut werden können. Ein Hauptteil der Synapsen bildet sich innerhalb der ersten Lebensjahre aus und jeder Lernprozess ist mit Neubildung oder einer funktionellen Veränderung von Synapsen verbunden (Trepel 2012). Synaptische Modifikation wurde erstmals in neuromuskulären Verknüpfungen entdeckt, wo eine Verstärkung von postsynaptischen Antworten während einer verlängerten Stimulation von präsynaptischen Neuronen beobachtet wurde. Später wurden zahlreiche verschiedenartige synaptische Dynamiken entdeckt, welche experimentell nachgewiesen werden konnten (Zucker und Regehr 2002). Die Fähigkeit des Gehirns sich in Abhängigkeit der zu verarbeitenden Informationen zu verändern wird als synaptische Plastizität bezeichnet.

Diese Veränderungen können einerseits durch Änderungen der Physiologie der Synapse verursacht werden, wobei hauptsächlich die synaptische Transmission beeinflusst wird. Andererseits können die Veränderungen struktureller Natur sein und die Neurogenese und Organisation der Axone, Dendriten und deren synaptische Verbindungen selbst betreffen.

Des Weiteren ist die synaptische Plastizität abhängig von der Zeitspanne, über welche die synaptische Veränderung stattfindet. Es sind Kurzzeit- (*short-term plasticity*) und Langzeitplastizität (*long-term plasticity*) bekannt. Die Langzeitplastizität ist ein Effekt, welcher mehrere Minuten bis ein Leben lang andauern kann, wohingegen die Kurzzeitplastizität lediglich eine Veränderung von wenigen Millisekunden bis Minuten bewirkt. Es handelt sich um eine Form der synaptischen Dynamik, welche diverse Rollen der Informationsverarbeitung durch neuronale Netzwerke einnimmt (Bao 2010). Dabei ist die Kurzzeitplastizität insbesondere aufgrund ihrer „rechnerischen Funktion“ bedeutend, welche eine Informationsverarbeitung innerhalb weniger Millisekunden ermöglicht und dabei dem ZNS erlaubt, mit einer ständig veränderten Umwelt zu interagieren (Abbott und Regehr 2004). Auf zellulärer bzw. physiologischer Ebene kommt die Kurzzeitplastizität überwiegend infolge einer repetitiven Aktivierung von Synapsen durch eine hohe Frequenz von Aktionspotentialen der präsynaptischen Zelle vor. Dabei zeigen einige Synapsen ansteigende postsynaptische Antworten, welche als

kurzzeitige synaptische Potenzierung (*short-term facilitation*, STF) bezeichnet werden und andere Synapsen zeigen eine postsynaptisch abnehmende Antwort, welche als kurzzeitige Depression (*short-term depression*, STD) bezeichnet wird. An der synaptischen Kurzzeitplastizität sind zwei Prozesse maßgeblich beteiligt: die präsynaptischen Ca^{2+} -Kanäle und die, mit Neurotransmitter gefüllten, präsynaptischen Vesikel. Die postsynaptischen Rezeptoren haben dagegen keinen Einfluss, da sie erst bei einer Langzeitplastizität modifiziert oder deren Anzahl erhöht oder erniedrigt werden kann. Bei der Kurzzeit-Potenzierung bewirkt die hohe Aktionspotentialfrequenz eine Akkumulation von Ca^{2+} -Ionen in der Präsynapse, welche eine erhöhte Freisetzungswahrscheinlichkeit der Vesikel zur Folge hat. Demzufolge wird mehr Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt und lösen an der Postsynapse größere Ströme aus. Bei der Kurzzeit-Depression kommt es zu einer Erschöpfung des Vesikelpools in der Präsynapse, so dass weniger Vesikel mit der präsynaptischen Membran fusionieren. Die Neurotransmitterkonzentration im synaptischen Spalt verringert sich und es werden kleine postsynaptische Ströme ausgelöst. Diese synaptischen Veränderungen sind kurzzeitige Effekte, die nach wenigen Millisekunden oder Sekunden auf ihr Basislevel zurückkehren. Mit der alleinigen Kenntnis über die postsynaptische Antwort kann somit ein Rückschluss auf die präsynaptischen Prozesse gezogen werden, wobei es schwierig ist die genauen Verhältnisse an der Präsynapse zu bestimmen. (Bao 2010).

1.6 GABA-Rezeptoren

Die Informationsübertragung im ZNS stellt ein Zusammenspiel zwischen elektrischer und chemischer Reizweiterleitung dar. An der chemischen Synapse erfolgt die Umwandlung von axonalen elektrischen zu chemischen Informationen. Über das präsynaptische Axon wird ein elektrischer Impuls, das Aktionspotential (AP), zur Endigung, dem Endknöpfchen, weitergeleitet. Sobald das AP die synaptische Endigung erreicht, kommt es zu einer Depolarisation mit nachfolgender Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle. Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen bewirkt die intrazelluläre Wanderung von mit Neurotransmittern gefüllten Vesikeln zu der präsynaptischen Membran, mit welcher sie verschmelzen. Im Folgenden wird der Inhalt

der Vesikel durch Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt. Nach Diffusion durch den synaptischen Spalt binden die Neurotransmitter auf der postsynaptischen Membran an spezifische Rezeptoren, was die Öffnung bestimmter Ionenkanäle bewirkt. Nun strömen Ionen entsprechend des Konzentrationsgradienten entweder in die postsynaptische Zelle hinein oder aus ihr heraus, was eine Änderung des Membranpotentials des postsynaptischen Neurons bewirkt und zu einer postsynaptischen Reaktion führen kann.

Im ZNS werden exzitatorische (erregende) Synapsen und inhibitorische (hemmende) Synapsen unterschieden. Exzitatorische Synapsen benutzen z. B. den Neurotransmitter Glutamat und rufen eine Depolarisation durch ein exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) hervor, welches auf dem Einstrom von positiv geladenen Natriumionen beruht. Inhibitorische Synapsen führen hingegen zu einem inhibitorischen postsynaptischen Potential (IPSP), welches eine Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran nach sich zieht. Ein IPSP wird entweder durch einen Einstrom von negativ geladenen Chlorid-Ionen oder durch einen Ausstrom von positiv geladenen Kalium-Ionen hervorgerufen. Zu den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmittern im Nervensystem der Säuger zählen GABA und Glycin (Sivilotti und Nistri 1991; Cherubini und Conti 2001).

Die postsynaptische Wirkung wird durch Rezeptoren auf der postsynaptischen Membran hervorgerufen. Biochemisch gesehen stellen Rezeptoren einen Proteinkomplex dar, an den spezifische Signalmoleküle in Form von Neurotransmittern binden und dadurch eine Signalweiterleitung innerhalb der Zelle hervorrufen können. An chemischen Synapsen können nach ihrem Wirkmechanismus ionotrope und metabotrope Rezeptoren unterschieden werden. Ionotrope Rezeptoren sind aus membranständigen Proteinuntereinheiten gebildete Ionenkanäle, die sich bei Aktivierung öffnen und zu einem Ionenfluss über der Zellmembran führen. In der Literatur werden zwei ionotrope GABA-Rezeptoren unterschieden: Der GABA_A- und der GABA_C-Rezeptor (Bormann 2000), wobei letzterer in neueren Studien nur eine Untergruppe der GABA_A-Rezeptoren darstellt (Olsen und Sieghart 2008; Chen et al. 2011; Enna und McCarson 2013). Dagegen aktivieren metabotrope GABA_B-Rezeptoren ein intrazellulär gelegenes G-Protein (bestehend aus drei Untereinheiten) was über sog. *second messenger* (sekundäre Botenstoffe) zur Modulation intrazellulärer Signalkaskaden führt. Es besteht die Möglichkeit sowohl metabotrope als auch ionotrope Rezeptoren durch denselben Neurotransmitter zu aktivieren, was demzufolge auf GABA zutrifft.

1.6.1 GABA_A-Rezeptoren

Die ionotropen GABA_A-Rezeptoren gehören zusammen mit dem glutamatergen AMPA- und dem nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor zur Familie schneller ligandengesteuerter Ionenkanäle (Smith und Olsen 1995). Sie binden den Neurotransmitter GABA (γ -Aminobuttersäure) und werden durch ihn aktiviert. Spezifischer Agonist für GABA_A-Rezeptoren ist Muscimol (Woodward et al. 1993), spezifische Antagonisten sind GABA_Azin (SR-95531) (Arnt und Krogsgaard-Larsen 1979; Rognan et al. 1992; Woodward et al. 1993), Isoguvacin in geringer Konzentration ($<50 \mu\text{M}$) und Bicucullin (Woodward et al. 1993; Bormann 1988; Kusama et al. 1993). Bei GABA_A-Rezeptoren handelt es sich um unselektive Ionenkanäle, deren Membranleitfähigkeit bei Aktivierung für folgende Anionen ansteigt: $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^- > \text{HCO}_3^-$ (Bormann et al. 1987a). Es wurde jedoch nachgewiesen, dass unter physiologischen Bedingungen die geöffneten Ionenkanäle primär für Chloridionen $[\text{Cl}^-]$ (ca. 80 %) und Bicarbonat bzw. Hydrogencarbonationen $[\text{HCO}_3^-]$ (ca. 20 %) permeabel sind (Witte 2009). Bei einem physiologischen Membranpotential (ca. -65 mV) kommt es zu einem einwärtsgerichteten Ionenstrom, der zumeist eine Hyperpolarisation der Zelle zur Folge hat oder räumlich naheliegende exzitatorische Eingänge inhibiert.

GABA_A-Rezeptoren zeigen einen gleichartigen Aufbau aus fünf Untereinheiten (UE), die wiederum vier transmembranäre Domänen besitzen. Derzeit sind acht verschiedene Arten an UE bekannt: α , β , γ , ρ , δ , ϵ , π und θ . Obwohl sämtliche GABA_A-Rezeptoren demselben Aufbau folgen, ergibt sich durch die 19 bekannten UE (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π und ρ 1-3) eine große Vielfalt an unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten im Aufbau der GABA_A-Rezeptoren (Johnston 1996), was verschiedenartige physiologische Eigenschaften zur Folge hat (Olsen und Sieghart 2008; Connelly et al. 2013). Trotz der großen Vielfalt an GABA_A-Rezeptoren ist bei einer Mehrheit von ihnen eine Zusammensetzung aus zwei α , zwei β und einer γ oder δ Untereinheit vorzufinden (Sieghart und Sperk 2002).

1.6.2 GABA_B-Rezeptoren

Metabotrope GABA_B-Rezeptoren besitzen zumeist eine heterodimere Struktur aus zwei Untereinheiten (GABA_{B1} und GABA_{B2}). Tetramere und oligomere Strukturen sind jedoch auch bekannt (Xu et al. 2014). Die Untereinheiten der GABA_B-Rezeptoren bestehen aus sieben transmembranären Domänen. Bindet GABA an die Bindestelle des Rezeptors, welche auf dem N-terminalen Abschnitt der GABA_{B1}-Untereinheit lokalisiert ist, kommt es zur Trennung des intrazellulär gelegenen G-Protein-Komplexes (Guanosintriphosphat-bindendes Protein oder GTP-bindendes Protein), bestehend aus drei Untereinheiten (α , β und γ), vom Rezeptor. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins löst sich von der α -Untereinheit, wodurch eine Adenylatcyclase aktiviert wird, welche ATP in cAMP umwandelt. Das cAMP ist ein *second messenger*, welcher Teil der Signaltransduktion ist und zur Aktivierung vieler Proteinkinasen führt. Außerdem aktiviert die $\beta\gamma$ -Untereinheit direkt K⁺-Kanäle und inaktiviert Ca²⁺-Kanäle (Olsen et al. 1991; Bowery et al. 2002; Xu et al. 2014).

Als spezifischer Agonist des GABA_B-Rezeptors gilt Baclofen (Bowery et al. 1980; Bowery 1993; Misgeld et al. 1995) und als ein selektiver Antagonist ist CGP35348 (*[3-[[3,4-Dichlorophenyl)methyl]amino]propyl](diethoxymethyl)-phosphinic acid*); (Bowery et al. 1980; Bowery 1993; Misgeld et al. 1995) beschrieben.

1.7 Fragestellung und Hypothesen

In der vorliegenden Arbeit soll die GABA-Rezeptor-vermittelte Inhibition an Martinotti-Zellen der Schicht 5 des somatosensorischen Kortex mittels elektrophysiologischer Methoden charakterisiert werden. Hierbei steht die Expression von GABA-Rezeptoren auf den präsynaptischen Terminalen an den MC sowie der postsynaptischen Membran der MC selbst im Fokus der Untersuchungen.

Martinotti-Zellen sind eine Untergruppe der GABAergen Neuronen und gehören zu den Somatostatin-exprimierenden Zellen. Aufgrund ihrer Schlüsselrolle in der kortikalen Informationsverarbeitung sind sie ein wichtiger Bestandteil der kortikalen Schaltkreise (Feldmeyer et al. 2018). MC inhibieren eine Vielzahl an Prinzipalneuronen und Interneuronen (Silberberg und Markram 2007) und erhalten inhibitorische Afferenzen

von PV-Zellen und VIP-Zellen (Walker 2016), wobei deren synaptische Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind. Eine Störung der Funktion der MC wird mit neurodegenerativen Krankheiten sowie Epilepsie und Schizophrenie in Verbindung gebracht (Glausier und Lewis 2011; Tai et al. 2014).

Im ersten Teil der Experimente werden Martinotti-Zellen im Hinblick auf die Expression von postsynaptischen ionotropen und metabotropen GABA-Rezeptoren untersucht. Zum Nachweis der Rezeptoren werden die Martinotti-Zellen mit der *Patch-clamp*-Methode abgeleitet und ihre Reaktion auf bestimmte applizierte Pharmaka aufgezeichnet. Mit Hilfe der lokalen Druckapplikation werden die Agonisten GABA, Muscimol und Baclofen appliziert, wohingegen die Antagonisten Gabazin und CGP35348 per Badperfusion eingewaschen werden. Im folgenden Teil der Arbeit wird der Frage nachgegangen, ob metabotrope GABA_B-Rezeptoren an den inhibitorischen Eingängen der Martinotti-Zellen vorhanden sind und welchen Einfluss sie auf die synaptische Kurzzeitplastizität haben. Hierfür werden präsynaptische inhibitorische Fasern mit einer bipolaren Stimulationselektrode gereizt und die postsynaptischen Membranströme mit der *Patch-clamp*-Methode unter Einzel- und repetitiver Stimulation gemessen. Während aller Experimente wurde die ACSF-Lösung mit NBQX (10 µM) versetzt, welcher ein kompetitiver AMPA-Antagonist ist und somit die exzitatorischen Eingänge auf den MC blockiert. Dies wird unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Baclofen durchgeführt, um herauszufinden, ob sich die GABAerge synaptische Transmission durch eine Aktivierung von präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren modulieren lässt. Durch die Untersuchung von GABA-Rezeptoren auf der prä- und postsynaptischen Seite von Schicht 5 Martinotti-Zellen soll diese Arbeit einen Beitrag zum Verständnis der komplexen Verschaltung von Interneuronen im primären somatosensorischen Kortex leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 46 Mäuse aus der Zucht der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen verwendet. Die Tiere wurden gemäß §4 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes gehalten. Es wurden Tiere unterschiedlichen Geschlechts im postnatalen Alter von 22 bis 41 Tagen (P22-P41) verwendet. In den Experimenten kamen überwiegend homozygote transgene Mäuse (40 Tiere) der Linie FVB-Tg(GadGFP)⁴⁵⁷⁰⁴Swn (GIN-Maus) zum Einsatz. Daneben wurden heterozygote GIN-Mäuse aus den Linien VIPflp/CRcre/GIN (4) und Linie VIPcre/Chr2-Tomato GIN (2) verwendet. Die Verwendung von GIN-Mäusen beruht auf der Tatsache, dass überwiegend Martinotti-Zellen der Schichten 2/3 und 5 durch GFP (*green fluorescent protein* = grün fluoreszierendes Protein) markiert sind (Walker et al. 2016). Im Folgenden werden die GFP-positiven Zellen (GFP-Zellen) der GIN-Maus auch als Martinotti-Zellen bezeichnet. Die GFP-Zellen können in akuten Hirnschnitten durch kurzweiliges, blaues Licht und ihre dadurch bedingte grüne Fluoreszenz optisch detektiert werden.

2.2 Präparation der Hirnschnitte

Das Versuchstier wurde durch Inhalation von Isoflurandampf (2-Chlor-2-difluormethoxy-1,1,1-trifluorethan, Abbr. Deutschland GmbH & Co.KG) betäubt und mittels Dekapitation getötet. Zur Freilegung der Schädelkalotte wurde mit einer feinen Schere ein sagittaler Hautschnitt von dorsal in rostraler Richtung bis zur Höhe der Orbitae durchgeführt. Nach Mobilisation der Cutis wurde in derselben Richtung der Schädelknochen entlang der Sutura sagittalis geöffnet und nach lateral mit Hilfe einer stumpfen Pinzette weggeklappt. Das von kranial freiliegende Hirn wurde nach Durchtrennung der Hirnnerven ausgehend vom Bulbus olfactorius unter Zuhilfenahme einer spitzen Schere aus der Schädelbasis gelöst und umgehend in gekühlte Präparierlösung gegeben. Nach zweiminütiger Verweildauer in der gekühlten Präparationslösung wurde das Gehirn der Präparationslösung entnommen und auf einen

eisgekühlten Deckel einer Petrischale überführt. Die beiden Hemisphären wurden mit einer Rasierklinge (Astra, Superior Platinum Rasierklingen) voneinander getrennt. Im Folgenden wurden die Hemisphären jeweils mit Sekundenkleber (UHU, Sekundenkleber blitzschnell Pipette flüssig, 3 g) entlang der Schnittfläche auf einem Objektträger fixiert und das Cerebellum vom Cerebrum mit Hilfe einer speziellen Schneidevorrichtung im Winkel von 55° entfernt. Mit einer spitzen Pinzette wurden die Hemisphären von dem Objektträger gelöst und erneut in gekühlte Präparationslösung gegeben. Die Hemisphären wurden an der neu entstandenen Schnittfläche mit Sekundenkleber auf der Probenplatte des Vibratoms fixiert und in die Vibratomschale mit gekühlter Präparierlösung überführt. Die Herstellung thalamokortikaler Hirnschnitte (300 µm) erfolgte mit dem Vibratom (Leica VT1200S, Leica Microsystem, Wetzlar, Deutschland). Pro Hemisphäre konnten sechs Schnitte für die elektrophysiologischen Messungen verwendet werden. Die Schnitte wurden schonend mit einer großlumigen Glaspipette in ein auf 32°C gehaltenes *artificial cerebrospinal fluid* (künstliche Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit) gegeben. Der gesamte beschriebene Präparationsvorgang dauerte weniger als 30 min, um eine hohe Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen zu gewährleisten. Nach 0,5-1 Stunden Inkubation in der künstlichen Cerebrospinalflüssigkeit wurden die Schnitte für maximal sechs Stunden auf Raumtemperatur belassen. Die verwendete Präparationslösung und die künstliche Cerebrospinalflüssigkeit wurden permanent mit 5 % CO₂ und 95 % O₂ (Carbogen) begast.

2.3 Die *Patch-clamp*-Methode

Die *Patch-clamp*-Methode (*patch* = Flicker, *to clamp* = befestigen) ist eine elektrophysiologische Messmethode und wurde im Jahr 1976 von Bert Sakmann und Erwin Neher entwickelt. Mit ihr lassen sich Ströme über einzelne Ionenkanäle in der Membran einer Zelle detektieren und messen.

Der Begriff *patch* beschreibt hierbei einen isolierten Ausschnitt der Zellmembran, welcher von der Messpipette umschlossen wird und *clamp* besagt, dass die jeweilige Zelle während des Messvorgangs auf einem festgelegten elektrischen Potenzial gehalten wird.

Durch die herkömmlichen Messmethoden war das Messen einzelner Ionenkanalströme nicht möglich. Es entstand ein Hintergrundrauschen, welches auf die Menge der gemessenen Kanäle zurückgeführt wurde. Um Einzelkanalströme zu messen, wird bei der *Patch-clamp*-Methode ein kleiner Fleck der Zelloberfläche isoliert betrachtet. Hierfür wird eine feine, mit Elektrolytlösung gefüllte Messelektrode aus Glas auf die Membran aufgesetzt, um die überstülpten Ionenkanäle von der Umgebung zu isolieren. Voraussetzung für diese Form der Messung ist eine gute Abdichtung zwischen Pipette und Membranoberfläche. Durch Ablassen des zuvor erzeugten Überdrucks in der Pipette und sofortigem Erzeugen eines Unterdrucks entsteht ein Abdichtwiderstand, der größer als 1 G Ω sein soll. Aus diesem Grund spricht man von einem Gigaseal. Der nun entstandene Zustand wird als *Cell-attached*-Konfiguration (der Zelle angelagert) bezeichnet. Durch einen kurzen Saugimpuls bricht die Zellmembran unter der Spitze der Glaspipette auf, wodurch ein direkter Zugang zum Cytoplasma entsteht. Diese Ableitung wird als *Whole-cell*-Modus bezeichnet und ermöglicht die Messung der Ströme über der gesamten Zellmembran. Es entsteht eine Verbindung zwischen Zytoplasma und Pipettenlösung, welche sich innerhalb weniger Minuten vermischen. So lässt sich die Ionenzusammensetzung der Intrazellulärlösung kontrollieren oder eine gezielte Blockade von Ionenkanälen ist möglich. Sämtliche Messungen dieser Arbeit wurden in der *Whole-cell*-Konfiguration durchgeführt, um das Membranpotential und die Membranleitfähigkeiten der Zelle zu messen.

Im *Voltage-clamp*-Modus, auch Spannungsklemme genannt, wird das Membranpotential der Zelle auf einem bestimmten Wert gehalten. Während einer Messung induzieren auftretende Ionenströme über der Zellmembran Spannungsänderungen, welche durch eingespeiste Ströme des Verstärkers kompensiert werden. Die Amplitude der kompensatorischen Ströme entspricht demzufolge dem Ionenstrom über der Zellmembran, welche die Membranleitfähigkeit beschreiben. Im *Current-clamp*-Modus (Stromklemme) werden Potentialänderungen über der Membran gemessen. Es können gezielt Stromimpulse in unterschiedlichen Stromstärken appliziert werden, was zu einer Änderung des Membranpotentials führt. Durch Überschreitung der Reizschwelle der jeweiligen Zelle werden Aktionspotentiale ausgelöst. Im *Current-clamp*-Modus kann bei keiner Stromapplikation das spezifische Ruhemembranpotential der Zelle registriert werden. Der *Current-clamp*-Modus findet insbesondere bei der elektrophysiologischen

Charakterisierung von Nervenzellen Anwendung, die eine Differenzierung zwischen Nervenzelltypen ermöglicht.

In dieser Arbeit wurden sowohl Experimente im *Voltage-clamp*-Modus als auch im *Current-clamp*-Modus durchgeführt.

2.4 Elektrophysiologischer Versuchsaufbau

Der Messplatz für die Experimente mit der *Patch-clamp*-Technik war wie folgt aufgebaut: Mikroskop (Axio Examiner, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland), Mikromanipulatoren (Mini-25-XL, Luigs & Neumann Feinmechanik-Elektrodenteknik GmbH, Ratingen, Deutschland) und Elektrodenhalter mit Vorverstärker (PPH-1P-BNC, NPI Electronic GmbH, Tamm, Deutschland) befanden sich auf einem durch Druckluft schwingungsgedämpften Tisch (IsoSation™ Vibration Isolated Workstation, Newport Corporation, CA) und waren von einem Faradayschen Käfig (Heka Elektronik Dr. Schulz GmbH, Lambrecht, Deutschland) zur elektrischen Abschirmung zu vier Seiten hin umgeben. Außerhalb des Faradayschen Käfigs befanden sich Rollpumpe (Peristaltic Pump– Miniplus 3, Gilson International BV, DE), *Patch-clamp*-Verstärker (SEC-05X-BF, MPI Electronic GmbH, Tamm, Deutschland), der Computer und die Monitore für die CCD-Kamera (Infinity3S-1UR, Lumenera, Ottawa, Kanada), das Druckapplikationssystem, die Stimulationseinheit (model DS3, Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, England) und die Steuereinheiten für die Mikromanipulatoren und Messkammer (SM7 und Typ V, Luigs & Neumann Feinmechanik-Elektrodenteknik GmbH, Ratingen, Deutschland) sowie für das Mikroskop.

Die Hirnschnitte wurden zur Betrachtung unter dem Mikroskop unter visueller Kontrolle in der Messkammer platziert. Die Messkammer bestand aus einem mit Teflon beschichteten Ring, den Boden bildete ein dünnes Deckglas und sie war mit 32 °C warmer, carbogengesättigter ACSF-Lösung befüllt. Da der ständige Austausch der ACSF-Lösung in der Messkammer sehr wichtig war, um die Nährstoffversorgung der Zellen des Hirnschnittes aufrecht zu erhalten, wurde dieser durch eine Rollpumpe mit einer Pumpleistung von 2-3 ml/min gewährleistet. Um den Hirnschnitt in gewünschter Position zu fixieren, wurde er mit einem Gitter aus Nylonfäden, auch als *grid* (Gitter)

bezeichnet, beschwert. Hierbei wurde darauf geachtet, die Nylonfäden des Gitters in der selben Richtung wie die Barrels des Barrel-Kortex auszurichten. Nach erfolgreicher Überführung des Hirnschnittes wurde er in einer 2,5fachen Vergrößerung (2,5fach Objektiv, EC Plan-NEOFLUAR, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) betrachtet und es wurden letzte Korrekturen der Ausrichtung vorgenommen. Die Aufnahme des Bildes erfolgte durch die CCD-Kamera und wurde auf einen Monitor projiziert. Nach Auswahl des genau zu betrachtenden Abschnittes des Hirnschnittes wurden die zu untersuchenden Zellen unter 40facher Vergrößerung mit einem Wasserimmersionsobjektiv (40fach, LUMPlanFLN, Olympus Corporation) unter Infrarotlicht ausgewählt. Zur Identifikation der GFP-Zellen wurde der Schnitt von einer Fluoreszenzlampe (HXP 120V, Carl Zeiss Micro-Imaging GmbH, Jena, Dtl.) mit kurzwelligem, blauem Licht bestrahlt. Bei einer Belichtungszeit von 250 ms waren GFP-Zellen sichtbar. Die richtige Position der ausgewählten Zelle in Schicht 5 wurde anschließend unter 2,5-facher Vergrößerung verifiziert. Nach Auswahl der zu untersuchenden Zelle wurde eine Glaspipette mit Intrazellulärlösung befüllt und in den Elektrodenhalter eingespannt, wobei ein mit Silberchlorid-beschichteter Draht in die Pipettenlösung getaucht wurde. Hierdurch wurde die Pipette zur Ableitelektrode. Der Silberdraht war mit dem Vorverstärker verbunden, welcher wiederum eine Verbindung zum *Patch-clamp*-Verstärker hatte. Die beschriebene Vorrichtung war auf einem Mikromanipulator fixiert. Ein weiterer Elektrodenhalter für die Applikationspipette befand sich an einem zweiten Mikromanipulator, welcher im zweiten Teil der Experimente samt Applikationspipette durch eine bipolare Stimulationselektrode ersetzt wurde. Die Position beider Mikromanipulatoren wurde so gewählt, dass gleichzeitig sowohl Ableitelektrode als auch Applikationspipette an die zu untersuchende Zelle herangefahren werden konnten.

Bevor die *Patch*-Elektrode in den Hirnschnitt eingeführt wurde, konnte über ein Schlauchsystem mit Hilfe einer Spritze (Volumen: 1 ml) an der Ableitelektrode ein Überdruck erzeugt werden. Das Schlauchsystem war mit dem Elektrodenhalter verbunden. Ohne den Überdruck würde beim Heranfahren an die Zelle im Schnitt ein Verstopfen der Pipettenspitze riskiert werden. Bei zentraler Positionierung der Pipettenspitze auf dem Zellsoma ist ein durch den zuvor angelegten Überdruck erzeugtes *dimpling* (*dimpling* = Grübchen erzeugend, Dellenbildung der Membran) zu erkennen, welches essenziell für einen erfolgreichen *Patch*-Vorgang ist. Im Folgenden wird der Überdruck abgelassen und umgehend ein Unterdruck erzeugt. Es entsteht ein

Abdichtwiderstand, der größer als $1\text{ G}\Omega$ sein soll, weshalb man von einem *gigaseal* (Giga-Abdichtung) spricht. Dieser Zustand wird als *Cell-attached*-Konfiguration (der Zelle angelagert) bezeichnet. War ein stabiler *gigaseal* von mindestens $1\text{ G}\Omega$ erreicht, wurde durch kurze Saugimpulse die Zellmembran durchbrochen und somit eine *Whole-cell*-Konfiguration erzeugt. Befand sich die Zelle nun in einer stabilen *Whole-cell*-Konfiguration, konnten an ihr Messungen durchgeführt werden. In der ACSF-Lösung der Messkammer befand sich außerdem ein Silber-Chlorid-Pellet, welches als Referenzelektrode fungierte.

2.5 Befüllung und Verwendung der Pipetten

Die bei den Messungen verwendeten Pipetten wurden aus einer Borosilikatglaskapillare (GB 150 F-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) unter Hitzeeinwirkung gezogen. Die Anfertigung der Pipetten erfolgte mit dem horizontal ziehenden Kapillarziehgerät (P-1000, Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA). In einem automatisierten Prozess wurden die Glaskapillaren in vier Schritten gezogen. Die frisch gezogenen Pipetten wurden mit einer feinen Plastikkanüle befüllt. Zur Vermeidung von Verunreinigung der Lösungen wurde ein Spitzenfilter $0,2\text{ }\mu\text{m}$ verwendet. Die als *Patch*-Elektrode verwendeten Pipetten wurden mit Intrazellulärlösung befüllt, in die ein silberchloridbeschichteter Draht getaucht wurde. Die *Patch*-Elektrode wurde in der Haltevorrichtung luftdicht befestigt und zusammen mit einer zweiten Silberdrahtelektrode, welche sich in der Badlösung befand, an den Vorverstärker angeschlossen. Der Widerstand der Pipette ließ sich nach dem Eintauchen der befüllten Elektrode in die Badlösung durch den Verstärker kontrollieren und lag zwischen $5\text{--}15\text{ M}\Omega$. Des Weiteren kamen Pipetten bei der Druckapplikation von Pharmakon-Lösungen zum Einsatz und wurden als *Puff*-Pipette (*puff* = ausstoßen) bezeichnet. Sie wurden unter den gleichen Bedingungen wie die *Patch*-Pipetten gezogen.

2.6 Histologie

Alle in dieser Arbeit verwendeten Daten stammen von abgeleiteten GFP-positiven Zellen der Mauslinie GIN (Oliva et al. 2000). In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass ein hoher Prozentsatz der GFP-markierten Zellen in der Schicht 2/3 und 5 histologisch den Martinotti-Zellen zuzuordnen sind (Walker et al. 2016; Walker 2016).

Um die abgeleiteten Zellen zweifelsfrei als Martinotti-Zellen zu identifizieren, wurde neben der GFP-Markierung eine elektrophysiologische Charakterisierung der Zellen nach Erreichen der *Whole-cell*-Konfiguration durchgeführt. Des Weiteren wurde in allen Experimenten die Intrazellulärlösung mit 0,1-0,2 % Biocytin versetzt, um eine nachträgliche morphologische Identifikation der abgeleiteten Zelle zu ermöglichen. Aufgrund ihres für MC typischen ovalen bis spindelförmigen Zellkörper und ihrem charakteristischen Axon, welches sich in Schicht 1 des Barrel-Kortex mannigfaltig verzweigt (Wang et al. 2004), sind sie zumeist gut zu identifizieren.

Während des *Patch*-Vorgangs wurde darauf geachtet, dass die Zelle für einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten mit der Biocytin-haltigen Intrazellulärlösung in Kontakt stand. So war sichergestellt, dass die Zelle genug Biocytin aufnehmen konnte. Durch den aktiven Transport von Biocytin durch zelluläre Transportproteine verteilte es sich schnell in der gesamten Zelle, inklusive ihrer Dendritenbäume und axonalen Verzweigungen. Biocytin ist eine chemische Verbindung aus dem Vitamin Biotin und der Aminosäure Lysin, gehört zu der Gruppe der Carbonsäureamide und hat keinen Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zelle (Horikawa und Armstrong 1988).

Im Anschluss an die elektrophysiologischen Experimente wurde die *Patch*-Elektrode vorsichtig vom Zellsoma gelöst. Es sollte möglichst vermieden werden, große Fragmente der Zellmembran oder den Zellkern herauszulösen, damit das Biocytin nicht „ausläuft“. Die Schnitte wurden über Nacht in einer 4 %igen Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert und bei einer Temperatur von 4°C gelagert. Danach wurden die Schnitte mit PB-Puffer (Phosphatpuffer) bei Raumtemperatur mehrfach, bis zu zehn Mal, gewaschen und in PB-Puffer bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt. Um die Morphologie der abgeleiteten GIN-Zellen sichtbar zu machen, wurde eine ABC-DAB-Färbung (Avidin-Biotin-Komplex-3,3'-Diamino-benzidin-tetra-dydrochlorid) durchgeführt. Der Färbungsprozess lief wie folgt ab: Zunächst wurden die Schnitte mit einem Gefrierschutz (Saccharose 25 %) versetzt und darin für eine Dauer von mindestens 90 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurden sie mit flüssigem Stickstoff in insgesamt drei Zyklen

schockgefroren und im Folgenden wieder zum Tauen gebracht. Anschließend wurde erneut eine mehrmalige Spülung mit PB-Puffer vorgenommen. Um die endogene Peroxidase im Gewebe zu inhibieren und Hintergrundartefakte zu minimieren, wurden die Schnitte mit 1 %igem H₂O₂ behandelt. Dann wurden sie mit PB-Puffer (3x), TB-Puffer (1x) und TBS-Puffer (2x) gespült und in einem ABC-Reagenz (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories Inc, Burlingame, California, USA) über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte in TBS-Puffer (2x) und TB-Puffer (3x) gespült. Um die Farbreaktion hervorzurufen, inkubierten die Schnitte eine Minute lang in DAB-Lösung (1mg/ml, 3,3'diaminobenzidine; DAB, Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Nach Überführung der Schnitte in 300µl von 1 %igem H₂O₂ in TB-Puffer startete die Farbreaktion, welche unter mikroskopischer Kontrolle beobachtet wurde. Bei gewünschter Intensität wurde sie durch Auswaschen von H₂O₂ mit TB-Puffer gestoppt, anschließend wurden die Schnitte mit PB-Puffer (2x) gespült. Um die einzelnen Schichten und die Barrels besser darzustellen, folgte eine Cytochromoxidasefärbung. Bei dem Gewebe der Barrels handelt es sich um eine mitochondrienreiche Region. Das mitochondriale Enzym Cytochrom-C-Oxidase (CO) ist ein Membranprotein, welches eingesetzt wurde, da sich die Färbungsintensität nach der Aktivität des Gewebes richtet. Die Schnitte inkubierten nun einige Stunden in 1 ml CO-Färbelösung, wobei auch dieser Vorgang unter dem Mikroskop visuell kontrolliert wurde, bis die gewünschte Farbtintensität sichtbar war. Durch ein 15-minütiges Spülen mit PB-Puffer wurde die Reaktion gestoppt. Zur Intensivierung der ABC-DAB-Färbung erfolgte nach der Cytochromoxidasefärbung eine Versilberung nach Bender, wodurch sich die Neuriten der abgeleiteten Zellen stärker vom Hintergrund abheben. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Aqua Poly Mount (Polysciences, Warrington, Pennsylvania, USA) eingedeckt und bei einer konstanten Temperatur von 4 °C zum Trocknen und Aushärten gelagert.

Die beschriebenen Herstellungen der histologischen Präparate wurden für diese Arbeit nicht von der Autorin selbst, sondern von einer technischen Assistentin (Frau Patricia Sprysch) des Institutes für Neuroanatomie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

2.7 Elektrophysiologische Charakterisierung der Zellen

Zu Beginn der Messungen fand für jede abgeleitete Zelle eine elektrophysiologische Charakterisierung statt, bei der sowohl die aktiven als auch die passiven Membraneigenschaften der Zelle bestimmt wurden.

Zunächst wurden für jede Messung folgende Werte notiert: Der Pipettenwiderstand der *Patch*-Elektrode (PW) vor der Messung im Bereich von 5-15 M Ω , der Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Membran (*seal*) in der *Cell-attached*-Konfiguration von mindestens 1 G Ω , der Widerstand über der ganzen Zellmembran (R(tot)) in der *Whole-cell*-Konfiguration im M Ω Bereich, die Stromstärke gemessen in pA, die aufgebracht werden musste, um die Zelle in der *Voltage-clamp*-Konfiguration bei -60 mV zu halten, und das Ruhemembranpotential im *Current-clamp*-Modus bei 0 pA Stromapplikation in mV (V_{Rest}).

Die folgende elektrophysiologische Charakterisierung wurde im *Current-clamp*-Modus durchgeführt. Nach Erreichen einer stabilen *Whole-cell*-Konfiguration wurden passive Zelleigenschaften wie Ruhemembranpotential (V_{rest}), Membranzeitkonstante (τ_m), Eingangswiderstand (R_{in}) und Membrankapazität (C_m) ermittelt. Hierfür wurden jeweils zehn negative Stromimpulse von -10 pA und -50 pA mit der Dauer von einer Sekunde in die Zelle appliziert. Zur Berechnung des Ruhemembranpotentials wurde der Mittelwert der jeweiligen zehn Messungen vor der Stromapplikation herangezogen. Zur Bestimmung der Membranzeitkonstante wurde die Zeit gemessen, welche von Beginn der Stimulation bis zum Erreichen von 63 Prozent der finalen Potentialauslenkung benötigt wurde. Unter Verwendung des Ohm'schen Gesetzes ($R = U/I$) konnten mit Hilfe der bekannten Komponenten, nämlich der applizierten Stromstärke (I) und der gemessenen elektrischen Membranspannung (U), der Eingangswiderstand (R) berechnet werden. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Eingangswiderstands war das Anlegen einer Strom-Spannungskurve. Hierbei wurden der Zelle ausgehend von -100 pA Strom in Schritten von zehn pA in positiver Richtung bis zu ihrer AP-Feuerschwelle appliziert. Aus den gemessenen Werten konnte wie oben beschrieben der Eingangswiderstand berechnet werden. Die Membrankapazität (C) ließ sich mit den jetzt bekannten Werten der Membranzeitkonstante (τ_m) und dem Eingangswiderstand (R_{in}) errechnen, da $C = \tau/R$ gilt.

Im Folgenden wurde die Rheobase, auch Aktionspotentialschwelle genannt, der jeweiligen Zelle ermittelt. Die Rheobase ist definiert als die minimalste Stromstärke, die

der Zelle appliziert werden muss, um ein einzelnes Aktionspotential zu evozieren. Zur Ermittlung dieser Schwelle wurden der Zelle im *Current-clamp*-Modus einzelne Stromimpulse appliziert. Als Anfangsdosis wurde die zuvor bei der Strom-Spannungskurve beobachtete AP-Feuerschwelle gewählt. Bei Ausbleiben von Aktionspotentialen wurde die applizierte Stromstärke zunächst in 5 pA-Schritten, später in 1 pA-Schritten, bis zur Rheobase erhöht. Bei Erreichen der Aktionspotentialschwelle wurde die Stimulation fünfmal wiederholt und die mittlere Rheobase ermittelt. Anhand der einzeln ausgelösten Aktionspotentiale bei Rheobase wurde die Feuerschwelle (mV), die AP-Amplitude (mV) und die AP-Weite (ms) bestimmt. Die AP-Amplitude ist die Spannungsdifferenz von der Feuerschwelle bis zum Aktionspotentialmaximum. Die AP-Weite ist die Dauer des Aktionspotentials bei der die Hälfte der AP-Amplitude überschritten ist. Zur Detektion des für MC charakteristischen adaptiven Feuermuster der Aktionspotentiale wurde, ausgehend von der Feuerschwelle, die applizierte Stromstärke in 10 pA-Schritten bis mind. 100 pA oberhalb der Rheobase erhöht. Bei dieser applizierten Stromstärke wurde die *Steady-state*-Frequenz, d. h. die mittlere Frequenz der letzten 10 pA berechnet. Die elektrophysiologische Charakterisierung wurde in dieser Form für die Versuche mit Kalium-basierter Intrazellulärlösung durchgeführt. Bei den Messungen mit Cäsium-basierter Intrazellulärlösung konnte keine vollständige elektrophysiologische Charakterisierung durchgeführt werden, da die Kaliumkanäle durch Cäsium blockiert wurden und somit keine physiologischen Reaktionen gemessen werden konnten. Für diese Zellen wurden nur die passiven Eigenschaften der Zelle überprüft.

2.8 Druckapplikation

Der jeweiligen Zelle wurden per lokaler Druckapplikation die in ACSF gelösten Pharmaka GABA, Muscimol und Baclofen mit Hilfe einer *Puff*-Pipette verabreicht. Die Applikation der Lösung wurde über den Picospritzer (Toohey Company, Fairfield, NJ, USA) gesteuert. Um die Messungen möglichst vergleichbar zu halten, wurde die Spitze der *Puff*-Pipette in einem Abstand von 30-40 μm zum Zellsoma der jeweiligen Zelle platziert (Abb. 2A). Um die Position von Zelle und Pipette zu reproduzieren, wurden

diese mit einem Transparentmarker auf dem Monitor markiert. Die Pharmaka-Lösung wurde mit einer Dauer von 50 ms und einem Druck von 5 psi appliziert. Dieser Vorgang wurde, um eine komplette Regeneration der Zelle zu gewährleisten, dreimal im zeitlichen Abstand von einer Minute wiederholt. In Vorversuchen wurde die Pause von einer Minute zwischen den Applikationen als ideal ermittelt. Die Messungen wurden im *Voltage-clamp*-Modus bei -55 mV durchgeführt, um die Auslösung von Aktionspotentialen zu vermeiden aber trotzdem einen möglichst großen elektrochemischen Gradienten für die induzierten Ströme zu ermöglichen.

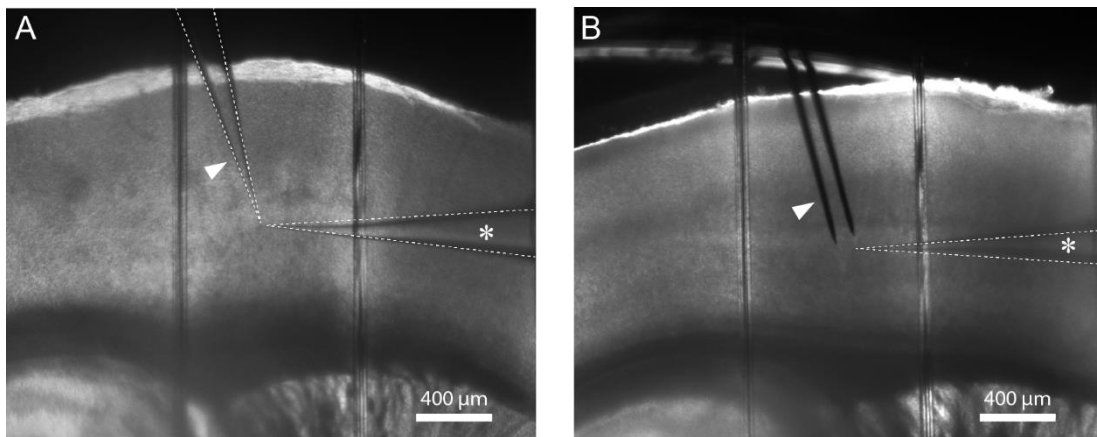


Abbildung 2: Position der Stimulations- und Ableitelektrode in den Versuchen der Puff-Applikation und der elektrischen Stimulation

CCD-Kamera Aufnahmen bei 2,5-facher Vergrößerung zur Visualisierung der Position (A) der Puff-Pipette und (B) der bipolaren Stimulationselektrode.

Die Position der Patch-Pipette ist durch einen weißen Stern (*) gekennzeichnet. Die Stimulationspipette bzw. -elektrode ist durch einen weißen Pfeilkopf (Δ) markiert.

2.9 Elektrische Stimulation

Die elektrische Stimulation wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Eingänge präsynaptischer inhibitorischer Zellen zu den abgeleiteten Martinotti-Zellen der Schicht 5 des Barrel-Kortex zu untersuchen. In den Versuchen wurde mittels einer bipolaren Elektrode (Matrix Microelectrode, FHC Bowdoinham, ME 04008, USA) die präsynaptischen Axone stimuliert, wodurch an der Postsynapse evozierte postsynaptische

inhibitorische Ströme (*evoked inhibitory postsynaptic currents*, eIPSC) ausgelöst wurden. Die 115 μm breite bipolare Elektrode war auf einem Mikromanipulator befestigt und konnte in einem Abstand von 20-50 μm zur abgeleiteten Martinotti-Zelle auf der Schnittoberfläche positioniert werden (Abb. 2B). Die Ableitungen erfolgten mit einer Cäsium-basierten Intrazellulärlösung und wurde im *Voltage-clamp*-Modus bei einem Haltepotential von +10 mV durchgeführt. Cäsiumionen blockieren sämtliche Kaliumkanäle und -transporter der Zelle und führen zu einer elektrotonisch „kompakten“ Zelle. Insbesondere durch die Blockade spannungsabhängiger Kaliumkanälen in den Dendriten der abgeleiteten Martinotti-Zelle werden Potentialänderungen entlang des Dendriten nicht abgeschwächt. Des Weiteren wird durch das Anlegen eines stark depolarisierten Haltepotentials der elektrochemische Gradient für Chloridionen erhöht. Durch diesen Versuchsaufbau können auch distale inhibitorische Synapsen vom Soma, dem Ort der Ableitung, aus registriert werden.

Während aller Experimente wurde die ACSF-Lösung mit NBQX (10 μM) versetzt, welches ein kompetitiver AMPA-Antagonist ist und somit die exzitatorischen Eingänge auf die MC blockiert. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass ausschließlich inhibitorische Eingänge auf die abgeleitete Zelle gemessen wurden. Die Experimente wurden unter Kontrollbedingungen und unter Einwasch der Pharmaka Baclofen (10 μM), Gabazine (10 μM) und CGP35348 (10 μM) durchgeführt.

Um nur eine geringe Anzahl von projizierenden Fasern zu stimulieren, wurde die Position der Stimulationselektrode unter sorgfältiger Kontrolle ausgewählt und die Stimulationsstromstärke so eingestellt (5-30 μA), dass eine eIPSC-Amplitude im Bereich von 100 pA bis 200 pA gemessen werden konnte. Die Stimulationsdauer blieb konstant bei 100 μs . Um eine möglichst vollständige Regeneration des präsynaptischen Vesikelpools zu gewährleisten, wurde zwischen den Stimulationen eine Pause von 15 Sekunden gewählt. Als Nachweis der präsynaptischen Stimulation wurde immer auf eine Latenzzeit (1-2 ms) zwischen Stimulusartefakt und eIPSC-Amplitude geachtet. Eine direkte Stimulation des Somas konnte so ausgeschlossen werden.

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden Messungen mit einer 0,1 mM Ca^{2+} -haltigen ACSF-Lösung durchgeführt. Durch die Reduktion der extrazellulären Kalziumkonzentration wurde eine Reduktion der auswärtsgerichteten Ströme zum Nachweis der synaptischen Transmission infolge der präsynaptischen elektrischen Stimulation erwartet. Ein verminderter präsynaptischer Ca^{2+} -Einstrom hat eine geringere Transmitterausschüttung zur Folge. Nach Messung unter reduzierter Kalziumkonzentration wurde die Lösung mit

normalem 2 mM Ca^{2+} ACSF wieder ausgewaschen, wodurch ein Wiederanstieg der auswärtsgerichteten Ströme nahezu auf das Ausgangsniveau beobachtet wurde (Abb. A2).

Für die Datenanalyse wurden ausschließlich Amplituden mit gleichmäßigem (monophasischem) An- und Abstieg verwendet. Messungen mit mehreren Komponenten im Anstieg wiesen auf die Überlagerung mehrerer Eingänge hin. Es folgte eine Korrektur der Stimulationselektrodenposition und/oder der applizierten Stromstärke bis eine nahezu konstante eIPSC-Amplitude beobachtet werden konnte (Abb. A1)

In den Experimenten wurden einerseits Einzelstimulationen (*single-stimulation*) zur Charakterisierung der synaptischen Transmission und andererseits Mehrfachstimulationen (*train-stimulation*), mit 10 aufeinanderfolgenden Impulsen für die Frequenzen 1, 5, 8, 20 und 40 Hz, zur Untersuchung der Kurzzeitplastizität durchgeführt. Für jede Messung und jede Bedingung wurden 20 Wiederholungen durchgeführt, welche letztlich in der Analyse gemittelt wurden.

2.10 Bestimmung des Umkehrpotentials

Das Umkehrpotential eines Stoffes, z. B. des Neurotransmitters GABA, beschreibt die Spannung, bei welcher bei geöffneten ligandengesteuerten Ionenkanälen (z. B. GABA-Rezeptoren) kein Netto-Ionenstrom über der Zellmembran vorliegt. Im Gegensatz dazu beschreibt das Gleichgewichtspotential eines Ions die Spannung, bei der sich die elektrische und die chemische Triebkraft für dieses bestimmte Ion gegenseitig aufheben. Mit Hilfe des Umkehrpotentials und der Kenntnis über das Gleichgewichtspotential verschiedener Ionenarten ist es möglich, Rückschlüsse über die an den ausgelösten Strömen beteiligten Ionen zu erlangen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Neurotransmitter GABA Ionenkanäle aktiviert, die hauptsächlich für Chloridionen durchlässig sind (Bormann et al. 1987a). Aus diesem Grund wurde im Folgenden das Gleichgewichtspotential für Chlorid mit Hilfe der Nernst-Gleichung berechnet.

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{Z_e F} \ln \frac{c_{in}}{c_{out}}$$

Mit dem Standardelektrodenpotential $E = 0 \text{ mV}$, der molaren Gaskonstante $R = 8,31447 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, der Faraday-Konstante $F = 96485,34 \text{ C mol}^{-1}$, der Badtemperatur $T = 305,15 \text{ K}$ und der Umrechnung von natürlichem zum Logarithmus der Basis 10 ergibt sich:

$$E = \frac{8,314 \frac{\text{J}}{\text{mol} \times \text{K}} \times 305,15 \text{K} \times 2,303}{Z_e \times 96485,336 \frac{\text{C}}{\text{mol}}} \log \frac{c_{in}}{c_{out}}$$

$$\approx E^{\circ} + \frac{0,059 \text{ V}}{Z_e} \log \frac{c_{in}}{c_{out}}$$

Für die Ladungszahl und die intra- bzw. extrazellulären Konzentrationen von Chlorid gilt $Z_e = -1$, $c_{in} = 5 \text{ mM}$ und $c_{out} = 133,5 \text{ mM}$. Das Gleichgewichtspotential für Chlorid ist damit:

$$E = \frac{0,059 \text{ V}}{-1} \log \frac{5 \text{ mM}}{133,5 \text{ mM}} = -84,2 \text{ mV}$$

Das Umkehrpotential wurde in dieser Arbeit experimentell ermittelt:

Die Versuche zur Bestimmung des Umkehrpotentials wurden in der *Whole-cell*-Konfiguration durchgeführt. Die Zelle wurde im *Voltage-clamp*-Modus auf -50 mV , -60 mV , -70 mV , -80 mV und -90 mV gehalten. Pro Haltepotential wurden der Zelle jeweils dreimal die Pharmaka GABA (1 mM) und Muscimol ($100 \mu\text{M}$) per Druckapplikation verabreicht. Zwischen den Applikationen wurde immer eine einminütige Pause gewählt, um eine Verfälschung der Messergebnisse durch eine Desensitivierung zu vermeiden. Basierend auf der Annahme eines linear verlaufenden Zusammenhangs zwischen dem Haltepotential und den durch GABA/Muscimol ausgelösten Strömen war die Berechnung des Umkehrpotentials der beiden Agonisten möglich.

2.11 Datenanalyse

Die in dieser Arbeit ermittelten Rohdaten wurden mit dem Programm CED Signal 5.09 (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge England) gemessen und analysiert. Anschließend wurden die erhobenen Daten in dem Programm MS Excel 2010 (Version 14.0, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) zusammengestellt, sowie mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Sigma Plot 13.0 (Systat Software, San Jose, USA) aufbereitet und statistisch ausgewertet. Zuletzt wurden sämtliche Grafiken und Abbildungen mit dem Programm Adobe Illustrator CS64 (Adobe Systems Incorporated, San José, USA) bearbeitet.

2.12 Chemikalien und Pharmaka

Die Präparation der Hirnschnitte fand in einer speziellen Präparationslösung statt, welche auf Grund ihrer Ionenzusammensetzung die Erregbarkeit der Neuronen herabsetzt und somit eine zellstressarme Präparation ermöglicht.

Während der folgenden elektrophysiologischen Messungen hingegen wurden die thalamokortikalen Schnitte von einer ACSF-Lösung umspült, wodurch eine möglichst physiologische Erregbarkeit des neuronalen Netzwerkes ermöglicht wurde.

In Kontrollversuchen wurde ACSF mit reduziertem Ca^{2+} -Gehalt verwendet, um die synaptische Transmission nachzuweisen.

Um einen konstanten O_2 -Gehalt und pH-Wert zu gewährleisten, wurden alle extrazellulären Lösungen stetig mit Carbogen begast.

Tabelle 1: Zusammensetzung Extrazellulärlösung und Präparationslösung

| | Präparationslösung (mM) | ACSF-Lösung (mM) | Ca^{2+}-armes ACSF (mM) |
|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--|
| NaCl | 87 | 125 | 125 |
| NaH₂PO₄ | 1,25 | 1,25 | 1,25 |
| KCl | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Glukose | 10 | 25 | 25 |
| Succhose | 342,3 | / | / |
| CaCl₂ | 147,02 | 2 | 0,2 |
| MgCl₂ | 203,3 | 1 | 1 |
| NaHCO₃ | 84,01 | 26 | 26 |

Während aller Ableitungen war die *Patch*-Elektrode mit Intrazellulärlösung befüllt, welche sich im stetigen Austausch mit dem Zytoplasma befand.

In den *Puff*-Experimenten mit der vorangehenden elektrophysiologischen Charakterisierung fand eine kaliumgluconatbasierte Intrazellulärlösung Verwendung.

Für die elektrische Stimulation hingegen wurde mit einer cäsiumbasierten Intrazellulärlösung gearbeitet.

Tabelle 2: Zusammensetzung Intrazellulärlösungen

| | Pipettenlösung Kaliumgluconatbasiert (mM) | Pipettenlösung Cäsiumbasiert (mM) |
|---------------------|--|--|
| K-Gluconat | 135 | - |
| KCl | 5 | - |
| CsMeSO4 | - | 135 |
| CsCl | - | 5 |
| EGTA | 0,5 | 0,5 |
| HEPES | 10 | 10 |
| MgATP | 4 | 4 |
| Na GTP | 0,3 | 0,3 |
| Na-P-creatin | 10 | 10 |

Mit dem Ziel der Aktivierung oder Blockade bestimmter Rezeptoren fanden unterschiedliche Agonisten und Antagonisten in den Experimenten Verwendung. Sie wurden entweder per Badlösung eingewaschen, oder per Druckapplikation in lokaler Nähe zum Zellsoma appliziert.

Tabelle 3: 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- β -pyridazinebutanoic acid hydrobromide) | GABA _A -Rezeptor-Antagonist | Biotrend Chemalien GmbH Köln, Deutschland |
| CGP35348 3-[[[(3,4-Dichlorophenyl)methyl]amino]propyl]diethoxymethylphosphinic acid | GABA _B -Rezeptor-Antagonist | Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien |
| NBQX (2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzofquinoxaline-7-sulfonamide disodium salt) | Antagonist ionotroper Glutamatrezeptoren | Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland |

Zur morphologischen Analyse der Zellen wurde eine ABC-DAB-Färbung durchgeführt, wobei drei verschiedene Pufferlösungen Verwendung fanden (Kap. 2.6).

Tabelle 4: Verwendete Pufferlösungen

| Pufferlösung | Molarität (M) | pH-Wert | Zusammensetzung |
|-----------------------------|----------------------|----------------|--|
| Phosphatpuffer (PB) | 0,1 | 7,4 | 35,61g Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O auf 1 l Aqua dest. |
| Trispuffer (TB) | 0,05 | 7,6 | 6,06 g Tris HCl + 1,39 g Tris Base auf 1 l Aqua dest. |
| Trisgepufferte Saline (TBS) | | | TB + 0,09 % NaCl - 5 % Na-Thiosulfatlsg., 5 min bei RT - 3 x spülen mit Aq. dest. (oder 2x Aq. dest. + 1x TB), 5 min |

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es die elektrophysiologische Charakterisierung GABA-Rezeptor-vermittelter Inhibition an Martinotti-Zellen der Schicht 5 des Barrel-Kortex der Maus zu untersuchen. Im ersten Teil der Arbeit stand die postsynaptische Membran von L5 MC im Hinblick auf die Expression von GABA-Rezeptoren im Vordergrund. Mittels *Whole-cell-patch-clamp*-Ableitung wurden die zellulären Antworten infolge einer Druckapplikation spezifischer Agonisten, sowie deren Blockade durch Antagonisten untersucht. Anschließend wurden die inhibitorischen Eingänge auf die L5 MC charakterisiert. Dafür wurden elektrisch evozierte inhibitorische postsynaptische Ströme (eIPSC) aufgenommen. Dabei standen deren Modulation durch präsynaptische GABA_B-Rezeptoren, sowie deren Kurzzeitplastizität im Mittelpunkt der Untersuchungen.

3.1 Identifizierung von Martinotti-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden Messungen an insgesamt 74 MC der Schicht 5 des Barrel-Kortex durchgeführt. Es wurden 48 Zellen mit einer Kaliumgluconat-basierten und 26 Zellen mit einer Cäsium-basierten Intrazellulärlösung abgeleitet.

Die Identifikation der Zellen in den Hirnschnitten der GIN-Maus erfolgte nach standardisiertem Vorgehen. (I) Zunächst wurden ausschließlich GFP-positive Zellen (GFP-Zellen) mit Hilfe einer Fluoreszenzlampe für den *Patch*-Vorgang ausgewählt. (II) Danach wurde eine elektrophysiologische Charakterisierung der abgeleiteten Zellen durchgeführt. (III) Nach Abschluss der elektrophysiologischen Experimente wurden die Hirnschnitte fixiert und histologisch aufgearbeitet, um die Morphologie und die Position der Zellen zu überprüfen.

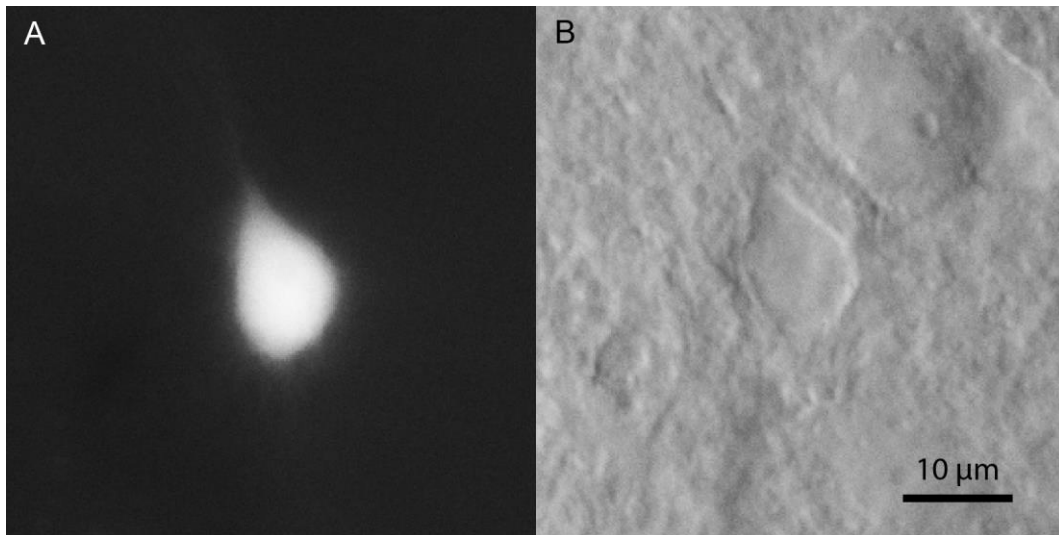


Abbildung 3: Visuelle Identifizierung von Martinotti-Zellen

(A) Lichtmikroskopische Darstellung einer L5 MC des Barrel-Kortex in 40-facher Vergrößerung unter Fluoreszenzlicht (B) und unter Infrarotlicht.

(I) In den thalamokortikalen Hirnschnitten wurden GFP-Zellen mit Hilfe einer Fluoreszenzlampe im Bereich des Barrel-Kortex ausgewählt (Abb. 3). Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen ein für Martinotti-Zellen typisches ovales Zellsoma in der 40-fachen Vergrößerung unter Infrarotlicht aufwiesen. Des Weiteren wurden ausschließlich Zellen für die Auswertung berücksichtigt, welche sich in der Schicht 5 des Barrel-Kortex befinden.

(II) Nach Erreichen einer stabilen *Whole-cell*-Konfiguration wurde an den 48 GFP-Zellen, die mit einer Kaliumgluconat-basierten Intrazellulärlösung abgeleitet wurden, eine elektrophysiologische Charakterisierung der aktiven und passiven Zellmembraneigenschaften durchgeführt (Tab. 4). Für die passiven Zellmembraneigenschaften der abgeleiteten Zellen konnten folgende Werte ermittelt werden: Das Ruhemembranpotential lag im Durchschnitt bei -64.37 ± 3.89 mV. Zellen bei denen ein Ruhemembranpotential mit einem positiveren Wert als -58 mV gemessen wurde, sind nicht in der Auswertung berücksichtigt, deren Ableitung wurde nicht weitergeführt. Der Eingangswiderstand der Zellen betrug $214,10 \pm 91,90$ M Ω und die Membranzeitkonstante lag bei $15,54 \pm 6,09$ ms. Aus dem Eingangswiderstand und der Membranzeitkonstante ließ sich die Membrankapazität berechnen, welche

71,52 ± 20,93 pF betrug. Im Folgenden sind die aktiven Zellmembraneigenschaften aufgeführt: Um ein Aktionspotential an den abgeleiteten Zellen auszulösen, wurde eine Stromstärke von 89,03 ± 58,72 pA (Rheobase) benötigt. Die Feuerschwelle betrug dabei -40,32 ± 3,31 mV. Für die Aktionspotentialamplitude (AP-Amplitude) konnten Werte von 65,56 ± 8,26 mV ausgehend von der Feuerschwelle berechnet werden. Zellen, deren Aktionspotential die +10 mV Schwelle nicht überschritten, wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt und die Ableitung abgebrochen. Neben der Amplitude der Aktionspotentiale wurde die Weite (AP-Weite) und deren *Steady-state*-Frequenz gemessen. Die Weite der Aktionspotentiale betrug 0,55 ± 0,10 ms und die *Steady-state*-Frequenz 25,61 ± 9,00 Hz. Zellen deren Ableitung ein pathologisches Verhalten aufwiesen, wurden für weiterführende Messungen nicht berücksichtigt.

Tabelle 5: Aktive und passive elektrophysiologische Membraneigenschaften von Schicht 5 Martinotti-Zellen (n = 48)

| Zellmembraneigenschaften | MW ± SD |
|---------------------------------------|----------------|
| Ruhemembranpotential (mV) | -64,37 ± 3,89 |
| Membranzeitkonstante (ms) | 15,54 ± 6,09 |
| Eingangswiderstand (MΩ) | 214,10 ± 91,90 |
| Membrankapazität (pF) | 71,52 ± 20,93 |
| Rheobase (pA) | 89,03 ± 58,72 |
| Feuerschwelle (mV) | -40,32 ± 3,31 |
| AP-Amplitude (mV) | 65,56 ± 8,26 |
| AP-Weite (ms) | 0,55 ± 0,10 |
| <i>Steady-state</i> -AP-Frequenz (Hz) | 25,61 ± 9,00 |

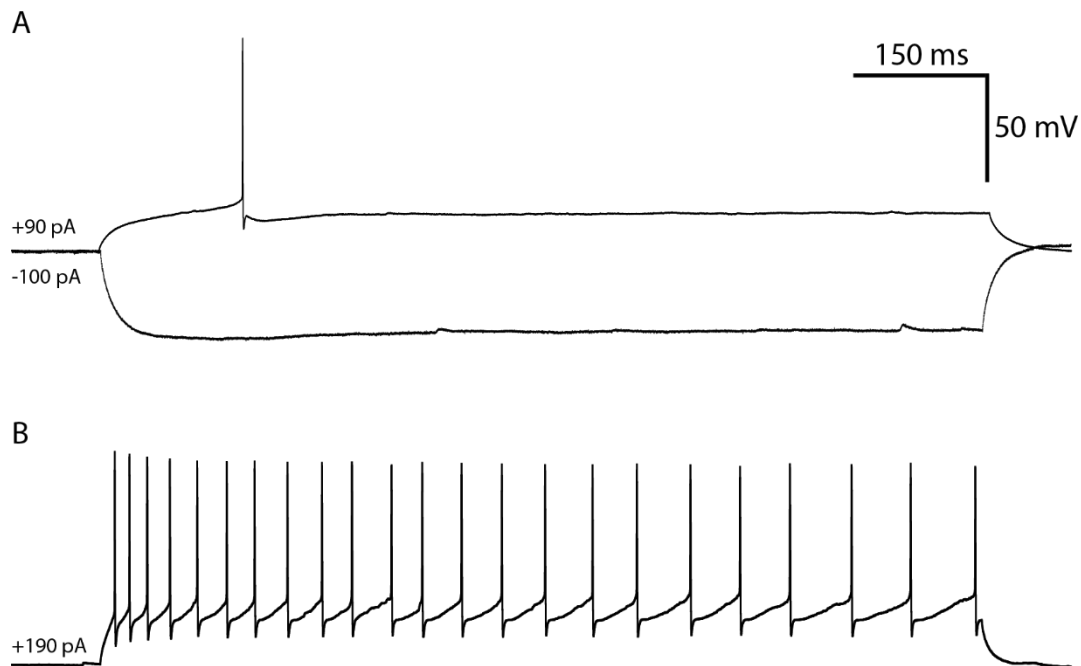


Abbildung 4: Elektrophysiologische Charakterisierung einer abgeleiteten Martinotti-Zellen

Die abgeleitete Zelle wurde im Rahmen der elektrophysiologischen Charakterisierung durch unterschiedlich starke Stromimpulse stimuliert. **(A)** Bei einer Strominjektion von +90 pA (Rheobase) wird ein Aktionspotential ausgelöst. Bei -100 pA ist ein leichter *sag* (*sag* = Senkung) zu erkennen. **(B)** Das charakteristische adaptierende Feuermuster von MC lässt sich bei +190 pA aufzeichnen.

(III) Die in den elektrophysiologischen Ableitungen verwendeten Intrazellulärlösungen waren mit Biocytin versetzt, welches sich während der Messung mit dem Zytoplasma vermischte und von der Zelle aktiv in alle Kompartimente verteilt wurde. Nach Abschluss der Messungen wurden die Hirnschnitte in Paraformaldehyd fixiert und für die morphologische Darstellung und Überprüfung der Zelllokalisierung einer ABC-DAB-Färbung unterzogen. Nun konnten die Zellen lichtmikroskopisch betrachtet werden. So war es möglich, die exakte Lokalisation der Zelle und die Zellmorphologie zu überprüfen. Typisch für Martinotti-Zellen ist ein längsovales Soma mit zwei bis vier gegenüberliegenden Dendriten. Ein besonderes Merkmal der Martinotti-Zellen ist ein vertikal bis in Schicht 1 des Barrel-Kortex aufsteigendes Axon wo es sich vielfach verzweigt (Wang et al. 2004). Die als Barrels bezeichneten fassartigen Neuronenansammlungen (Schicht 4) waren in der histologischen Färbung gut sichtbar und die Lokalisation der Zellsomata ließ sich visuell überprüfen. Zellen, welche eine für

Martinotti-Zellen untypische Morphologie, oder eine Lokalisation außerhalb der Schicht 5 des Kortexes aufwiesen, wurden nachträglich aus der Stichprobe entfernt.

Insgesamt wurden nach Abschluss der Experimente und kompletter Analyse acht Zellen aus den Ergebnissen herausgenommen. Zwei Zellen besaßen nicht die typische Morphologie von Martinotti-Zellen. Bei zwei weiteren Zellen wurden für Martinotti-Zellen untypische elektrophysiologische Parameter dokumentiert. Des Weiteren konnten vier Zellen nachträglich nicht der Schicht 5 des Barrel-Kortex zugeordnet werden.

3.2 Charakterisierung postsynaptischer GABA-Rezeptoren auf Martinotti-Zellen

Für die Untersuchung von postsynaptischen GABA-Rezeptoren auf den Martinotti-Zellen der Schicht 5 wurde in den Experimenten mit den Agonisten GABA, Muscimol und Baclofen und den Antagonisten GABAzin (SR95531) und CGP (35348) gearbeitet. Die Agonisten wurden per Druckapplikation verabreicht und die Antagonisten per Badapplikation eingewaschen. Alle Zellen wurden mit Kaliumgluconat-basierter Lösung abgeleitet und auf einem Haltepotential von -55 mV gehalten. Nach Erreichen einer stabilen *Whole-cell*-Konfiguration und der Durchführung der elektrophysiologischen Charakterisierung wurde eine zweite Glaspipette mit der Funktion einer *Puff*-Pipette an das Zellsoma mit einem Abstand von 30-40 µm herangefahren. Um die Reproduzierbarkeit der Position von Zelle und Pipette zu gewährleisten, wurden diese mit einem Transparentmarker auf dem Monitor markiert. Die Agonisten wurden mit einer Dauer von 50 ms und einem Druck von 5 psi appliziert. Nach Positionierung der *Puff*-Pipette wurde die Applikation so oft wiederholt, bis sich die aufgezeichneten Kurven weder in Form noch in Größe voneinander unterscheiden ließen. Nun wurde die Applikation dreimal in einem zeitlichen Abstand von jeweils einer Minute wiederholt. In vorangehenden Experimenten wurde der nötige zeitliche Abstand ermittelt, um eine suffiziente Regeneration der Zelle zu gewährleisten. In der Auswertung wurde mit dem Programm Signal ein Durchschnitt der drei Amplituden ermittelt.

Für die Charakterisierung postsynaptischer GABA-Rezeptoren auf Martinotti-Zellen wurden drei Experiment-Reihen durchgeführt:

(I) Im ersten Experiment wurde der Agonist GABA in unterschiedlichen Konzentrationen appliziert und die zelluläre Antwort aufgezeichnet, um die geeignete Konzentration für nachfolgende Experimente zu ermitteln (Abb. 5). Bei der Applikation des Agonisten GABA konnte für die Konzentrationen 1 μ M und 5 μ M keine Reaktion der Zellen gemessen werden. Ab einer Konzentration von 10 μ M konnten bei zwei Zellen auswärtsgerichtete Ströme von bis zu 20,29 pA beobachtet werden. Drei Zellen reagierten nicht auf die Applikation. In einer Konzentration von 25 μ M wurde GABA an zwei Zellen appliziert und es wurden auswärtsgerichtete Ströme von $39,60 \pm 10,61$ pA gemessen. Ab einer Konzentration von 50 μ M war eine deutliche Zunahme der Amplitude zu verzeichnen. Für zwei abgeleitete Zellen lagen die auswärtsgerichteten Ströme bei $69,82 \pm 22,57$ pA. An 15 Zellen wurde GABA in der Konzentration von 100 μ M appliziert und löste auswärtsgerichtete Ströme von $126,65 \pm 46,55$ pA aus. Die Applikation von 1 mM GABA zeigte an 15 Zellen Amplituden von $168,42 \pm 60,80$ pA. Die Amplituden nahmen mit steigender Konzentration des Pharmakons stetig zu und erreichten bei der Applikation von 5 mM GABA die höchste gemessene Amplitude. Für zwei untersuchte Zellen wurden auswärtsgerichtete Ströme von $239,21 \pm 29,38$ pA gemessen. Anhand der Konzentrations-Amplituden-Relation (Abb. 5B) wurde klar ersichtlich, dass die Martinotti-Zellen auf GABA-Konzentration von 25 μ M bis 5 mM eine stabile zelluläre Antwort zeigen. Damit kann von einer Expression von postsynaptischen GABA-Rezeptoren an den MC in der Schicht 5 des Barrel-Kortex ausgegangen werden. Um eine weitere Differenzierung der GABA-Rezeptoren vorzunehmen, wurde in weiteren Experimenten eine GABA-Konzentration von 100 μ M verwendet. Diese Konzentration wurde ausgewählt, da zum einen deutlich sichtbare auswärtsgerichtete Ströme verlässlich hervorgerufen werden konnten. Zum anderen war im Vergleich zu Konzentrationen im mM-Bereich ein schneller Abfall der Amplitude zu beobachten, wodurch eine Akkumulation des Pharmakons mit folgender Desensitivierung der Rezeptoren vermieden werden konnte.

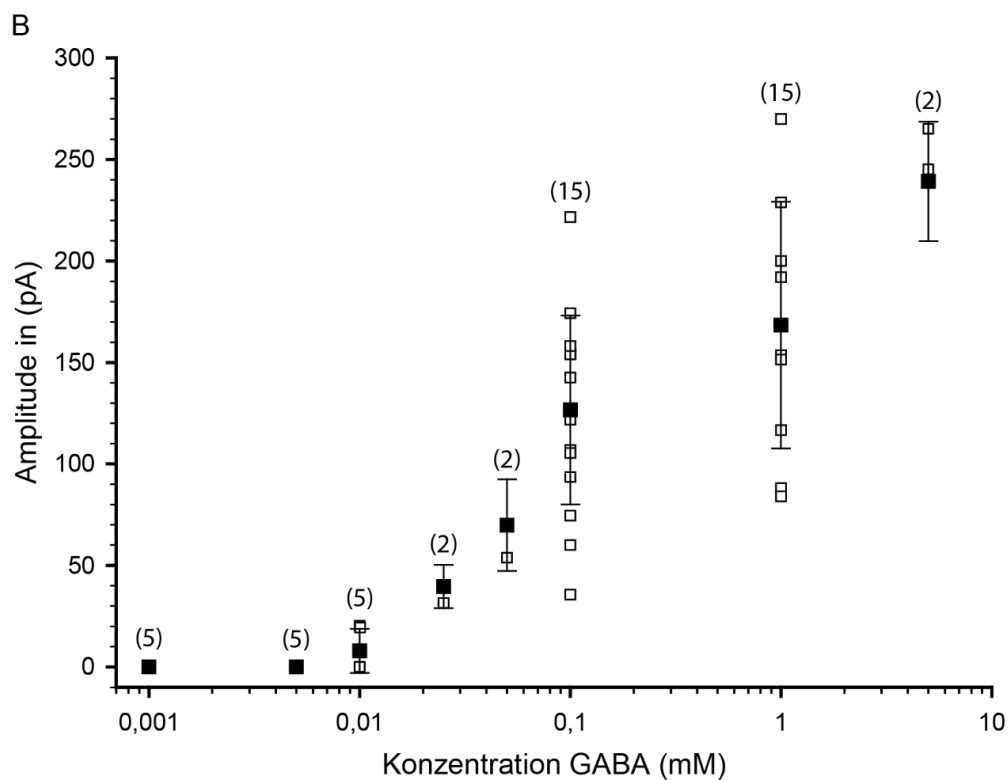
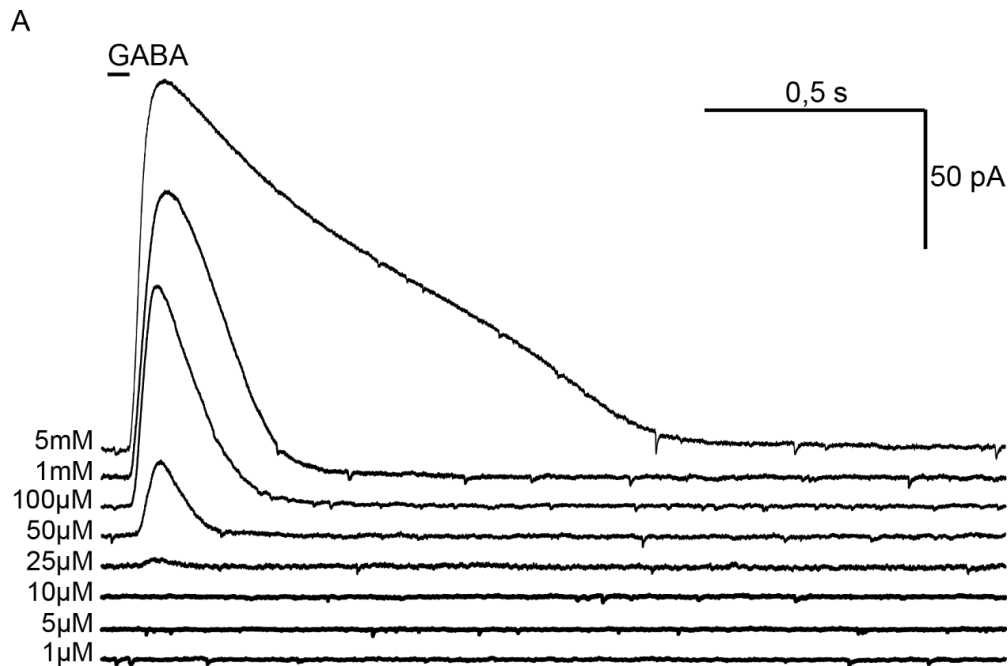


Abbildung 5: Konzentrationsabhängige Wirkung von GABA

(A) Aufnahmen auswärtsgerichteter Ströme bei lokaler Druckapplikation (5 psi; 50 ms) von GABA in aufsteigender Konzentration (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 1 mM, 5 mM) an einer L5 MC in der *Whole-cell*-Konfiguration bei einem Haltepotential von -55 mV

(B) Konzentrationsabhängigkeit der Amplituden von GABA-induzierten Ströme an L5 MC; Darstellung der mittleren Amplituden (MW + SD) als schwarze Quadrate, sowie die Einzelantworten aller untersuchten Zellen (N = 51) als weiße Quadrate; MC der Schicht 5 zeigen ab 10-25 µM GABA auswärtsgerichtete Ströme

(II) Um zu untersuchen, welche Art von GABA-Rezeptoren auf den Martinotti-Zellen der Schicht 5 exprimiert sind, wurden jeweils an einer Zelle der GABA-Rezeptor-Agonist GABA, der GABA_A-Rezeptor-Agonist Muscimol und der GABA_B-Rezeptor-Agonist Baclofen in der Konzentration von 100 µM per Druckapplikation verabreicht (Abb. 6B). Dieses Experiment wurde an insgesamt vier Zellen durchgeführt, an welchen sich ähnliche Reaktionen beobachten ließen (Abb. 6A). Im Mittel wiesen die GABA-induzierten auswärtsgerichteten Ströme eine Amplitude von $110,72 \pm 39,11$ pA auf. Muscimol evoziert ebenfalls auswärtsgerichtete Ströme ($102,75 \pm 41,19$ pA), welche sich in der Höhe der Amplitude nicht signifikant von der Reaktion auf GABA unterschieden, wohingegen in der Kinetik ein Unterschied zu beobachten war. Die Amplitude der Muscimol induzierten Ströme beschrieb einen langsameren Anstieg und Abfall im Vergleich zu den GABA-induzierten Strömen. Bei einer Applikation von Baclofen konnte keine Reaktion an allen 4 getesteten Zellen beobachtet werden.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die ausgelösten GABA-induzierten Ströme über GABA_A-Rezeptoren vermittelt sind. Einerseits konnte der spezifische GABA_B-Rezeptor Agonist Baclofen keine zelluläre Antwort hervorrufen und andererseits löste der spezifische GABA_A-Rezeptor Agonist Muscimol auswärtsgerichtete Ströme aus.

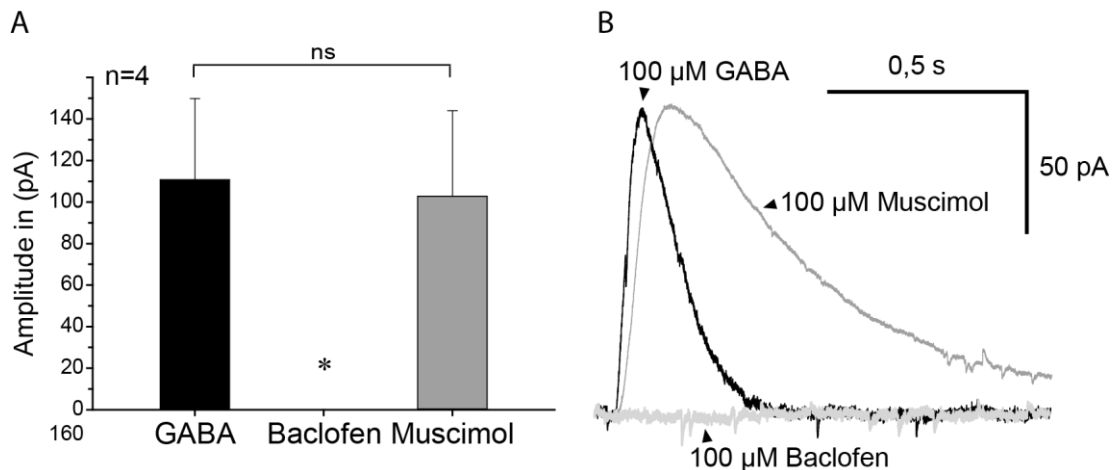


Abbildung 6: Lokale Druckapplikation von GABA, Muscimol und Baclofen

(A) Übersicht der mittleren Amplitude für vier MC infolge einer Applikation von GABA (schwarz), Baclofen (hellgrau) und Muscimol (dunkelgrau). GABA und Muscimol wiesen ähnliche Amplitudenmaxima auf, wohingegen eine Applikation mit Baclofen keinen Effekt auf die MC zeigte.

(B) Aufzeichnung von auswärtsgerichteten Strömen bei lokaler Druckapplikation (5 psi, 50 ms) mit 100 μM GABA, 100 μM Muscimol (GABA_A-Agonist) und 100 μM Baclofen (GABA_B-Agonist) an einer L5 MC in der *Whole-cell*-Konfiguration bei einem Haltepotential von -55 mV; dargestellt ist die mittlere Antwort aus 3 Messungen an einer Zelle.

(III) Zur Verifizierung der Ergebnisse der vorangegangenen Versuchsreihe wurden in den nachfolgenden Experimenten die spezifischen Antagonisten GABAZin (GABA_A-Rezeptor) und CGP35348 (GABA_B-Rezeptor) per Badperfusion eingewaschen. Die Experimente waren wie folgt strukturiert: Zuerst erfolgte eine Referenzmessung unter ACSF (Kontrolle) bei der die Agonisten GABA und Muscimol per Druck appliziert wurden. Danach wurden die Antagonisten bei allen Experimenten für eine Dauer von mindestens 10 min eingewaschen und die Ströme infolge einer erneuten Druckapplikation von GABA und Muscimol gemessen. Anschließend wurden die Antagonisten durch ACSF ausgespült und frühestens nach 20 min erfolgte eine weitere Druckapplikation von GABA und Muscimol. Die GABA- bzw. Muscimol-induzierten Ströme wurden unter den drei Bedingungen jeweils dreimal pro Zelle wiederholt und der Mittelwert für die Auswertung verwendet.

GABA-induzierten Ströme (100 μM) wurden an vier MC unter Kontrollbedingungen hervorgerufen (Abb. 7A I-IV). Diese auswärtsgerichteten Ströme besaßen eine mittlere Amplitude von $124,01 \pm 26,64$ pA. Nach dem Einwasch von GABAZin (20 μM) kam es zu einer signifikanten Reduktion der GABA-induzierten Ströme mit $1,15 \pm 2,30$ pA auf 0,9 % im Vergleich zur Referenzmessung (Abb. 7A II-IV). Anschließend wurde der

Hirnschnitt für eine Dauer von 30 min mit reiner ACSF-Lösung umspült, um den GABA_A-Rezeptor Antagonisten GABAzin möglichst komplett aus dem Gewebe auszuwaschen. Bei der erneuten Applikation von GABA war ein Anstieg der Ströme auf $46,50 \pm 30,20$ pA zu beobachten, was 36,8 % der Referenzamplitude entsprach (Abb. 7A III+IV). Ebenso wurde mit den Muscimol-induzierten Strömen (100 μ M) an vier MC verfahren (Abb. 7B). Unter Kontrollbedingungen betrug die Amplitude $144,79 \pm 16,47$ pA (Abb. 7B I+IV). Infolge des Einwaschens von GABAzin kam es zu einer fast vollständigen Blockade der Muscimol-induzierten Ströme auf ca. 1,7 % der Kontrollmessung und lag bei $3,49 \pm 4,61$ pA (Abb. 7B II+IV). Nach einem 30-minütigen Auswasch von GABAzin durch ACSF wurden wieder Muscimol-induzierte Ströme beobachtet. Die Amplitude betrug $94,16 \pm 74,47$ pA und entsprach 64,1 % der Kontrollmessung (Abb. 7B III+IV). GABAzin führte zu einer signifikanten reversiblen Blockade der GABA- und Muscimol-induzierten Ströme (Abb. 7A+B II-IV). Zum Abschluss der Versuchsreihe wurden die GABA-induzierten Ströme unter Kontrollbedingungen und unter dem GABA_B-Rezeptor Antagonisten CGP35348 gemessen (Abb. 7C). An drei Martinotti-Zellen zeigten die GABA-induzierten Ströme eine mittlere Amplitude von $167,09 \pm 58,50$ pA (Abb. 7C I+IV). Der Einwasch von CGP führte zu keiner signifikanten Veränderung der Amplitude, welche bei 99,1 % des Referenzwertes blieb (Abb. 7C II+IV). Somit hatte CGP keinen Effekt auf die GABA-induzierten Ströme.

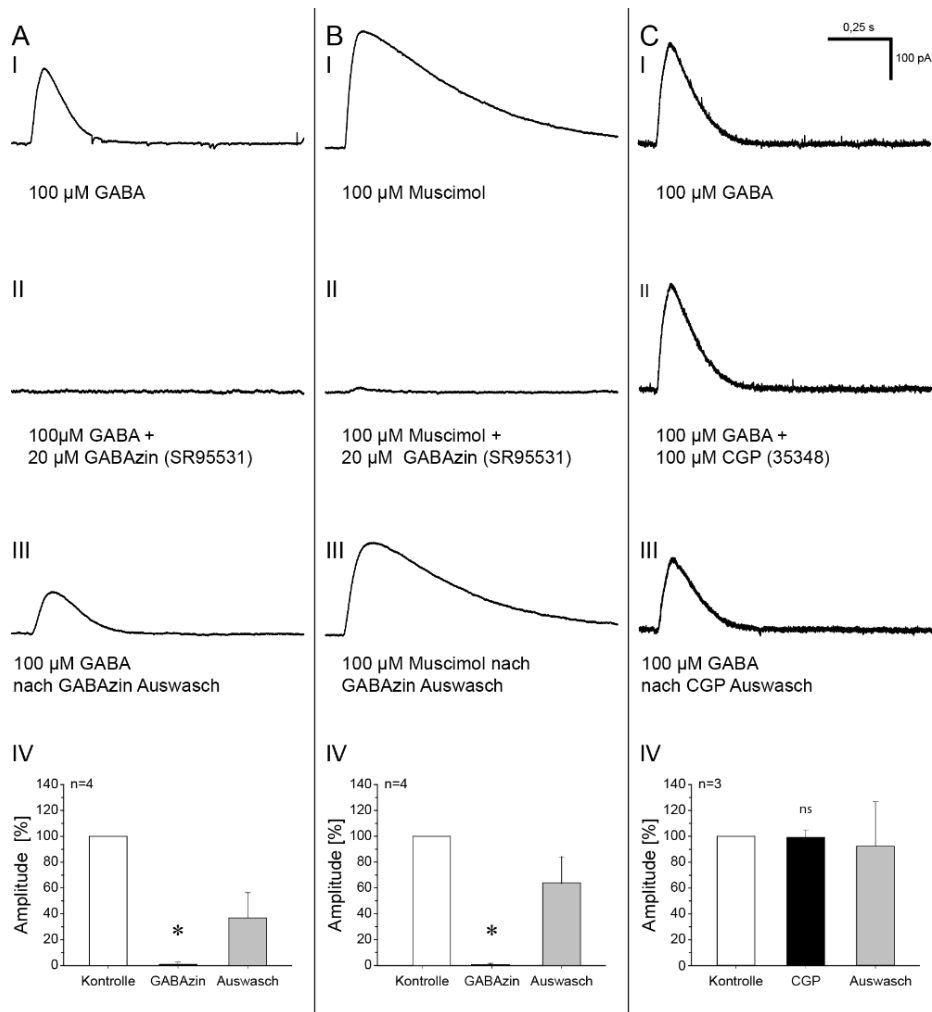


Abbildung 7: Blockierung GABA-/Muscimol-induzierter Ströme

(A) (I) GABA-induzierte (100 μ M) Ströme gemittelt aus drei Messungen einer L5 MC unter Kontrolle (II) nach Einwasch (10 min) des GABA_A-Rezeptor-Antagonisten GABAzin (20 μ M) (III) und nach Auswasch von GABAzin (30 min). (IV) Mittlerer Effekt von GABAzin (20 μ M) auf die GABA-induzierten Ströme von vier abgeleiteten L5 MC. Die relativen mittleren Amplituden sind unter Kontrollbedingungen (weiß), unter GABAzin (schwarz) und nach Auswasch von GABAzin (grau) dargestellt. GABAzin führte zu einer Reduktion der GABA-induzierten Ströme auf 0,9 % der Kontrollamplitude. (B) (I) Muscimol-induzierte (100 μ M) Ströme gemittelt aus drei Messungen einer L5 MC unter Kontrolle (II) nach Einwasch (10 min) von GABAzin (20 μ M) (GABA_A-Rezeptor-Antagonist) (III) nach Auswasch von GABAzin (30 min) (IV) Effekt von GABAzin (20 μ M) auf die Muscimol-induzierten Ströme von vier abgeleiteten L5 MC; Darstellung der relativen mittleren Amplituden unter Kontrollbedingungen (weiß), unter GABAzin (schwarz) und nach Auswasch von GABAzin (grau); GABAzin führte zu einer Reduktion auf 1,7 % der Amplitude der Muscimol-induzierten Ströme (C) (I) GABA-induzierte (100 μ M) Ströme gemittelt aus drei Messungen einer L5 MC unter Kontrolle (II) nach Einwasch (10 min) von CGP35348 (100 μ M) (GABA_B-Rezeptor-Antagonist) (III) nach Auswasch von CGP35348 (30 min) (IV) Effekt von CGP35348 (100 μ M) auf die GABA-induzierten Ströme von drei abgeleiteten L5 MC; Darstellung der relativen mittleren Amplituden unter Kontrollbedingungen (weiß), unter CGP35348 (schwarz) und nach Auswasch von CGP35348 (grau); CGP35348 führte zu einer Reduktion auf 99,1 % der Amplitude der GABA-induzierten Ströme.

Zusammenfassend lässt sich für die pharmakologischen Versuche festhalten, dass die GABA-induzierten Ströme an den Martinotti-Zellen der Schicht 5 im Barrel-Kortex ausschließlich über GABA_A-Rezeptoren vermittelt sind: Der GABA_B-Rezeptor-Agonist Baclofen rief keine Membranströme hervor und auch der GABA_B-Rezeptor Antagonist CGP besaß keinen Effekt auf die GABA-induzierten Ströme. Dagegen wiesen die Muscimol-induzierten Ströme vergleichbare Amplituden zu den GABA-induzierten auf und ließen sich ebenso durch den GABA_A-Rezeptor-Antagonisten GABAzin nahezu vollständig blockieren. Aus den Befunden kann geschlossen werden, dass die MC in der Schicht 5 auf ihrer Membran GABA_A-Rezeptoren exprimieren.

3.3 Charakterisierung der GABA- und Muscimol-induzierten Ströme

In den vorangegangenen Versuchen wurde beobachtet, dass die GABA_A-Rezeptor-Agonisten GABA und Muscimol postsynaptische auswärtsgerichtete Ströme bei einem Haltepotential von -55 mV auslösten. Auswärtsgerichtete Ströme konnten in diesem Fall entweder durch einen Ausstrom von Kationen oder durch einen Einstrom von Anionen hervorgerufen werden. Um zu überprüfen, welche Ionen bei einer Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren über der Zellmembran von Martinotti-Zellen der Schicht 5 flossen, wurde das Umkehrpotential dieser Ströme experimentell ermittelt. Hierfür wurde durch eine Änderung des Haltepotentials der elektrische Gradient über der Zellmembran beeinflusst. Anhand des zu beobachtenden Ionenflusses ließ sich das Umkehrpotential für die evozierten Ströme bestimmen.

In dem beschriebenen Experiment wurden die Agonisten GABA (100 µM) und Muscimol (100 µM) per Druckapplikation (5 ms und 5 psi) der abgeleiteten Zelle zugeführt. Die Applikationspipette wurde mit einem Abstand von 30-40 µm an das Zellsoma herangefahren und während des Experimentes an derselben Position belassen. Die Applikation erfolgte für alle angelegten Haltepotentiale dreimal in einem zeitlichen Abstand von einer Minute. In der Analyse wurden die ausgelösten Stromamplituden der drei Applikationen gemittelt. Die Zellen wurden im *Voltage-clamp*-Modus bei einem Haltepotential von -50 mV bis -90 mV in 10 mV-Schritten gehalten. Beim Ablesen der Messwerte wurde der *offset* (*offset* = Verschiebung), welcher während der Messung entstand, berücksichtigt. Angefangen bei -50 mV wurde für jedes Haltepotential die Reaktion auf die oben beschriebene Druckapplikation der Agonisten aufgezeichnet.

Zunächst wurde in dem Experiment der abgeleiteten Zelle GABA appliziert. Hierbei waren für die am Vorverstärker eingestellten Haltepotentiale -50, -60 und -70 mV auswärtsgerichtete Ströme zu erkennen. Ab einem Haltepotential von -80 mV kam es hingegen zu einwärtsgerichteten Strömen (Abb. 8A I). Die Applikation von GABA wurde an fünf Zellen durchgeführt. Angefangen wurde mit einem Haltepotential von -50 mV. Bei der Applikation ließen sich auswärtsgerichtete Ströme von $229,94 \pm 102,27$ pA beobachten. Bis zu dem Haltepotential von -70 mV nahm die Amplitude der auswärtsgerichteten Ströme ab (-60 mV: $128,06 \pm 60,23$ pA; -70 mV: $44,19 \pm 19,04$ pA). Ab einem Haltepotential von -80 mV war eine Richtungsänderung der Ströme zu beobachten und es traten erstmals einwärtsgerichtete Ströme von $-45,49 \pm 29,96$ pA auf. Bei Herabsetzung des Haltepotentials auf -90 mV kam es erneut zu einwärtsgerichteten Strömen von $-142,56 \pm 39,20$ pA. Das Umkehrpotential für GABA-induzierte Ströme ließ sich im Bereich zwischen -70 und -80 mV vermuten. Durch Annahme einer linearen Regression konnte anhand der Mittelwerte für die einzelnen Haltepotentiale ein Umkehrpotential für GABA von -73,85 mV berechnet werden (Abb. 8A II)

Im Folgenden wurde einer abgeleiteten Zelle Muscimol verabreicht, wobei ein ähnlicher Effekt wie bei der Applikation von GABA aufgezeichnet wurde. Auch hier zeigten sich für die am Vorverstärker eingestellten Haltepotentiale -50, -60 und -70 mV auswärtsgerichtete Ströme. Ab einem Haltepotential von -80 mV kam es, wie zuvor bei der Applikation von GABA beobachtet, zu einwärtsgerichteten Strömen (Abb. 8B I). An insgesamt fünf Zellen wurde das Experiment mit Muscimol durchgeführt. Bei den Haltepotentialen -50, -60 und -70 mV evozierte die Applikation des Pharmakons auswärtsgerichtete Ströme in folgender Stärke: -50 mV: $81,76 \pm 40,51$ pA; -60 mV: $48,18 \pm 41,69$ pA; -70 mV: $8,43 \pm 33,52$ pA. Bei den Haltepotentialen -80 mV und -90 mV kam es zu einwärtsgerichteten Strömen (-80 mV: $-16,79 \pm 37,55$ pA, -90 mV: $-23,83 \pm 10,03$ pA). Das Umkehrpotential ließ sich durch Mittelung aller Messungen mit -77,15 mV bestimmen (Abb. 8B II).

Wie durch die vorangegangenen Experimente (Kap. 3.2) gezeigt werden konnte, sind die durch GABA- und Muscimol-induzierten Ströme auf die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren zurückzuführen. Es ist bekannt, dass GABA_A-Rezeptoren hauptsächlich für Chloridionen permeabel sind. Die aus den Messergebnissen berechneten Umkehrpotentiale für GABA (-73,8 mV) und Muscimol (-77,1 mV) (Abb. 8) liegen nahe

dem durch die Nernstgleichung berechneten Gleichgewichtspotential für Chloridionen (-84,2 mV) (Kap. 3.3). Es lässt sich vermuten, dass die evozierten Ströme hauptsächlich durch Chloridionen getragen sind.

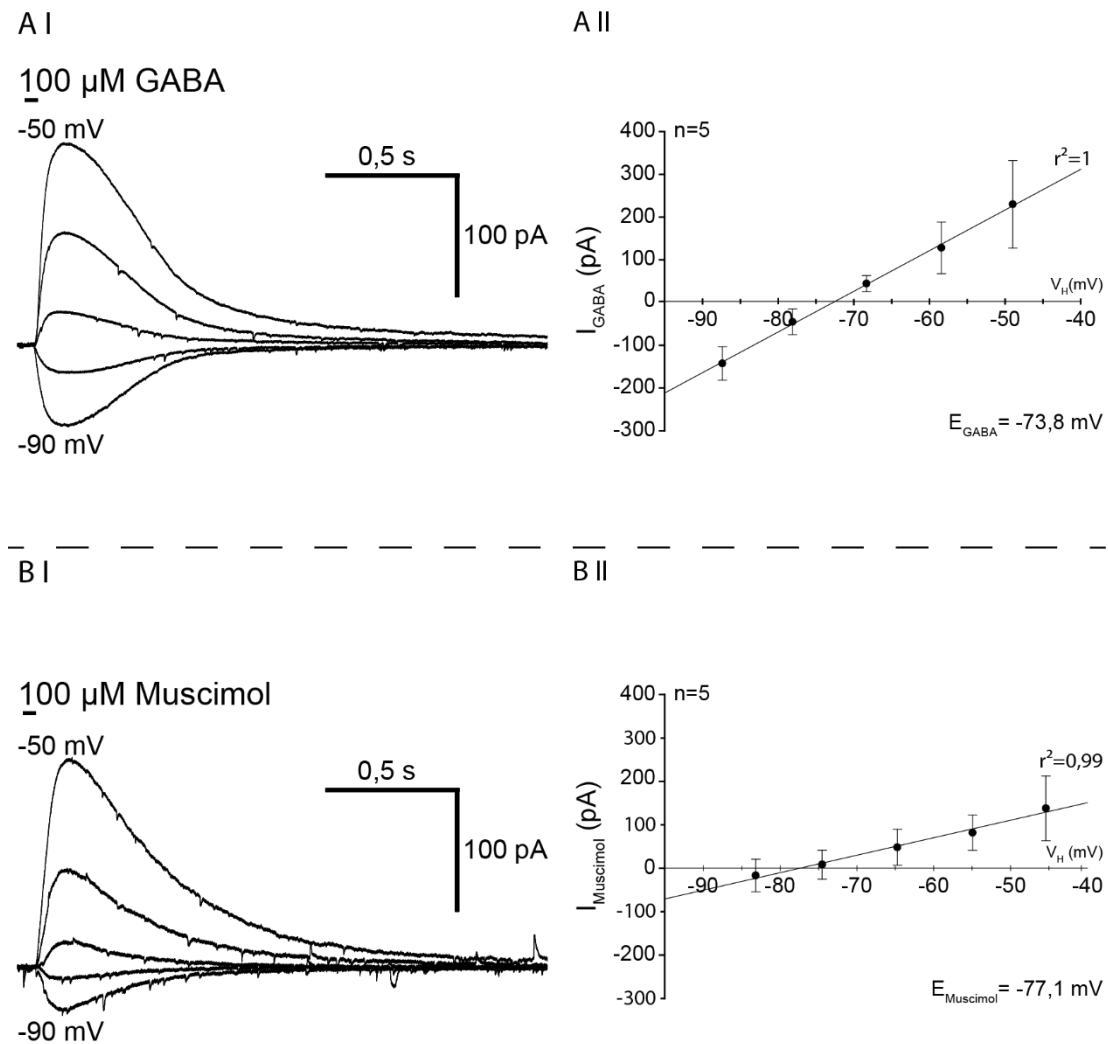


Abbildung 8: Umkehrpotential von GABA- und Muscimol-induzierten Strömen

(A I) GABA-induzierte (100 μ M) Ströme einer L5 MC bei fünf angelegten Haltepotentialen zwischen -50 mV und -90 mV (in 10 mV Abständen) (A II) Gemittelte I_{GABA} der fünf L5 MC für die angelegten Haltepotentiale als U-I-Beziehung dargestellt. Das Umkehrpotential ($E_{GABA} = -73,8$ mV) mittels linearer Regression (r^2) berechnet.

(B I) Muscimol-induzierte (100 μ M) Ströme an einer L5 MC bei fünf angelegten Haltepotentialen zwischen -50 mV und -90 mV (in 10 mV Abständen) (B II) Gemittelte $I_{Muscimol}$ von fünf L5 MC für die angelegten Haltepotentiale als U-I-Beziehung dargestellt. Das Umkehrpotential ($E_{Muscimol} = -77,1$ mV) mittels linearer Regression (r^2) berechnet.

3.4 Inhibitorische Afferenzen auf Martinotti-Zellen

In den vorangegangenen Experimenten lag der Fokus der Untersuchung auf den Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Es konnte gezeigt werden, dass L5 MC GABA_A-Rezeptoren exprimieren, welche durch lokale Applikation aktiviert werden und Chloridionen-basierte Ströme auslösen. Im folgenden Teil der Arbeit sollen die inhibitorischen Synapsen auf den MC und deren Aktivierung unter annähernd physiologischen Bedingungen im Mittelpunkt stehen. Dazu wurden präsynaptische Fasern mit Hilfe einer elektrischen Stimulation gereizt und die ausgelösten postsynaptischen Effekte an MC gemessen. In den folgenden Experimenten wurde zwei Fragestellungen nachgegangen:

I) Werden die exprimierten GABA_A-Rezeptoren auf den MC während der synaptischen Transmission aktiviert? Hierfür wurde analog zu den Druckapplikationsversuchen der spezifische GABA_A-Rezeptor-Antagonist GABA_Azin eingewaschen.

II) Werden auf den präsynaptischen inhibitorischen Terminalen GABA_B-Rezeptoren exprimiert? Dies wurde durch den Einwasch des spezifischen GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen untersucht.

Für die Untersuchung der inhibitorischen Afferenzen wurden an 26 Martinotti-Zellen der Schicht 5 die präsynaptischen afferenten Fasern durch elektrische Stimulation gereizt und die postsynaptischen Effekte mittels Ableitelektrode gemessen. Alle Messungen wurden in der *Whole-cell*-Konfiguration bei einem Haltepotential von +10 mV durchgeführt, wobei die Zellen mit Cäsium-basierter (Cs) Intrazellulärlösung abgeleitet wurden. Cs-Ionen blockierten sämtliche Kaliumkanäle der Zelle, welche bei einer Depolarisation der Zelle geöffnet wurden. Dadurch konnten die Zellen auf einem Haltepotential von +10 mV gehalten werden, wodurch sich der elektrochemische Gradient für Chloridionen erhöhte ($E_{\text{GABA}} = -73,8 \text{ mV}$, Kap. 3.3) und schon geringe Ströme von distalen synaptischen Eingängen registriert werden konnten. Die bipolare Stimulationselektrode wurde stets in einem Abstand von 20-40 μm zum Zellsoma der abgeleiteten Zelle positioniert. Mit einer Intensität von 5-30 μA wurden die präsynaptischen Axone für 100 μs gereizt. Die Einstellung der bipolaren Stimulationselektrode wurden so gewählt, dass die eIPSC Amplitude im Bereich zwischen 100 und 200 pA lag und ein monophasischer Anstieg der Amplitude vorlag. Bei der Messung von zwei Komponenten im Anstieg der Amplitude

(Abb. A1) wurde die Position der bipolaren Stimulationselektrode geändert. Es wurden Einzelstimulationen in 20-facher Wiederholung durchgeführt und in der Auswertung der Mittelwert der Messungen errechnet. Bei den Pharmakologie-Experimenten wurde stets zunächst eine Messung unter ACSF durchgeführt, welche als Referenzgröße für die Messungen unter den Pharmaka diente. Sämtliche Ableitungen erfolgten zur Blockade der exzitatorischen Transmitter unter 10 μ M NBQX.

Um sicher zu gehen, dass es sich bei den ausgelösten Strömen um synaptische Transmission handelt, wurden im Vorfeld der eigentlichen Versuche Kontrollexperimente durchgeführt. Es sollte ausgeschlossen werden, dass die postsynaptischen Ströme auf eine direkte Reizung der MC durch die bipolare Stimulationselektrode zurückzuführen sind. Dafür wurde an drei MC 0,2 mM Ca^{2+} -haltige ACSF-Lösung eingewaschen und die Amplitude der Ströme registriert (Abb. A2). Im Vergleich zur Referenzmessung unter normalem ACSF (2mM Ca^{2+}) ließ sich nach 10-minütigen Einwasch ein kompletter Rückgang der auswärtsgerichteten Ströme (0 %) beobachten. Nach erneutem Austausch der extrazellulären Lösung mit normalem 2 mM Ca^{2+} ACSF waren wieder auswärtsgerichtete Ströme infolge der elektrischen Stimulation ($77,3 \pm 3,8$ %) sichtbar. Die reduzierte Ca^{2+} -Konzentration führte zu einem verringerten Ca^{2+} -Einstrom in der Präsynapse, wodurch es zu einer verringerten Transmitterausschüttung in den synaptischen Spalt kam. Folglich ist die beobachtete Reduktion der postsynaptischen Ströme unter einer reduzierten extrazellulären Kalziumkonzentration ein Nachweis der synaptischen Transmission und es handelte sich bei den registrierten Strömen um evozierte postsynaptische Ereignisse.

Nun wurden die eigentlichen Experimente durchgeführt:

I) In den *Puff*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass GABA an GABA_A -Rezeptoren der L5 MC postsynaptische auf Chloridionen basierte Ströme auslöst. Um diesen Mechanismus auch für die synaptischen Transmission zu zeigen, wurde, nach Durchführung der Referenzmessung, der spezifische GABA_A -Rezeptor-Antagonist GABAzin (10 μ M) für 10 min eingewaschen und die Auswirkung auf die Amplitude der eIPSC untersucht (Abb. 9). Nach Einwasch des Pharmakons war eine Reduktion der postsynaptischen Amplitude des eIPSC bis zur *baseline* (Grundlinie) zu beobachten. Nach 60 min Auswasch von GABAzin mittels ACSF konnte ein Wiederanstieg der

auswärtsgerichteten Ströme beobachtet werden (Abb. 9A+B). An fünf Zellen konnte dieses Verhalten gezeigt werden. Nach Einwasch von GABAzin (10 μ M) kam es zu einer Reduktion der postsynaptischen Amplitude der eIPSC auf 0 % der Referenzmessung (0 ± 0 pA). Es fand folglich eine 100 %-ige Reduktion des Effekts statt. Nach 60 min Auswasch mittels ACSF war ein Wiederanstieg der auswärtsgerichteten Ströme auf $34,18 \pm 8,86$ pA (34,2 %) zu beobachten (Abb. 9A+B).

Diese Ergebnisse gleichen den Ergebnissen aus Kapitel 3.2 (Abb. 7), was ein Nachweis dafür ist, dass die Erkenntnisse aus Kapitel 3.2 und 3.3 auch eine Relevanz für die synaptische Transmission haben.

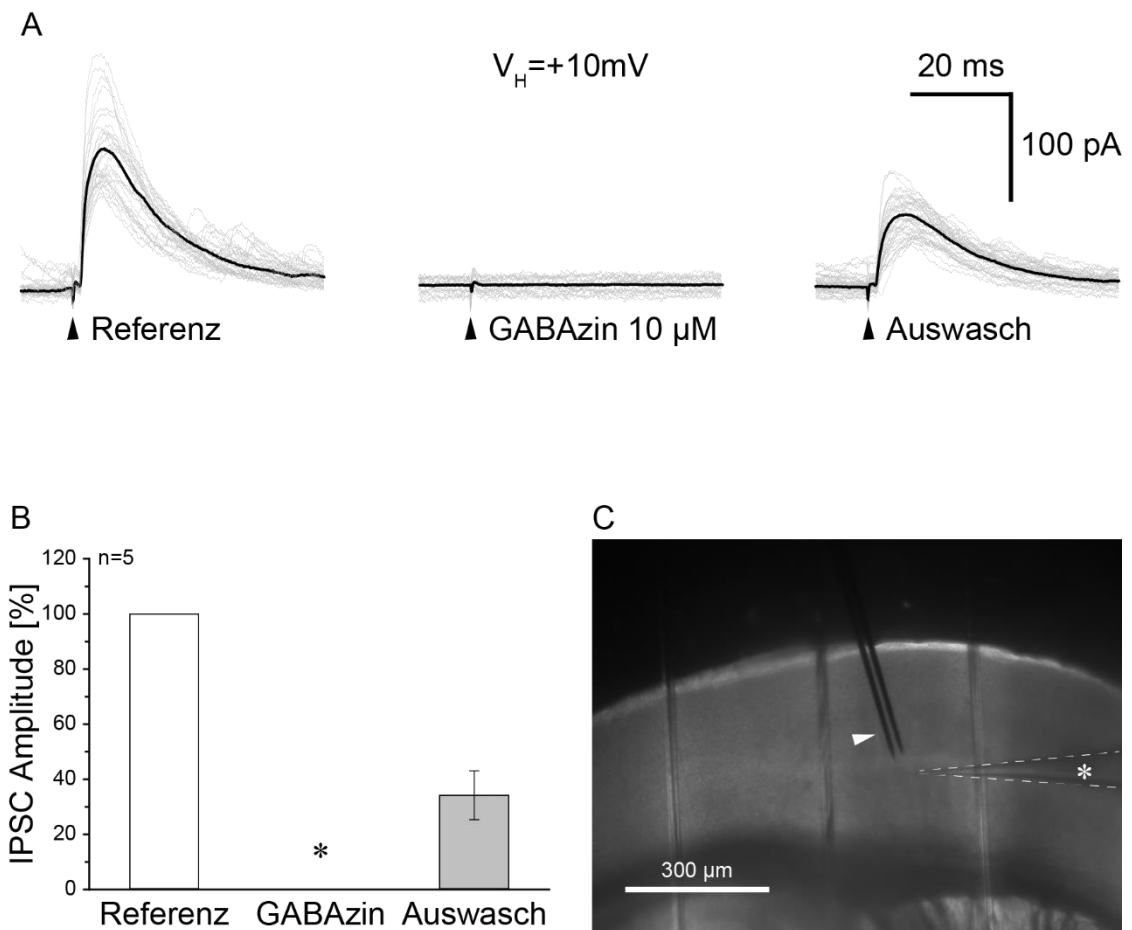


Abbildung 9: Pharmakologische Modulation von eIPSC mittels GABAzin

(A) Evozierte inhibitorische Ströme (eIPSC) wurden durch lokale Feldstimulation ($6,5 \mu\text{A}$) an einer L5 MC bei einem Haltepotential von $+10 \text{mV}$ in der *Whole-cell*-Konfiguration hervorgerufen. Die schwarzen Spuren zeigen die mittlere Antwort aus 20 Einzelstimulationen (graue Spuren). Der Einwasch von $10 \mu\text{M}$ GABAzin für die Dauer von 10 min führte zu einer vollständigen Reduktion. Nach dem Auswasch von GABAzin mittels ACSF für die Dauer von 60 min war ein Wiederanstieg der auswärtsgerichteten Ströme auf 50,3 % der Referenzmessung zu beobachten. Der Stimulationsbeginn ist durch eine schwarze Pfeilspitze gekennzeichnet

(B) Das Balkendiagramm zeigt die Amplitudenverhältnisse der eIPSC (Mittelwert \pm SEM) von fünf L5 MC unter Referenzbedingungen mit ACSF (weiß), unter $10 \mu\text{M}$ GABAzin (Mitte) und nach 30-60minütigem Auswasch mit ACSF (grau). Unter dem Einfluss von $10 \mu\text{M}$ GABAzin kam es zur Reduktion der Amplitude auf 0 %. Im nachfolgenden Auswasch mittels ACSF erreichte die Amplitude im Mittel 34,2 % der Referenz.

(C) Darstellung einer lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme des Barrel-Kortex während Experimenten mit elektrischer Stimulation. Die Stimulationselektrode ist mit einer weißen Pfeilspitze (Δ) und die Ableitelektrode mit einem weißen Stern (*) markiert.

II) Ein weiterer Befund der unter (I) durchgeführten Versuche ist, dass durch die vollständige Blockade unter GABAzin eine Beteiligung von GABA_B-Rezeptoren an den eIPSC der MC nahezu ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren konnte in den vorangegangenen *Puff*-Versuchen auch gezeigt werden, dass keine GABA_B-Rezeptoren vermittelten Ströme bei einer kurzzeitigen Applikation von GABA bzw. des GABA_B-Rezeptor Agonisten Baclofen auftraten. Damit scheinen GABA_B-Rezeptoren auf der postsynaptischen Seite der inhibitorischen Transmission keine wesentliche Rolle zu spielen. Aus Untersuchungen an Martinotti-Zellen der Schicht 2/3 im Barrel-Kortex ist bekannt, dass die inhibitorischen Terminalen an den MC GABA_B-Rezeptoren exprimieren und darüber die inhibitorische Transmission modulieren können (Badura 2016). Ob dies für die Schicht 5 MC ebenfalls zutrifft, soll durch die folgenden Versuche untersucht werden.

Zum Nachweis von GABA_B-Rezeptoren auf präsynaptischen Terminalen wurde die Reaktion auf den Einwasch des spezifischen GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen untersucht. Nach der Durchführung der Referenzmessung wurde 10 µM Baclofen für 20 min eingewaschen und die präsynaptischen Fasern wurden erneut gereizt. An einer beispielhaft abgebildeten Zelle (Abb. 10A) war ein Rückgang der Amplitude auf 53,1 % im Vergleich zur Referenzmessung zu sehen. Anschließend wurde der Badlösung 10 µM CGP35348 (GABA_B-Rezeptor-Antagonist) beigefügt. Nachdem der Schnitt für eine Dauer von 20 min mit der Baclofen- und CGP-haltigen Lösung umspült wurde, war ein Anstieg der Amplitude auf 89,1 % der Referenzmessung zu sehen.

Dieser Versuch wurde an insgesamt 13 Martinotti-Zellen durchgeführt. Unter Baclofen reduzierte sich die Amplitude der eIPSC im Mittel auf $43,1 \pm 3,8$ % der Ursprungsamplitude (Abb. 10B). Nach der Gabe von CGP35348 konnte ein mittlerer Anstieg der Amplitude auf $89,0 \pm 10,6$ % zur Referenzamplitude nachgewiesen werden. Die beobachteten Veränderungen in der Amplitude der eIPSCs an den abgeleiteten MC ließen sich auf eine präsynaptische Aktivierung bzw. Blockade von GABA_B-Rezeptoren durch den spezifischen GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen und den spezifischen GABA_B-Rezeptor-Antagonisten CGP35348 zurückführen.

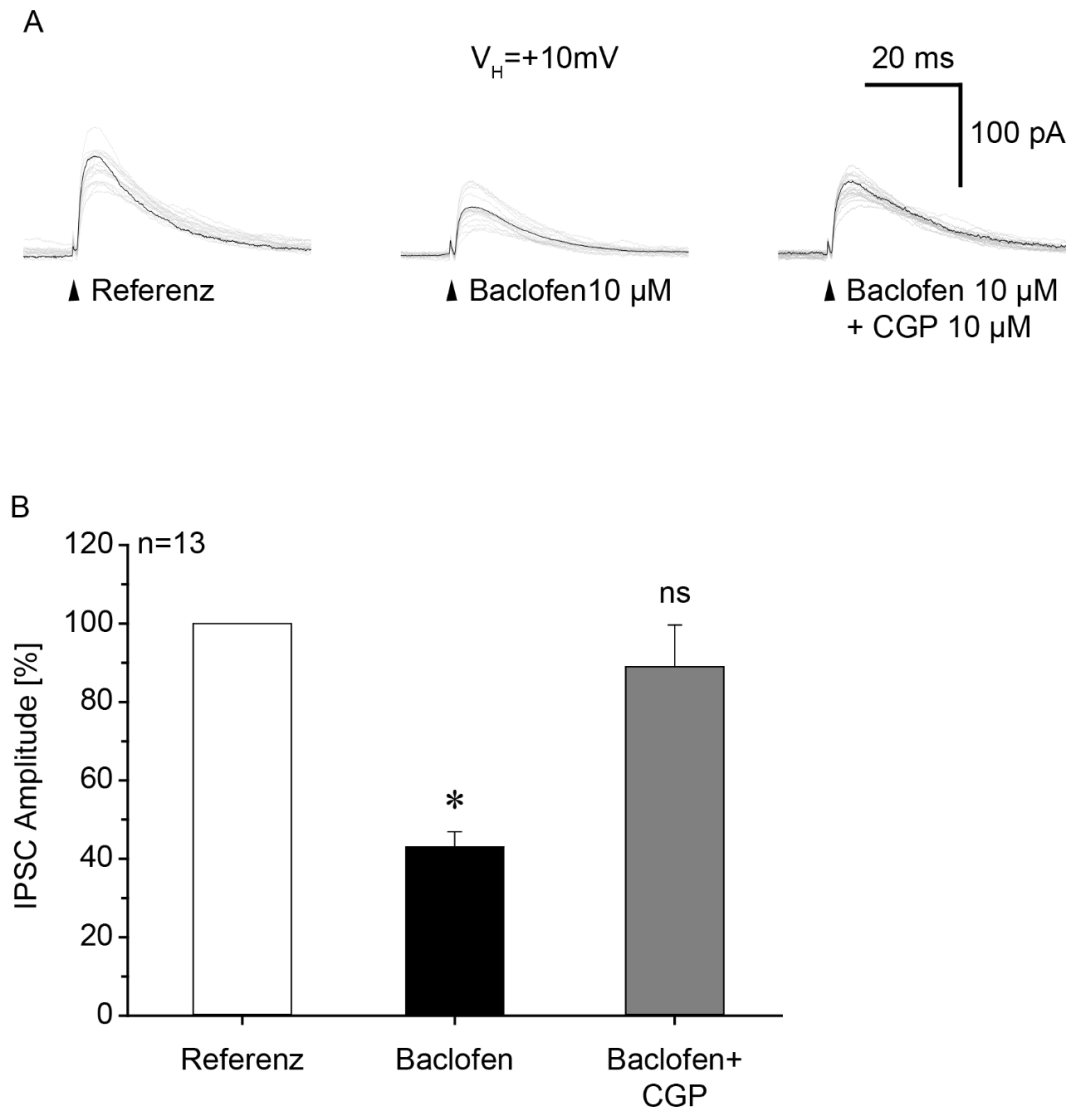


Abbildung 10: Pharmakologische Modulation von eIPSC mittels Baclofen

(A) Evozierte inhibitorische postsynaptische Ströme (eIPSC) wurden durch lokale Feldstimulation ($9 \mu\text{A}$) an einer L5 MC bei einem Haltepotential von $+10 \text{ mV}$ in der *Whole-cell*-Konfiguration ausgelöst. Die schwarzen Spuren zeigen die mittlere Antwort aus 20 Einzelstimulationen (graue Spuren). Der Einwasch von $10 \mu\text{M}$ Baclofen für die Dauer von 20 min führte zu einer Reduktion der Amplitude auf $53,1 \%$ der Referenzgröße. Nach dem Auswasch mittels $10 \mu\text{M}$ Baclofen mit $10 \mu\text{M}$ CGP35348 für die Dauer von 20 min konnte ein Wiederanstieg der auswärtsgerichteten Ströme auf $89,1 \%$ der Referenzmessung beobachtet werden. Der Stimulationsbeginn ist durch eine schwarze Pfeilspitze gekennzeichnet.

(B) Das Balkendiagramm stellt die Amplitudenverhältnisse der eIPSC (Mittelwert \pm SEM) von 13 L5 MC unter Referenzbedingungen mit ACSF (weiß), unter $10 \mu\text{M}$ Baclofen (schwarz) und den Auswasch mittels $10 \mu\text{M}$ Baclofen mit $10 \mu\text{M}$ CGP35348 (grau) dar. Unter dem Einfluss von $10 \mu\text{M}$ Baclofen kam es zur Reduktion der Amplitude auf $43,0 \%$. Im nachfolgenden Auswasch mittels $10 \mu\text{M}$ Baclofen mit $10 \mu\text{M}$ CGP35348 erreichte die Amplitude im Mittel $89,0 \%$ der Referenz.

3.5 GABA-vermittelte Modulation der Kurzzeitplastizität

In der Arbeit konnte bisher festgestellt werden, dass die evozierten inhibitorischen postsynaptischen Ströme an den L5 Martinotti-Zellen über postsynaptische GABA_A-Rezeptoren vermittelt sind und durch präsynaptische GABA_B-Rezeptoren moduliert werden können. Die Untersuchungen fanden mit Einzelstimulationen statt. Neben der Übertragung einzelner Aktionspotentiale spielt die synaptische Kurzzeitplastizität eine wichtige Rolle in der synaptischen Transmission. Im Folgenden wurden zwei Experimente durchgeführt, die Aufschluss über die synaptische Kurzzeitplastizität von inhibitorischen Synapsen auf Martinotti-Zellen der Schicht 5 im Barrel-Kortex geben sollen und im Wesentlichen zwei Fragestellungen verfolgen:

I) Unterliegen die inhibitorischen Synapsen auf den MC einer Kurzzeitplastizität?

II) Haben die präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren Einfluss auf die synaptische Kurzzeitplastizität?

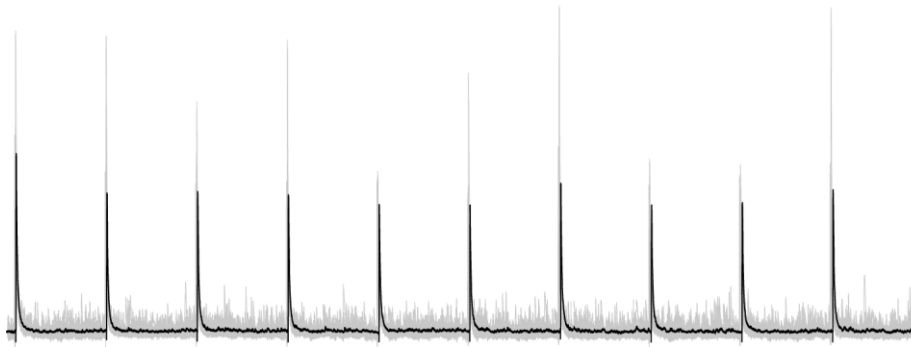
Alle Experimente wurden unter denselben Bedingungen wie die Versuche des Kapitels 3.4 durchgeführt. Anstelle von Einzelstimulationen wurden Mehrfachstimulationen mit repetitiven Stimuli (10) in den Frequenzen 1, 5, 8, 20 und 40 Hz verwendet. Die Stimulationen wurden 20mal pro Frequenz und Bedingung wiederholt und vor der Auswertung gemittelt.

Zu I) Um zu untersuchen, inwieweit die inhibitorischen Synapsen und die durch elektrische Stimulation hervorgerufenen eIPSC an den MC einer Kurzzeitplastizität unterliegen, wurde an 13 Martinotti-Zellen der Schicht 5 des Barrel-Kortex Mehrfachstimulationen in den Frequenzen 1, 8 und 40 Hz und an sechs Zellen in den Frequenzen 5 und 20 Hz durchgeführt. Bei der qualitativen Betrachtung der Ableitungen waren die eIPSC Amplituden des zweiten bis zehnten Stimulus überwiegend kleiner als die der ersten Stimulation. Dies konnte bei den einzelnen Wiederholungen (grau) aller getesteten Frequenzen und insbesondere für die errechnete gemittelte Ableitung (schwarz) beobachtet werden (Abb. 11A). In der grafischen Mittelung wurde die Reduktion der Amplitude der eIPSC vom ersten bis zum zehnten Stimulus deutlich, wobei diese nicht konstant erfolgte. Bereits beim zweiten Stimulus zeigte sich ein deutlicher Abfall der Amplitude insbesondere bei höheren Frequenzen, der bis zum fünften Stimulus anhielt. Ab dem sechsten Stimulus blieb die Höhe der Amplituden auf

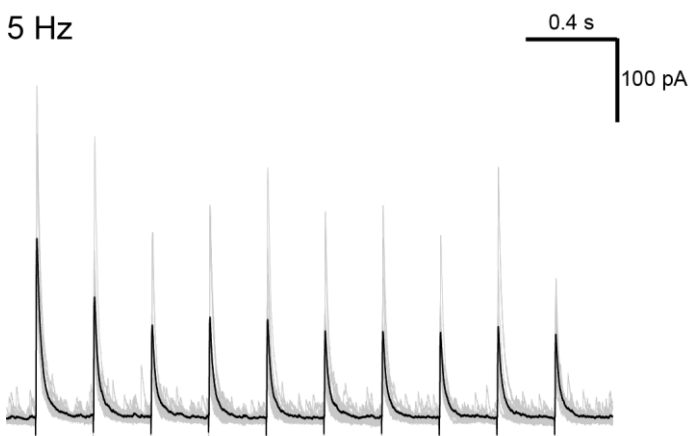
annähernd demselben Niveau und es kann von einer Plateauphase ausgegangen werden (Abb. 11A). Anhand der Aufnahme lässt sich eine Depression der eIPSC unabhängig von der Stimulationsfrequenz erkennen. In der quantitativen Auswertung wurden die Amplituden des zweiten bis zehnten Stimulus ins Verhältnis zum ersten Stimulus gesetzt und zwar getrennt für jede Frequenz (Abb. 11B). Dabei war eine frequenzabhängige Depression der Amplitude der eIPSC zu beobachten, die für 1 Hz schwächer und für 20/40 Hz stärker ausfiel. Die eIPSC bei höheren Frequenzen (5, 8, 20 und 40 Hz) zeigten eine signifikant stärkere Depression als 1 Hz wobei sie untereinander nicht signifikant unterschiedlich waren (Abb. 11).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass inhibitorische Synapsen auf Martinotti-Zellen eine frequenzabhängige Kurzzeitplastizität in Form einer Depression zeigen, die bereits ab 1 Hz zu beobachten war.

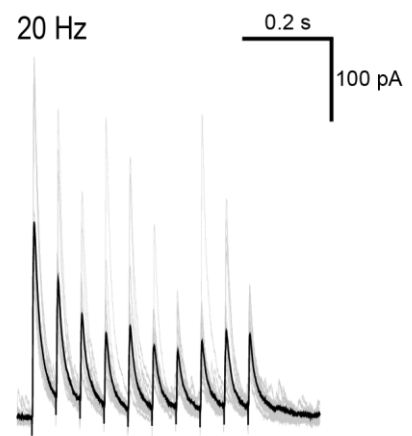
A
1 Hz



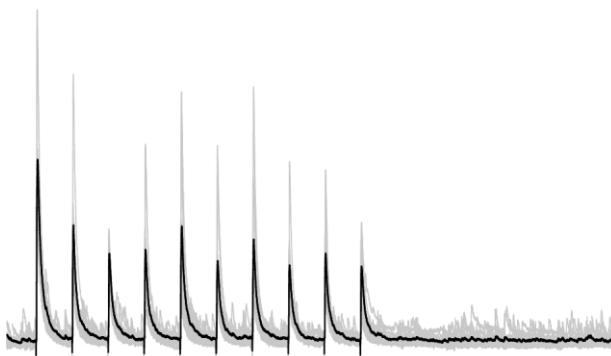
5 Hz



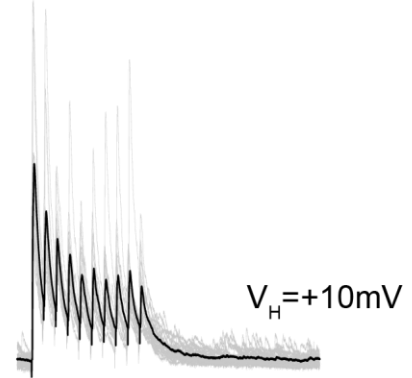
20 Hz



8 Hz



40 Hz



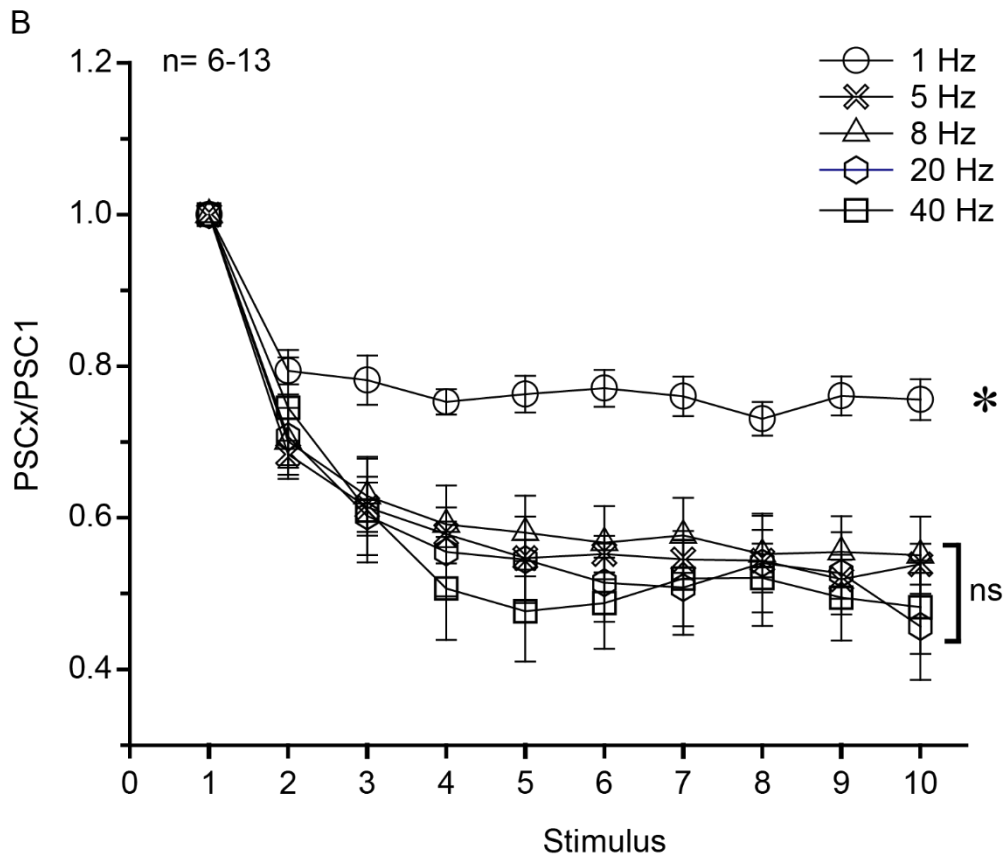


Abbildung 11: Synaptische Kurzzeitplastizität von eIPSC bei repetitiver Stimulation

(A) Evozierte inhibitorische postsynaptische Ströme (eIPSC) wurden durch 10 repetitive Stimulationen ($14 \mu\text{A}$) mit der Frequenz 1, 5, 8, 20 und 40 Hz an einer L5 MC bei einem Haltepotential von $+10 \text{ mV}$ in der *Whole-cell*-Konfiguration ausgelöst. Die Schwarzen Spuren zeigen die mittlere Antwort aus 20 Einzelstimulationen (graue Spuren).

(B) Dargestellt sind die gemittelten Amplituden (Mittelwert \pm SEM) der eIPSC für alle 10 repetitiven Stimuli von 13 L5 MC für die Frequenzen 1, 8 und 40 Hz und von 6 L5 MC für die Frequenzen 5 und 20 Hz. Die Amplituden zwei bis zehn sind im Verhältnis zu der ersten Amplitude aufgetragen. Die Frequenzen 5, 8, 20 und 40 Hz zeigten einen signifikant größeren depressiven Effekt der eIPSC als unter der 1 Hz Stimulation.

Zu II) Im nachfolgenden Versuch wurde untersucht, ob die nachgewiesenen präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren einen Einfluss auf die synaptische Kurzzeitplastizität der inhibitorischen Synapsen auf L5 MC haben. Hierfür wurden Mehrfachstimulationen mit den Frequenzen 1, 8 und 40 Hz zunächst unter Kontrollbedingungen und anschließend unter dem spezifischen GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen oder -Antagonist CGP durchgeführt. Die zweite Messung erfolgte 10 min nach dem Einwasch des Pharmakons und die dritte Messung nach einem 20-minütigen Auswasch des Pharmakons mit ACSF. Während der kompletten Durchführung eines Experiments wurden die Position der bipolaren Stimulationselektrode und die Stimulationsstärke nicht verändert. Insgesamt wurde an sieben Zellen die Wirkung von Baclofen (10 µM) auf die Kurzzeitplastizität getestet. Es konnte analog zur Einzelstimulation eine Reduktion der Amplitude unter Baclofen beobachtet werden (Abb. 12B II). Bei Betrachtung der mittleren eIPSCs im Verhältnis zum ersten Stimulus war keine Änderung der Kurzzeitplastizität unter Baclofen sichtbar (Abb. 12B). Die Frequenzen 1, 8 und 40 Hz wiesen eine deutliche Depression der eIPSCs auf, wobei diese analog zur Referenzmessung unter 8 und 40 Hz signifikant stärker ausfiel (Abb. 12B). Demzufolge kommt es trotz reduzierter Amplitude zu einer synaptischen Kurzzeitdepression an den inhibitorischen Synapsen auf den L5 MC. Dabei war die Depressionsstärke der Plateauphase im Verhältnis zum ersten Stimulus unter ACSF (Referenzmessung) und unter Baclofen gleich (Abb. 12B).

Um zu überprüfen, inwieweit diese Depression selbst durch aktivierte GABA_B-Rezeptoren infolge einer repetitiven Stimulation hervorgerufen wird, wurde CGP35348 eingewaschen. An sechs Zellen führte eine Blockade der präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren zu keiner sichtbaren Veränderung der Kurzzeitplastizität (Abb. 12A). Zudem blieben die Amplituden der eIPSCs im Vergleich zur Referenzmessung unverändert (Abb. 12A II). Vergleicht man die Stärke der synaptischen Depression unter ACSF, Baclofen und CGP, so ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (Abb. 12A+B).

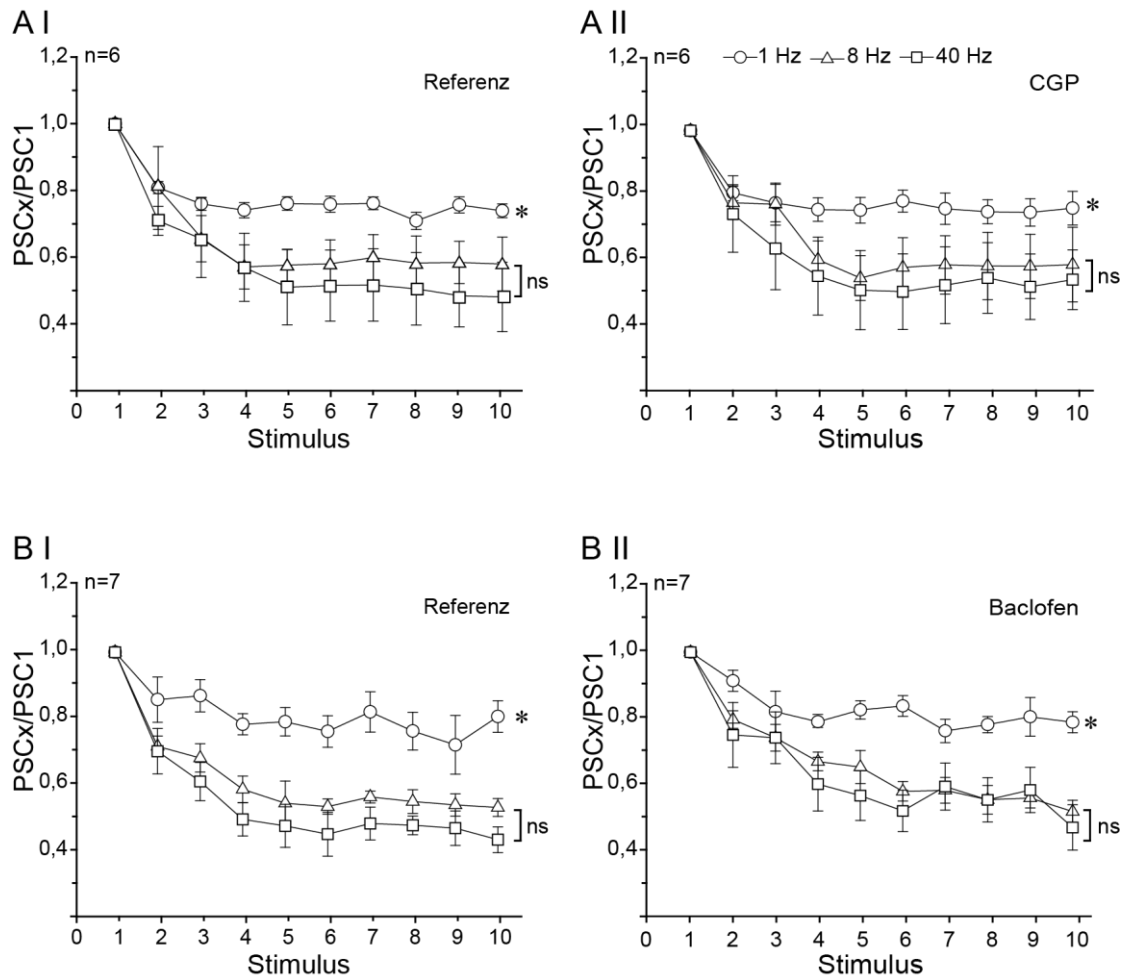


Abbildung 12: Einfluss von CGP und Baclofen auf die Amplitude der eIPSC bei repetitiver Stimulation

(A) (I) Darstellung der Amplituden der einzelnen eIPSCs in der *Train*-Stimulation von sechs L5 MC unter ACSF (Referenz) **(II)** und nach dem Einwasch von 10 μ M CGP35348. Unter CGP war kein signifikanter Einfluss auf die Kurzzeitplastizität zu sehen.

(B) (I) Darstellung der Amplituden der einzelnen eIPSCs in der *Train*-Stimulation von sieben L5 MC unter ACSF (Referenz) **(II)** und nach dem Einwasch von 10 μ M Baclofen. Unter Baclofen war kein signifikanter Einfluss auf die Kurzzeitplastizität zu sehen.

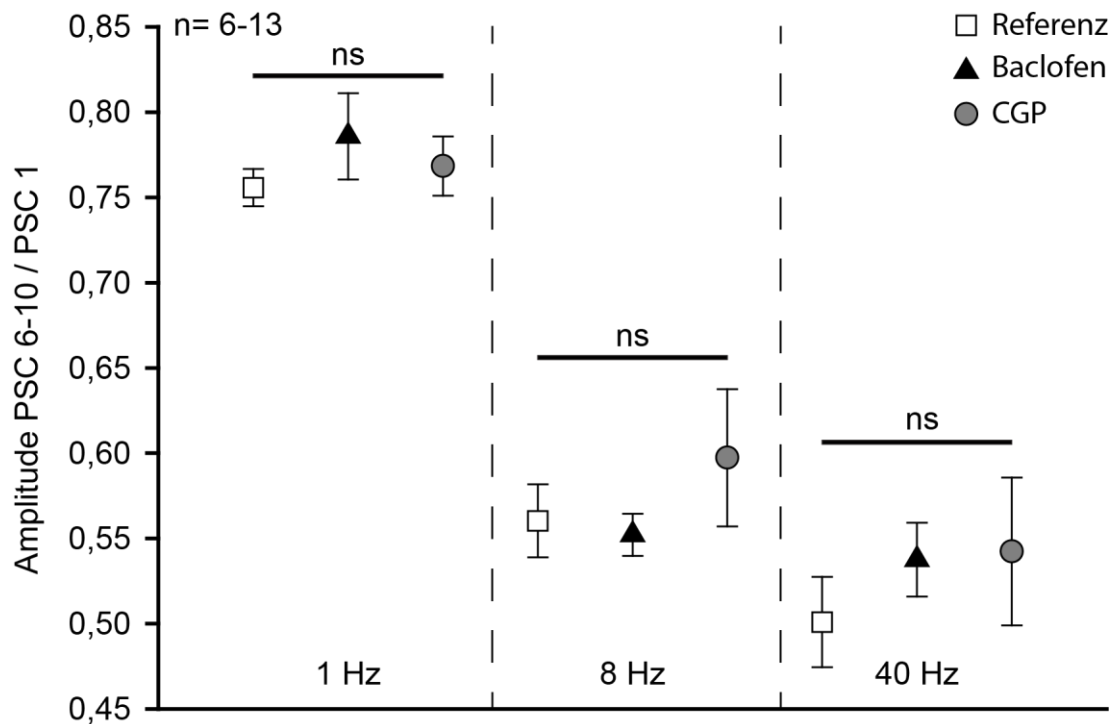


Abbildung 13: Einfluss von Baclofen und CGP auf die Kurzzeitplastizität

Es wurden bei 13 L5 MC unter ACSF (Referenz), sieben L5 MC unter Baclofen und sechs L5 MC unter CGP35348 repetitive *Train*-Stimulationen bei Frequenzen von 1 Hz, 8 Hz und 40 Hz durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und der SEM der Stimuli 6-10 (Plateauphase) im Verhältnis zur Amplitude des ersten Stimulus. Unter Baclofen und CGP35348 kam es zu keinem signifikanten Unterschied in der Kurzzeitplastizität im Vergleich zur Referenzmessung.

Zusammenfassend lässt sich durch die Mehrfachstimulation zeigen, dass die auf die L5 MC projizierenden inhibitorischen Fasern in der Kurzzeitplastizität eine Depression aufweisen. Diese Depression, beginnend mit dem zweiten Stimulus, nahm bis zum fünften Stimulus zu und verlief vom sechsten bis zum zehnten Stimulus in einer Plateauphase. Höhere Frequenzen zeigten dabei eine stärkere Depression (ab 5 Hz) als niedrigere Frequenzen (1 Hz). Weder der spezifische GABA_B-Rezeptor-Agonist Baclofen, noch der spezifischen GABA_B-Rezeptor-Antagonist CGP zeigten einen Effekt auf die synaptische Kurzzeitplastizität.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die GABA-Rezeptor-vermittelte Inhibition an Martinotti-Zellen (MC) der Schicht 5 (L5) des Barrel-Kortex elektrophysiologisch charakterisiert. Mit Hilfe der *Patch-clamp*-Methode und lokaler Druckapplikation (*Puff*-Applikation) wurde die Expression von postsynaptischen GABA-Rezeptoren auf den L5 MC untersucht. Des Weiteren sollten mittels elektrischer Stimulation inhibitorische postsynaptische Ströme (eIPSC) an den MC ausgelöst und charakterisiert werden. Dabei stand die synaptische Kurzzeitplastizität der eIPSC, sowie deren Modulation durch präsynaptische, metabotrope GABA_B-Rezeptoren im Vordergrund. Alle Versuche wurden unter *In-vitro*-Bedingungen an akuten Hirnschnitten der GIN-Maus durchgeführt. Die wichtigsten Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

- 1) Die an den L5 MC mittels *Puff*-Applikation von GABA und Muscimol induzierten auswärtsgerichteten Ströme sind durch GABA_A-Rezeptoren vermittelt.
- 2) Die durch GABA und Muscimol induzierten auswärtsgerichteten Ströme sind hauptsächlich durch Chloridionen getragen und weisen Unterschiede in ihrer Kinetik auf.
- 3) Der GABA_B-Rezeptor-Agonist Baclofen und -Antagonist CGP haben keinen Einfluss auf die GABA-induzierten Ströme.
- 4) Aktivierte präsynaptische GABA_B-Rezeptoren an den inhibitorischen Terminalen führen zu einer Reduktion der eIPSC Amplitude in der L5 MC.
- 5) Inhibitorische Synapsen auf L5 MC zeigen eine frequenzabhängige Kurzzeitplastizität in Form einer Depression.
- 6) Präsynaptische GABA_B-Rezeptoren haben keinen Einfluss auf die Kurzzeitplastizität der inhibitorischen Synapsen an den L5 MC.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass an dem Vorgang der inhibitorischen synaptischen Transmission auf MC der Schicht 5 postsynaptische GABA_A-Rezeptoren beteiligt sind. Ob an der postsynaptischen Membran ebenfalls GABA_B-Rezeptoren vorhanden sind, welche an einer langsameren und langfristigeren Modulation komplexer

kortikaler Schaltkreise beteiligt sind, kann durch die verwendete Kurzzeitapplikation nicht ausgeschlossen werden.

Des Weiteren wurden GABA_B-Rezeptoren auf inhibitorischen Eingängen, welche auf L5 MC projizieren, nachgewiesen. Im Gegensatz zu Untersuchungen an L2/3 MC zeigte weder ihre Aktivierung noch ihre Blockade einen Effekt auf die synaptische Kurzzeitdepression. Worin dieser Unterschied zwischen L2/3 MC und L5 MC begründet ist, gilt es noch zu untersuchen.

4.1 Methodische Betrachtung

Die *Patch-clamp*-Methode ist eine etablierte Technik in elektrophysiologischen Studien (Verkhatsky et al. 2006). Sie ermöglicht die Registrierung von intrazellulären postsynaptischen Strömen bzw. Potentialänderungen auf Einzelzellebene, sowie deren Charakterisierung in akuten Hirnschnitten (Witte 2009). Es ist eine sehr sensible Methode in Bezug auf Technik und Handhabung, welche jedoch viele Möglichkeiten bietet.

Mit der *Patch-clamp*-Methode sind Versuche unter *In-vivo*- (*in vivo* = im lebenden Organismus) und *In-vitro*- (*in vitro* = außerhalb des lebenden Organismus) Bedingungen möglich (Jouhannau et al. 2018), wobei in der vorliegenden Arbeit ausschließlich *In-vitro*-Experimente durchgeführt wurden. Bei *In-vitro*-Experimenten wird nur ein Ausschnitt des Zentralen Nervensystems in Form eines akuten Hirnschnittes betrachtet, weshalb das neuronale Netzwerk nicht als Ganzes untersucht werden kann. Es lassen sich jedoch gezielt einzelne Zellpopulationen unter standardisierten, kontrollierbaren Bedingungen untersuchen und insbesondere Rezeptoranalysen im kortikalen Microschaltkreis durchführen. So kann die Zusammensetzung der intra- und extrazellulären Lösung variiert werden, wodurch pharmakologische Untersuchungen ermöglicht werden. Des Weiteren können die Zellen auf unterschiedlichen Haltepotentialen gehalten werden, um insbesondere kleine Netto-Ionenströme über der Zellmembran zu messen. In dieser Arbeit wurde bei der Ermittlung des Umkehrpotentials von postsynaptischen GABA-Rezeptoren unterschiedliche Spannungen im *Voltage-clamp*-Modus angelegt. Dies fand beispielsweise bei der Ermittlung des

Umkehrpotentials von postsynaptischen GABA-Rezeptoren Anwendung, wodurch deren Permeabilität für bestimmte Ionenarten charakterisiert werden konnte (Kap. 3.3).

Die *Patch-clamp*-Methode lässt sich vielfältig mit anderen Techniken kombinieren, wovon in dieser Arbeit zur Rezeptoranalyse Gebrauch gemacht wurde. So wurden Pharmaka mittels zweier unterschiedlicher Methoden appliziert: die *Puff*-Applikation und die Badapplikation. Die getesteten GABA-Rezeptor-Agonisten wurden per *Puff*-Applikation an die zu untersuchende Zelle appliziert. Der größte Vorteil dieser Methode ist, dass die applizierten Substanzen direkt an die abgeleitete Zelle gelangen und somit eine Desensitivierung der Membranrezeptoren vermieden wird, wie es bei einem langsamen Konzentrationsanstieg der Substanz zu beobachten ist. Der Abstand der *Puff*-Pipette zum Zellsoma, die Applikationsdauer und der Druck wurden bei allen Messungen identisch eingestellt, um eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse zu gewährleisten (Abb. 2). Auftretende Differenzen zwischen den einzelnen Zellen konnten nicht verhindert werden. Hierfür kommen zelluläre Unterschiede, wie die morphologische Gestalt der Zellen, insbesondere um das Zellsoma, in Betracht. Außerdem spielt das direkte Umfeld der Zelle (Neuropil) eine entscheidende Rolle, wodurch die applizierten Substanzen nicht immer im gleichen Maße die Rezeptoren an der abgeleiteten Zelle erreichen. Des Weiteren traten geringfügige Unterschiede in der Gestalt der Applikations-Pipetten auf. Die Pipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren gezogen (Kap. 2.5), welche abhängig von der exakten Temperatur des Kapillarziehgerätes, bedingt durch unterschiedliche Laufzeiten des Gerätes vor dem Zugvorgang, verschiedene Formen der Pipettenöffnung aufweisen können. Die Form der Pipettenöffnung ließ sich unter dem Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung visuell überprüfen und Pipetten mit z. B. einer sehr großen Öffnung wurden aussortiert. Trotz der visuellen Kontrolle lässt sich nicht garantieren, dass alle verwendeten *Puff*-Pipetten eine identische Form und damit den gleichen Pipettenwiderstand hatten, was möglicherweise Auswirkungen auf die Applikation hatte. Um die individuellen Schwankungen bei einer Zelle unter gleichen Bedingungen auszugleichen, wurden die Applikationen stets 3-mal wiederholt. In den gezeigten Abbildungen wurden daher ausschließlich die gemittelte Antwort gezeigt und für die weitere Analyse verwendet.

Die Antagonisten wurden per Badapplikation eingewaschen, wodurch die zeitgleiche Applikation von Agonisten und Antagonisten möglich war und ihre gegenseitige Beeinflussung beobachtet werden konnte (Kap. 3.2, Abb. 7).

In dieser Arbeit wurde, neben der *Puff*-Applikation, die Methode der elektrischen Stimulation mit der *Patch-clamp*-Methode in der *Whole-cell*-Konfiguration kombiniert. Durch die elektrische Stimulation wurden die afferenten (präsynaptischen) Fasern, welche auf L5 MC projizieren gereizt und die postsynaptischen Effekte mittels Ableitelektrode gemessen. Durch diese Kombination konnte die Relevanz der zuvor erhobenen Befunde in der *Puff*-Applikation für die synaptische Transmission nachgewiesen und insbesondere die Kurzzeitplastizität der inhibitorischen Synapsen an den MC charakterisiert werden. Die Messungen wurden stets unter Blockade der exzitatorischen Glutamat-Rezeptoren (10 μ M NBQX) und im weiteren Verlauf unter pharmakologischem Einfluss durchgeführt, wobei der präsynaptische Effekt des GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen untersucht wurde. In den Experimenten mit elektrischer Stimulation wurde eine Cäsium-basierte Intrazellulärlösung verwendet und die Zellen im *Voltage-clamp*-Modus bei +10 mV gehalten. Cäsium blockiert die repolarisierend wirkenden Kaliumkanäle, wodurch kleine und insbesondere distal ausgelöste inhibitorische synaptische Ströme am Soma detektiert werden konnten. Zusätzlich wurden die Zellen auf einem Haltepotential von +10 mV gehalten, um den elektrochemischen Gradienten für Chloridionen zu erhöhen. Durch diesen Versuchsaufbau war es möglich die synaptischen Eingänge auf dem kompletten Dendritenbaum der abgeleiteten MC zu detektieren (Walker 2016). Um ausschließlich inhibitorische postsynaptische Ströme zu messen, wurde NBQX verwendet. NBQX ist ein kompetitiver Antagonist für AMPA- und Kainat-Rezeptoren. Es ist davon auszugehen, dass auf MC ebenfalls NMDA-Rezeptoren vorkommen können. Jedoch zeigen Studien der Arbeitsgruppe, dass NBQX bei einem Haltepotential von +10 mV sämtliche exzitatorischen Eingänge auf MC der Schicht 2/3 blockiert, was am Ausbleiben von spontanen NMDA-Rezeptor basierten postsynaptischen Events (mEPSC) zu erkennen ist (Delchmann 2017).

Vor Beginn der Messungen wurde die Position der Stimulationselektrode auf der Oberfläche des Hirnschnittes sorgfältig ausgewählt und die Stimulationsstärke im Bereich zwischen 5-30 μ A eingestellt. Die ausgelösten IPSC-Amplituden lagen zwischen 100 pA und 200 pA und damit unter der maximal möglichen Amplitudengröße (Kap. 3.2, Abb. 5). Ein biphasischer Anstieg der eIPSC-Amplitude war ein Hinweis auf die Stimulation mehrerer inhibitorischer Eingänge (Abb. A1), daraufhin wurde die Position der Stimulationselektrode korrigiert. Da sich die eIPSC-Amplituden von Zelle zu Zelle

unterschieden, ist ein direkter Vergleich der Messergebnisse nicht möglich. Deshalb werden in der Analyse ausschließlich die relativen Werte verglichen, wobei die Referenzmessung stets als Ausgangswert mit 100 % dient. Somit ist eine Vergleichbarkeit zwischen den Zellen gegeben und die Wirkung der unterschiedlichen Pharmaka konnte in Bezug zur Referenzmessung angegeben werden. Eine Darstellung und Bewertung der individuellen Zellantwort der abgeleiteten Zellen erfolgte nicht.

Obwohl mit der *Patch-clamp*-Methode sehr exakte Messungen durchgeführt werden, können die Ergebnisse gewissen Abweichungen unterliegen, was besonders bei lang andauernden Messungen auf das *liquid junction potential* (Flüssigkeitengrenzschichtpotential, LJP) zurückzuführen ist. Das *liquid junction potential* entsteht, wenn zwei Elektrolytlösungen unterschiedlicher Konzentration in Kontakt treten und es zwischen den Flüssigkeiten zum Ionenaustausch kommt. Dieses Phänomen war bereits Max Planck (Planck 1890) bekannt, welches er in der Theorie beschrieb. Ionen haben die Tendenz sich entlang des Konzentrationsgradienten zu bewegen. So diffundieren die Ionen der höher konzentrierten Lösung in diejenige Lösung mit einer vergleichsweise geringeren Ionenkonzentration. Aufgrund diesen Prozesses baut sich während *Whole-cell-patch-clamp*-Messungen über die Dauer der Ableitung hinweg eine Potentialdifferenz zwischen der Pipettenlösung der Messelektrode und der Badlösung auf. Da es sich bei der Entstehung des LJP um einen stetigen Prozess handelt, kann es für jeden Messpunkt unterschiedlich groß sein. Um den Einfluss des LJP auf die Messung abschätzen zu können, wurde es am Ende jeder Messung erfasst. Dieser Wert wird auch als *offset* bezeichnet. Da sich bei den meisten Experimenten geringe Verschiebungen auftraten ($LJP < 4 \text{ mV}$), wurden die Verschiebungen des Membranpotentials in dieser Arbeit in der Regel nicht korrigiert.

4.2 Identifizierung abgeleiteter Zellen

Alle Messungen dieser Arbeit wurden ausschließlich an GFP-positiven Zellen der Mauslinie GIN durchgeführt. Bei der GIN-Maus handelt es sich um eine transgene Mauslinie, bei der eine Subpopulation von Somatostatin-exprimierenden Interneuronen durch GFP markiert sind (Oliva et al. 2000). Es ist bekannt, dass ein hoher Prozentsatz der GFP markierten Zellen in der Schicht 2/3 den MC zuzuordnen ist (Wang et al. 2004; Ma et al. 2006; Walker et al. 2016), für die Schicht 5 des Barrel-Kortex liegen nur wenige Arbeiten mit der Mauslinie GIN vor. In Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass in der Schicht 5 ebenfalls der größte Anteil von GFP-positiven Zellen den MC zuzuordnen ist (Walker 2016). Da in der Schicht 5 des Barrel-Kortex eine geringere Anzahl an GFP-positiven Zellen vorkommen (Fischer 2018), und diese zudem eine bedeutend schwächere Fluoreszenz im Vergleich zu der Schicht 2/3 aufweisen, stellte die Auswahl der abzuleitenden Zelle eine große Herausforderung dieser Arbeit dar.

Um die abgeleiteten Zellen zweifelsfrei als Martinotti-Zellen zu identifizieren, wurde neben der GFP-Markierung eine elektrophysiologische Charakterisierung der Zellen vor Durchführung der eigentlichen Experimente vorgenommen. Hierbei wurden sowohl passive als auch aktive Zellmembraneigenschaften ermittelt (Kap. 3.1). Dabei zählt das adaptierende Feuermuster (Abb. 4B) als Reaktion auf einen überschwelligem Reiz zu den charakteristischen elektrophysiologischen Merkmalen der MC (Kawaguchi und Kubota 1997). Alle in dieser Arbeit abgeleiteten GFP-positiven Zellen der Schicht 5 besitzen ein für MC typisches adaptierendes Aktionspotentialmuster.

Die Zellmembraneigenschaften konnten von den 48 mit Kaliumgluconat abgeleiteten Zellen erhoben werden und wurden sowohl mit den Daten aus vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe (Badura 2016; Delchmann 2017) und bereits veröffentlichten Arbeiten verglichen. Die zum Vergleich herangezogenen Studien wurden an Martinotti-Zellen unterschiedlicher Kortex-Schichten durchgeführt: L1-4 MC (Karagiannis et al. 2009), L2/3 MC (Delchmann 2017), L2/3 MC und L5 MC (Badura 2016), L5 MC (Nigro et al. 2018), L6 MC (Geoffroy et al. 2012).

Das in dieser Arbeit erhobene Ruhemembranpotential der abgeleiteten L5 MC von $-64,37 \pm 3,89$ mV ist mit den Angaben aus der Literatur vergleichbar: $-60,29 \pm 2,67$ mV (Delchmann 2017); L2/3 MC $-60,71 \pm 2,01$ mV, L5 MC $-63,07 \pm 3,26$ mV (Badura 2016); $-64,1 \pm 4,20$ mV (Geoffroy et al. 2012); *fanning-out* MC $-63,6 \pm 2,6$ mV bzw.

t-shaped MC $-63,3 \pm 3,3$ mV (Nigro et al. 2018); $65,3 \pm 4,3$ (Karagiannis et al. 2009). Auch die Feuerschwelle ($-40,32 \pm 3,31$ mV) und AP-Amplitude ($-65,56 \pm 8,26$ mV) stimmen größtenteils mit den vorangegangenen Messungen der Arbeitsgruppe überein (Feuerschwelle: $-35,31 \pm 4,93$ mV (Delchmann 2017); L2/3 MC $-39,64 \pm 1,94$ mV, L5 MC $-41,81 \pm 2,10$ mV (Badura 2016); *fanning-out* MC $-45,2 \pm 1,3$ mV bzw. *t-shaped* MC $-52,7 \pm 1,6$ mV (Nigro et al. 2018); AP-Amplitude: $-66,77 \pm 12,50$ mV (Delchmann 2017); L2/3 MC $-70,40 \pm 8,90$ mV, L5 MC $-70,94 \pm 9,33$ mV (Badura 2016)). In den Übersichtsarbeiten von Geoffroy et al. (2012) und Karagiannis et al. (2009) wurden die Feuerschwelle und die AP-Amplitude nicht angegeben und konnten somit nicht zum Vergleich herangezogen werden. In der Arbeit von Nigro et al. 2018 fehlt die Messung der AP-Amplitude. Folglich konnte auch diese nicht verglichen werden. Eingangswiderstand ($214,10 \pm 91,90$ M Ω) und Rheobase ($89,03 \pm 58,72$ pA) stimmen annähernd mit den Messungen von Delchmann 2017 überein (Eingangswiderstand $225,95 \pm 67,67$ M Ω ; Rheobase $86,97 \pm 33,60$ pA). Auch Nigro et al. 2018 ermittelten einen ähnlichen Eingangswiderstand (*fanning-out* MC $193,3 \pm 28,1$ bzw. *t-shaped* MC $282,5 \pm 53$). Diese Werte weichen bei den Untersuchungen von Badura geringfügig ab (Eingangswiderstand: L2/3 MC $153,91 \pm 64,13$ M Ω , L5 MC $133,20 \pm 58,15$ M Ω ; Rheobase: L2/3 MC $114,63 \pm 79,56$ pA, L5 MC $141,22 \pm 101,36$ pA). Starke Abweichung zu den Messungen dieser Arbeit sind im Vergleich zu den Angaben von Karagiannis et al. 2009 (Eingangswiderstand: $256,00 \pm 65,00$ M Ω ; Rheobase: $-5,8 \pm 30,40$ pA) und Geoffroy et al. 2012 (Eingangswiderstand: $538,8 \pm 251,8$ M Ω ; Rheobase: $33,6 \pm 24,2$ pA) vorzufinden.

Des Weiteren ist zu prüfen, ob sich die abgeleiteten Zellen dieser Arbeit den *fanning-out* MC bzw. *t-shaped* MC zuzuordnen lassen, welche von Nigro et al. 2018 untersucht wurden. Zum Vergleich liegen die Parameter Ruhemembranpotential, Eingangswiderstand und Feuerschwelle vor, welche bereits aufgeführt wurden.

Vergleicht man die Parameter dieser Arbeit mit denen von Nigro et al. 2018 haben sie keine eindeutige Korrelation mit den *fanning-out* MC bzw. *t-shaped* MC. Die abgeleiteten Zellen können keiner der zwei morphologischen Klassen von MC eindeutig zugeordnet werden. Resümierend lässt sich für die in dieser Arbeit untersuchten Martinotti-Zellen sagen, dass die gemessenen Werte den vorangegangenen Untersuchungen entsprechen. Eine schichtspezifische Abweichung der Werte ist nicht gegeben. Abweichungen, insbesondere bei Eingangswiderstand und Rheobase, lassen sich möglicherweise auf die verwendete Spezies und das unterschiedliche Alter der für

die Versuche verwendeten Tiere zurückführen. In dieser Arbeit wurden Mäuse im Alter von 22-41 Tagen (P22-41) verwendet, wohingegen Karagiannis et al. 2009 Ratten im Alter von 17-21 Tagen (P17-21) und Geoffroy et al. 2012 junge Mäuse (P14-17) verwendet haben. Die größte Übereinstimmung der Messwerte liegt im Vergleich zu der Arbeit von Delchmann 2017 vor, was auf die experimentellen Bedingungen zurückzuführen ist. Die Untersuchungen seiner Arbeit wurden an demselben Arbeitsplatz unter identischen Bedingungen durchgeführt.

Neben der elektrophysiologischen Charakterisierung wurde zur Identifizierung der abgeleiteten Zellen als Martinotti-Zellen zur Bestimmung der Position im Kortex die Morphologie herangezogen. Dafür wurde in allen Experimenten die Intrazellulärlösung mit 0,1-0,2 % Biocytin versetzt, um die Zellen im Anschluss an die Versuche mit der ABC-DAB-Färbetechnik sichtbar zu machen (Kap. 2.6). Bei ca. 40 % der abgeleiteten Zellen konnte ein für Martinotti-Zellen charakteristisches aufsteigendes Axon mit terminaler dichten Verzweigung in L1, sowie zu meist multipolare oder doppelgebüschelt bis bipolare Dendriten ausgehend vom Soma nachgewiesen werden. Nigro et al. 2018 unterscheiden morphologisch zwei unterschiedliche Typen von MC: *fanning-out* MC bzw. *t-shaped* MC. Die aufsteigenden Axone von *fanning-out* MC erreichen hauptsächlich L2/3. Nur ein kleiner Anteil des Axons (ca. 20 %) erreicht die tiefere Hälfte von L1, wo es sich aufzweigt (Nigro et al. 2018). Charakteristisch für *t-shaped* MC ist ein aufsteigendes Axon von welchem sich ca. 50 % der Länge in L1 verzweigt (Nigro et al. 2018). In dieser Arbeit konnten diese zwei Zelltypen auf Grund einer zu geringen *Recovery Quote* nicht unterschieden werden. Alle in der Auswertung befindlichen Zellen waren zudem GFP-positiv und befanden sich zweifelsfrei in der L5 des Barrel-Kortex. Abgeleitete Zellen, die in der L5 des Barrel-Kortex lokalisiert, nicht GFP-positiv waren oder nicht die typischen morphologischen Eigenschaften von MC aufwiesen, wurden aus den Ergebnissen gestrichen.

Durch die Ableitung von GFP-positiven Zellen der Mauslinie GIN, der elektrophysiologischen Charakterisierung und der morphologischen Überprüfung der Zellen, konnte sichergestellt werden, dass es sich bei den in dieser Studie analysierten Neuronen um Martinotti-Zellen des primär somatosensorischen Kortex handelt.

4.3 Vergleich der GABA-Rezeptor-vermittelten Inhibition an Martinotti-Zellen der Schicht 5 und Schicht 2/3 des Barrel-Kortex

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Experimente an Martinotti-Zellen der Schicht 5 des Barrel-Kortex durchgeführt. In vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe wurden weitestgehend identische Versuche an Martinotti-Zellen der Schicht 2/3 des somatosensorischen Kortex durchgeführt. Mit den vorliegenden Ergebnissen ist nun ein schichtspezifischer Vergleich zwischen den MC der Schichten 2/3 und 5 und ihrer GABA-Rezeptor-vermittelten Inhibition möglich.

4.3.1 Postsynaptische GABA-Rezeptoren auf Martinotti-Zellen

Die ersten Experimente dieser Arbeit wurden mit dem Ziele einer Charakterisierung postsynaptischer GABA-Rezeptoren durchgeführt. Hierfür wurden die Agonisten GABA, Muscimol und Baclofen mittels lokaler Druckapplikation verabreicht und die Antagonisten GABA_Azin (SR95531) und CGP35348 per Badapplikation eingewaschen, um die Reaktion der abgeleiteten Zelle aufzuzeichnen (Kap. 3.2, Abb. 7). Es konnte beobachtet werden, dass auf der postsynaptischen Membran von L5 MC durch den GABA_A-Rezeptor Agonisten Muscimol-vermittelte Ströme ausgelöst wurden. Des Weiteren können sowohl Muscimol-induzierte als auch GABA-induzierte Ströme durch GABA_Azin reversibel blockiert werden. Ein Effekt von CGP35348 wurde in den durchgeführten Experimenten nicht beobachtet (Abb. 7). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass GABA-induzierte Ströme auf der postsynaptischen Membran der L5 MC durch GABA_A-Rezeptoren vermittelt sind.

Analoge Experimente wurden bereits in der Arbeitsgruppe an L2/3 MC durchgeführt (Delchmann 2017), wobei vergleichbare Antworten der L2/3 MC auf die Applikation der verschiedenen GABA_A-und GABA_B-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten beobachtet werden konnten. Auf der postsynaptischen Membran von L2/3 MC wurden ebenfalls GABA- und Muscimol-vermittelte Ströme ausgelöst, welche durch GABA_Azin reversibel blockiert wurden. Ein Effekt von Baclofen und CGP35348 wurde ebenfalls nicht beobachtet. Dieser Vergleich zeigt, dass in Bezug auf die Expression von postsynaptischen GABA-Rezeptoren an Martinotti-Zellen davon auszugehen ist, dass MC unabhängig ihrer Lage im Barrel-Kortex GABA_A-Rezeptoren exprimieren.

Betrachtet man die ausgelösten IPSC-Amplituden infolge einer GABA bzw. Muscimol Applikation, so weisen L5 und L2/3 MC vergleichbare Amplitudenmaxima unter Kontrollbedingungen auf. Allerdings lässt sich ein Unterschied zwischen der Reaktion der L2/3 und L5 MC in Bezug auf die pharmakologische Blockade mit GABAzin und insbesondere beim Auswasch von GABAzin feststellen. In dieser Arbeit konnte für L5 MC eine nahezu komplette Blockade der GABA_A-Rezeptoren bei einer *Puff*-Applikation von GABA und Muscimol beobachtet werden. Dagegen zeigen L2/3 MC insbesondere bei einer Muscimol Applikation kleine verbleibende postsynaptische Ströme (Delchmann 2017). Die Blockierung der GABA_A-Rezeptoren durch GABAzin stellt eine kompetitive Blockade dar. Daher könnte die gemessene, minimale Restantwort auf eine nicht zeitgleiche kompetitive Blockierung aller GABA_A-Rezeptoren der abgeleiteten Zelle zurückzuführen sein. Diese Vermutung wird dahingehend betätigt, dass in den Auswaschversuchen für L2/3 MC die Amplitude bei GABA Applikation auf 94,3 % bzw. 70,6 % bei Muscimol im Verhältnis zur Kontrollbedingung innerhalb von 10 min ansteigt. Für L5 MC wurde bei der *Puff*-Applikation von GABA lediglich 36,8 % der Referenzmessung (64,1 % bei Muscimol) nach einem 30-minütigen Auswasch erreicht. Dieser beobachtete Unterschied zwischen den Messungen der L2/3 MC und L5 MC ist möglicherweise auf eine höhere Affinität der postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren der L5 MC für GABAzin zurückzuführen. Dadurch werden die GABA_A-Rezeptor vermittelten Ströme auch mittels kompetitivem Mechanismus vollständig blockiert und können infolge des Auswaschs gebundenes GABAzin nicht vollständig ablösen, so dass eine erneute Aktivierung durch die Agonisten GABA und Muscimol erschwert wird.

Es ist bekannt, dass GABA_B-Rezeptoren auf der präsynaptischen ebenso wie auf der postsynaptischen Membran unterschiedlicher Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert werden (Lin und Dun 1998; Eder et al. 2001; Schuler et al. 2001). Die Experimente dieser Arbeit geben jedoch kein Anzeichen auf postsynaptisch lokalisierte GABA_B-Rezeptoren der L5 MC. Dies deckt sich mit analog durchgeführten kurzzeitigen *Puff*-Applikationen von Baclofen an L2/3 MC, bei denen ebenfalls keine Baclofen-induzierten postsynaptischen Ströme ausgelöst werden konnten (Delchmann 2017).

Vorangegangene Studien konnten in diversen Regionen des zentralen Nervensystems (Kleinhirn: Morishita und Sastry 1995; Connelly et al. 2013; Gyrus dentatus: Connelly et al. 2013; Tao et al. 2013; Thalamus: Connelly et al. 2013) GABA_B-Rezeptoren

nachweisen. In den aufgeführten Studien konnten durch eine Badapplikation von Baclofen GABA_B-vermittelte Ströme aufgezeichnet werden. In einer Arbeit der Arbeitsgruppe wurden durch eine Langzeitapplikation des GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen erstmals an L2/3 MC und L5 MC des somatosensorischen Kortex postsynaptische GABA_B-vermittelte Ströme aufgezeichnet (Badura 2016). Der Agonist wurde per Badapplikation über 10 min eingewaschen und die Änderungen des Membranpotentials der abgeleiteten Zelle aufgezeichnet. Hierbei zeigte sich für 6 von 8 Martinotti-Zellen der L2/3 eine Hyperpolarisation des Membranpotentials von mindestens 1 mV, was als Nachweis von GABA_B-Rezeptoren angesehen wurde. Für L5 MC fiel der Nachweis weniger eindeutig aus, da nur 3 von 6 Zellen eine statistisch signifikante Reaktion auf Baclofen zeigten. GABA_B-Rezeptoren sind zumeist extrasynaptisch an distalen Dendriten lokalisiert und benötigen somit zur Aktivierung eine Anhäufung von freigesetztem GABA (Ulrich und Bettler 2007). Dies würde die ausbleibende Reaktion der Zellen infolge einer *Puff*-Applikation von Baclofen erklären, da bei einer Applikationsdauer von lediglich 50 ms die distalen extrasynaptischen GABA_B-Rezeptoren bei einer kurzzeitigen Applikation des Agonisten in Nähe des Somas nicht erreicht werden können. Bei den Experimenten von Badura (2016) wurde Baclofen über 10 min appliziert und erst nach 30 Sekunden konnte eine Reaktion der Zelle beobachtet werden. Dies ist auf eine Akkumulation des GABA_B-Rezeptor-Agonisten zurückzuführen. Da Baclofen in diesen Experimenten per Badapplikation verabreicht wurde, ist nicht nachzuweisen, von welcher Zellpopulation ausgehend die postsynaptischen GABA_B-Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen aktiviert werden, d. h. von welchen inhibitorischen Eingängen auf die MC die evtl. vorhandene unterschiedliche Konnektivität der MC in L2/3 und L5 der Grund für die in diesem Experiment aufgezeigten schichtspezifischen Unterschiede der MC sein könnte. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass sich im visuellen Kortex die präsynaptischen Eingänge auf L2/3 MC von denen auf L5 MC unterscheiden (Jiang et al. 2015). Im somatosensorischen Kortex konnte mittels Paarableitung ebenfalls ein unterschiedliches Muster von inhibitorischen Eingängen für L2/3 und L5 MC beobachtet werden (Walker 2016). Dabei muss berücksichtigt werden, dass eine Aktivität von GABA_B-Rezeptoren nicht, oder nur selten bei einer GABA-Freisetzung durch ein einzelnes Interneuron zu beobachten ist (Scanziani 2000). Es bedarf einer relativ starken extrasynaptischen Stimulation, um postsynaptische GABA_B-Rezeptoren zu aktivieren (Dutar und Nicoll 1988), was auch durch die gleichzeitige Freisetzung von GABA durch verschiedene

Interneurone möglich sein kann (Isaacson et al. 1993). Der inhibitorische Regelkreis, in welchem sich die MC befindet, ist folglich entscheidend für die Aktivierung von postsynaptischen GABA_B-Rezeptoren.

Letztlich lässt sich vermuten, dass die Martinotti-Zellen in L2/3 und L5 aufgrund der eigenen Ergebnisse und der vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe keine schichtspezifischen Unterschiede in der GABAergen Transmission aufweisen, sie jedoch wohl in unterschiedliche schichtspezifische neuronale Netzwerke integriert sind. Um eine fundierte Aussage zu schichtspezifischen Unterschieden in der Expression von GABA_B-Rezeptoren zu treffen, sollte die verhältnismäßig geringe Anzahl an abgeleiteten L5 MC unter Badapplikation von Baclofen erhöht werden.

4.3.2 Charakterisierung der GABA- und Muscimol-induzierten Ströme

GABA und Muscimol lösen an den L5 MC im somatosensorischen Kortex auswärtsgerichtete Ionenströme aus. Zur Charakterisierung dieser durch GABA_A-Rezeptoren vermittelten Ströme wurde das Umkehrpotential ermittelt (Kap. 3.3). Dafür wurde die Zelle im *Voltage-clamp*-Modus bei einem Haltepotential von -50 mV bis -90 mV in 10 mV-Schritten gehalten und GABA oder Muscimol per Druckapplikation verabreicht. Eine Änderung des Haltepotentials beeinflusst den elektrischen Gradienten des Ionenstromes über der Zellmembran, und erlaubt Rückschlüsse auf die Art der sich bewegenden Ionen. Die gemittelten Amplituden für jedes Haltepotential infolge einer Druckapplikation der GABA_A-Rezeptor Agonisten wurde in einem Strom-Spannungs-Diagramm dargestellt und das Umkehrpotential für GABA bzw. Muscimol mittels linearer Regression bestimmt.

Für GABA-induzierte Ströme konnte für L5 MC ein Umkehrpotential von -73,8 mV und für Muscimol-induzierte Ströme von -77 mV ermittelt werden. Analoge Experimente wurden zuvor in der Arbeitsgruppe an L2/3 MC durchgeführt (Delchmann 2017). Dabei wurden Umkehrpotentiale für GABA-induzierte Ströme von -72,5 mV und für Muscimol-induzierte Ströme von -77,7 mV erhoben (Delchmann 2017). Im Schichtenvergleich sind die Umkehrpotentiale von GABA und Muscimol für L2/3 und L5 MC nahezu identisch. Des Weiteren liegen die ermittelten Werte nahe dem durch die Nernstgleichung berechneten Gleichgewichtspotential für Chloridionen (-72,4 mV)

(Kap. 2.10). Deshalb lässt sich vermuten, dass die durch GABA_A-Rezeptoren vermittelten Ströme sowohl für L2/3 MC als auch für L5 MC hauptsächlich auf Chloridionen basieren. Die leicht negativen Umkehrpotentiale für Muscimol sind vermutlich auf die höhere Affinität von Muscimol zum GABA_A-Rezeptor und der damit einhergehenden längeren Öffnung zurückzuführen.

Bei näherer Betrachtung der durchgeführten Experimente konnte bei aller Gleichheit in den ermittelten Umkehrpotential auch ein Unterschied zwischen den GABA- und Muscimol-induzierten Strömen an den L2/3 und L5 MC festgestellt werden. In einer vorausgegangenen Arbeit war bei einem Haltepotential von -70 mV für GABA- und Muscimol-induzierte Ströme ein biphasischer Verlauf zu beobachten, welcher durch einen schnellen auswärtsgerichteten gefolgt von einem langsameren einwärtsgerichteten Ionenstrom beschrieben wird (Delchmann 2017). Für L5 MC konnte bei einem Haltepotential um das Umkehrpotential von GABA und Muscimol in keiner Messung biphasische Ströme beobachtet werden (Abb. 8), was möglicherweise auf eine geringere Leitfähigkeit der Ionenkanäle für Hydrogencarbonationen zurückzuführen ist. GABA_A-Rezeptoren besitzen eine Leitfähigkeit für Chlorid- und Bicarbonationen, wobei die beiden Ionen ein entgegengesetztes Gleichgewichtspotential im Bezug zum Haltepotential der Zelle von -70 mV haben (Witte 2009). Sie können somit für den beobachteten einwärts- bzw. auswärtsgerichteten Ionenstrom verantwortlich sein. Die durch GABA_A-Rezeptoren geöffneten Kanäle sind zu ca. 80 % für Chloridionen und zu ca. 20 % für Bicarbonat- bzw. Hydrogencarbonationen permeabel (Bormann et al. 1987b; Kaila 1994; Kaila et al. 1997). Mehrere Untersuchungen konnten eine Beteiligung von Bicarbonat an GABA- induzierten Strömen bestätigen (Staley et al. 1995; Backus et al. 1998). Aufgrund der höheren Permeabilität für Chloridionen wird bei biphasischen Strömen die erste Phase der Membranströme durch schnell einströmende Chloridionen verursacht. Die länger andauernde zweite Phase wird ausströmenden Bicarbonationen zugeschrieben (Witte 2009). Durch eine kürzere GABA-Applikation kommt es lediglich zu einem Einstrom von Chloridionen, da sich der Kanal vor einem Ausstrom der Bicarbonationen schließt. Die Experimente dieser Arbeit und die von Delchmann 2017 wurden unter weitestgehend identischen Bedingungen durchgeführt. Die Agonisten GABA und Muscimol wurden per Druckapplikation (5 ms und 5 psi) der abgeleiteten Zelle zugeführt. Hierbei wurde die Applikationspipette mit einem Abstand von 30-40 µm zum Zellsoma positioniert. Einen Unterschied in der Applikationsdauer gab es folglich nicht. Muscimol wurde in beiden Fällen in einer Konzentration von 100 µM appliziert.

GABA hingegen wurde in den Experimenten von Delchmann in einer Konzentration von 1 mM appliziert, während in dieser Arbeit mit einer Konzentration von 100 μ M gearbeitet wurde. In den Experimenten von Delchmann sind die biphasischen Ströme bei der Applikation von GABA (1 mM) stärker ausgeprägt als bei der Applikation von Muscimol (100 μ M). Durch die höhere Konzentration von GABA ist es möglich, dass das Pharmakon länger am GABA_A-Rezeptor gebunden ist, wodurch eine längere Öffnung der Ionenkanäle hervorgerufen wird. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die ausgeprägten biphasischen Ströme. Da die Applikation von Muscimol (100 μ M) jedoch auch für L2/3 MC biphasische Ströme hervorruft und die Experimente dieser Arbeit für L5 MC rein monophasische Ionenströme aufzeigen, ist ein schichtspezifischer struktureller Unterschied der GABA_A-Rezeptoren zu vermuten. Möglicherweise liegt eine unterschiedliche Kombination der fünf variablen Untereinheiten im GABA_A-Rezeptor vor, da dies Auswirkungen auf die Kanalleitfähigkeit haben kann (Angelotti und Macdonald 1993).

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die GABA_A-Rezeptor vermittelten Ströme an den L5 MC in somatosensorischen Kortex hauptsächlich auf einen Einstrom von Chloridionen zurückzuführen sind. Ein Einfluss von Bicarbonationen kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

4.3.3 Inhibitorische Afferenzen auf Martinotti-Zellen

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurden die inhibitorischen Eingänge auf L5 MC mittels elektrischer Stimulation untersucht. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob auf den präsynaptischen inhibitorischen Terminalen GABA_B-Rezeptoren exprimiert werden und welchen Einfluss diese auf die synaptische Transmission haben.

In den Experimenten wurden die präsynaptischen Fasern mit Hilfe einer bipolaren Elektrode stimuliert und die ausgelösten postsynaptischen inhibitorischen Ströme unter Blockade der glutamatergen Transmission an den MC gemessen. Dass es sich dabei um GABA_A-Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme handelt, konnte durch eine vollständige Blockade mittels GABAzin gezeigt werden (Abb. 9). Damit werden außerdem die Ergebnisse der vorangegangenen Druckapplikationsstudien bestätigt (Kap. 3.2 und 3.3). Zum Nachweis von GABA_B-Rezeptoren auf den präsynaptischen

inhibitorischen Terminalen wurde der spezifische GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen, sowie nachfolgend der GABA_B-Rezeptor-Antagonist CGP35348, eingewaschen (Kap. 3.4, Abb. 10). Durch den Einfluss von Baclofen ist ein Rückgang ($43,1 \pm 3,8 \%$) der eIPSC Amplitude im Vergleich zu der Referenzmessung zu beobachten. Wird der baclofenhaltigen Lösung CGP hinzugefügt, kommt es zu einem Wiederanstieg der Amplitude auf $89,0 \pm 10,6 \%$ (Abb. 10).

Die beobachteten Reaktionen der abgeleiteten Zellen lässt sich auf eine präsynaptische Aktivierung bzw. Blockade von GABA_B-Rezeptoren an den inhibitorischen Terminalen durch Baclofen bzw. CGP35348 zurückführen. Somit konnten erstmals präsynaptische GABA_B-Rezeptoren auf den inhibitorischen Eingängen der L5 MC nachgewiesen werden. Der Versuch wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe in analoger Art und Weise an L2/3 MC durchgeführt (Delchmann 2017). Für L2/3 MC konnte unter Baclofen eine geringfügig stärkere Reduktion ($33,5 \pm 16,3 \%$) der eIPSC Amplituden beobachtet werden. Dieser Effekt war durch einen Einwasch von CGP nahezu vollständig ($82,4 \pm 33,5 \%$) reversibel (Delchmann 2017). Die reduzierte Amplitude unter Baclofen ist durch eine Inaktivierung von präsynaptischen Ca⁺-Kanälen in den inhibitorischen Terminalen durch $\beta\gamma$ -Untereinheit des GABA_B-Rezeptors zurückzuführen (Olsen et al. 1991; Bowery et al. 2002). Ein verminderter Einstrom von Kalziumionen in die Präsynapse führt zu einer geringeren Vesikelausschüttung und demzufolge zu kleineren postsynaptischen Strömen. Die Relevanz des Kalziumeinstromes wurde durch die Reduktion der extrazellulären Kalziumkonzentration in Experimenten dieser Arbeit bereits belegt (Abb. A2). Da sowohl in dieser Arbeit als auch in den Experimenten von Delchmann 2017 mit einer 2 mM Ca²⁺-haltigen ACSF-Lösung gearbeitet wurde, könnte der schichtspezifische geringere Unterschied in den eIPSC Amplituden unter Baclofen durch zelluläre Mechanismen hervorgerufen werden. Eine Möglichkeit wäre, dass die L5 Terminalen auf den MC über einen kleineren Vesikelpool verfügen oder eine geringere Dichte an GABA_B-Rezeptoren aufweisen. Ebenfalls kann nur darüber gemutmaßt werden, auf welchen Terminalen der auf die MC projizierenden GABAergen Interneuronen die GABA_B-Rezeptoren lokalisiert sind. Aus Untersuchungen der Arbeitsgruppe und anderen Publikationen ist bekannt, dass L2/3 MC des Barrel-Kortex inhibitorische Afferenzen überwiegend von VIP-Zellen (Lee et al. 2013; Staiger et al. 2015) und PV-Zellen (Staiger et al. 2015; Walker 2016) erhalten. Im Hippocampus erhalten MC inhibitorische Eingänge von PV-Zellen (Booker et al. 2013), im visuellen (Fu et al. 2014), auditiven und präfrontalen (Pi et al. 2013) Kortex projizieren

überwiegend VIP-Zellen auf MC. Welche Zellen die GABA_B-Rezeptoren exprimieren ist durch den Versuchsaufbau dieser Arbeit nicht nachzuweisen und sollte in nachfolgenden optogenetischen Studien unter Differenzierung der Eingänge untersucht werden.

Bereits in anderen Regionen des zentralen Nervensystems wurden präsynaptische GABA_B-Rezeptoren und deren Effekt auf die Neurotransmission nachgewiesen: Im Hippocampus sind präsynaptische GABA_B-Rezeptoren auf exzitatorischen afferenten Terminalen bekannt (Isaacson et al. 1993), im Hypothalamus reduzieren GABA_B-Rezeptoren eIPSCs in Neuronen des magnozellularen Systems der Ratte (Mouginot et al. 1998), im Thalamus wurden GABAerge Neuronen des Nucleus reticularis der Ratte untersucht und präsynaptische GABA_B-Rezeptoren nachgewiesen (Ulrich und Huguenard 1996). Im somatosensorischen Kortex konnte an Hirnschnitten der Ratte gezeigt werden, dass intrakortikale Terminalen von Pyramidenzellen der Schicht 3 eine präsynaptische Inhibitionen erhalten, welche durch GABA_B-Rezeptoren vermittelt werden (Sato et al. 2013). Porter und Nieves konnten an exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen der Schicht 4 des Barrel-Kortex eine Reduktion der thalamokortikalen Eingänge, bedingt durch eine Aktivierung präsynaptischer GABA_B-Rezeptoren, feststellen (Porter und Nieves 2004). Es zeigt sich, dass eine Modulation über präsynaptische GABA_B-Rezeptoren im Kortex weit verbreitet ist und unabhängig der Art der Terminalen und Typ von postsynaptischer Zelle vorkommt. Wobei deren Auswirkung auf die Informationsverarbeitung von Sinneseindrücken, insbesondere von taktilen Reizen, bisher gänzlich unbekannt sind.

4.3.4 GABA-vermittelte Modulation der Kurzzeitplastizität

In den Experimenten mit Stimulation der präsynaptischen inhibitorischen Fasern kam neben der Einzel- auch Mehrfachstimulation zum Einsatz. Die Mehrfachstimulation wird verwendet, um die Kurzzeitplastizität in der synaptischen Neurotransmission zu untersuchen. Dabei hat eine Depression oder Potenzierung in der Kurzzeitplastizität eine weitreichende Bedeutung für das nachgeschaltete postsynaptische Neuron. In den durchgeführten Versuchen wurde mittels Mehrfachstimulation ermittelt, ob inhibitorische Synapsen auf MC einen Effekt in der Kurzzeitplastizität zeigen und ob der spezifische GABA_B-Rezeptor-Agonist Baclofen und der -Antagonist CGP35348 Einfluss

auf die synaptische Kurzzeitplastizität haben (Kap. 3.5). Es konnte gezeigt werden, dass die inhibitorischen Synapsen an den L5 MC eine frequenzabhängige Kurzzeitplastizität in Form einer Depression aufweisen (Abb. A3+A4). Die beobachtete Kurzzeit-Depression tritt bereits beim zweiten Stimulus auf und nimmt stetig zu, bis zwischen dem 6.-10. Stimulus eine Plateauphase erreicht wird. Eine höhere Stimulationsfrequenz geht mit einer höheren Depressionswirkung einher, deren Zunahme jedoch nur zwischen 1 und 5 Hz signifikant ist. Die inhibitorischen Fasern zeigen von 5 bis 40 Hz eine nahezu konstante Kurzzeitdepression. Es ist bekannt, dass Depressionen aus der Feedback-Aktivierung präsynaptischer Rezeptoren entstehen können (Zucker und Regehr 2002). Es wäre folglich möglich, dass die Kurzzeit-Depression auf einer synaptischen Autoinhibition basiert. Durch eine repetitive Stimulation der präsynaptischen Zelle werden möglicherweise große Mengen an Transmittern in den synaptischen Spalt freigesetzt und gelangen per Diffusion an die extrasynaptisch bzw. an die nachgewiesenen präsynaptischen lokalisierten GABA_B-Rezeptoren. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu einer reduzierten Transmitterausschüttung, welche sich in einer Reduktion der eIPSCs manifestiert (Kap. 4.3.3). Der Effekt der Autoinhibition über GABA_B-Rezeptoren wurde bereits bei CCK-positiven Korbzellen im Hippocampus der Maus beobachtet (Dugladze et al. 2013). Um die Möglichkeit einer Autoinhibition an der präsynaptischen inhibitorischen Terminalien der L5 MC zu überprüfen, wurde der spezifische GABA_B-Rezeptor-Antagonisten CGP35348 eingewaschen und die repetitive Stimulation erneut durchgeführt. Die Messungen unter CGP zeigen jedoch weder in der Amplitude der IPSCs noch in der synaptischen Kurzzeitplastizität im Vergleich zu den Kontrollmessungen unter ACSF einen statistisch signifikanten Unterschied auf (Abb. A4). Hiermit ist die Vermutung der Autoinhibition unter repetitiver Stimulation an den inhibitorischen Terminalen auf L5 MC widerlegt. Depressionen werden in der Regel auf die Abnahme des Pools leicht freisetzbarer Vesikel zurückgeführt (Zucker und Regehr 2002). Somit wäre eine mögliche Erklärung für die beobachtete Kurzzeitdepression unter Mehrfachstimulation eine geringere synaptische Transmitterausschüttung infolge eines geringen Ca²⁺-Einstroms oder einer zu langsamen Wiederaufnahme (*uptake*) der Neurotransmitter in die Präsynapse. Um zu untersuchen, inwieweit die Vesikelpoolgröße eine Rolle spielt, wurden die Versuche ebenfalls unter dem spezifischen GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen durchgeführt. Wie bereits in der Einzelstimulation gezeigt, verringert Baclofen durch die Aktivierung präsynaptischer GABA_B-Rezeptoren die Vesikelausschüttung und demzufolge die Amplitude der

postsynaptischen eIPSC. Dasselbe ist unter Baclofen bei der Mehrfachstimulation zu beobachten (Abb. A3), was für jede einzelne der zehn Stimulationen zutrifft. Unter Baclofen weist die synaptische Kurzzeitplastizität die gleiche Stärke wie unter Kontrollbedingung auf (Abb. A3). Demzufolge kann die Größe des Vesikelpools nicht der Grund für die Depressionswirkung sein, da unter Baclofen deutlich weniger Transmitter freigesetzt werden, als unter Kontrollbedingungen. Es ist zu vermuten, dass ein verringerter Ca^{2+} -Einstrom die Ursache für die depressive Kurzzeitplastizität an den inhibitorischen Terminalen zu den L5 MC ist.

Die Experimente zur Kurzzeitplastizität wurden in vergleichbarer Form zuvor in der Arbeitsgruppe für L2/3 MC durchgeführt. Auch hier konnte unter CGP keine Autoinhibitionswirkung der präsynaptischen Terminale festgestellt werden (Badura 2016). Ein markanter Unterschied im Verhalten der L2/3 und L5 MC ist bei der Mehrfachstimulation unter Baclofen zu sehen. Laut Delchmann 2017 kommt es bei L2/3 MC durch den Einwasch von Baclofen zu einer signifikant verringerten depressiven Kurzzeitplastizität der postsynaptischen Ströme. Als Grund hierfür wurde eine geringere Entleerung des Vesikelpools unter Baclofen angenommen (Delchmann 2017). Dieser Effekt kann hingegen bei den Experimenten dieser Arbeit für L5 MC nicht beobachtet werden. Für das unterschiedliche Verhalten in der Kurzzeitplastizität der L2/3 und L5 MC unter Baclofen kommen verschiedene Gründe in Frage. Zum einen hat Baclofen an den inhibitorischen Terminalen der L5 MC eine geringere Wirkung, so dass die reduzierte Transmitterausschüttung immer noch zu einer Entleerung des Vesikelpools unter Mehrfachstimulation führt. Jedoch liegt der Unterschied in der Baclofenwirkung lediglich bei 19 % und es ist anzunehmen, dass dies keine relevanten Auswirkungen auf den Vesikelpool hat. Zum anderen können die Größe des Vesikelpools zwischen den L5 und L2/3 Terminalen unterschiedlich sein. Für die inhibitorischen Eingänge auf die L5 MC würde dies einen geringeren Vesikelpool nach sich ziehen, der sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Baclofen bei der Mehrfachstimulation entleert wird. Dagegen verfügen die inhibitorischen Terminalen in der Schicht 2/3 auf die MC über einen größeren Pool, der zwar unter Kontrollbedingungen entleert wird, aber nicht bei einer verringerten Transmitterausschüttung unter Baclofen.

4.4 Physiologische Relevanz und Ausblick

In dieser Arbeit wurden *In-vitro*-Versuche an Martinotti-Zellen im Barrel-Kortex der Maus durchgeführt. *In-vitro*-Versuche stellen eine gute Möglichkeit dar, um spezifische Anteile aus dem komplexen Zentralnervensystem im Hinblick auf bestimmte Fragestellungen zu untersuchen. Insbesondere für Rezeptoranalysen sind *In-vitro*-Versuche die Methode der Wahl. Mittels Pharmakologie (Agonisten/Antagonisten) sowie durch Modifikation der intra- und/oder extrazellulären Ionenkonzentration können ganz konkrete Rückschlüsse auf die Expression von Rezeptoren und die Leitfähigkeit der mit ihnen gekoppelten Kanäle auf der postsynaptischen Zellmembran getroffen werden. Ebenso wurden Konnektivitätsstudien in umfangreichem Maße durch *In-vitro*-Untersuchungen in kortikalen Hirnschnitten durchgeführt. Hierbei können durch das Abtrennen von Neuronen während der Präparation grundlegende Eigenschaften der synaptischen Transmission modifiziert werden (Jouhanneau et al. 2018). Dadurch lassen sich insbesondere die geringere Netzwerkaktivität und hyperpolarisierende Membranpotentiale unter *In-vitro*-Bedingungen erklären (Gentet et al. 2012; Jouhanneau et al. 2018). Trotz dieser Einschränkungen konnten bisher überwiegend Übereinstimmungen für *In-vivo*- und *In-vitro*-Ableitungen bei der Konnektivität von GABAergen Neuronen gefunden werden (Pala und Petersen 2015; Jouhanneau et al. 2018). So beobachteten Jouhanneau und Kollegen (2018) eine Konnektivität zwischen gleichartigen GABAergen Interneuronen von 60,6 % für PV-Neuronen und 47,1 % für SST-Neuronen unter *In-vivo*-Bedingungen (Jouhanneau et al. 2018). *In-vitro*-Studien im visuellen Kortex von Mäusen zeigten ähnliche Konnektivitätsraten innerhalb und zwischen den einzelnen Subtypen inhibitorischer Neuronen (Pfeffer et al. 2013; Jiang et al. 2015). Folglich ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit nachgewiesenen postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren und präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren an den Martinotti-Zellen auch unter *In-vivo*-Bedingungen von Relevanz sind. Nichtsdestotrotz sind bis heute nur wenige Informationen über kortikale monosynaptische inhibitorische Transmission unter *In-vivo*-Konditionen vorhanden (Jouhanneau et al. 2018). Folglich empfiehlt es sich in weiteren Studien die Übertragbarkeit der Ergebnisse von *Patch-clamp-in-vitro*-Untersuchungen mittels *In-vivo*-Studien zu verifizieren.

Vergleicht man in dieser Arbeit erhobene Daten zu Martinotti-Zellen der Schicht 2/3 und 5 mit ähnlichen, bereits durchgeführten Experimenten innerhalb der Arbeitsgruppe, so lassen sich im Wesentlichen zwei Unterschiede feststellen: In dieser Arbeit konnten (I) keine extrasynaptisch gelegenen GABA_B-Rezeptoren an L5 MC nachgewiesen werden. (II) Präsynaptische GABA_B-Rezeptoren haben keinen Einfluss auf die Kurzzeitplastizität der inhibitorischen Transmission.

Postsynaptische GABA_B-Rezeptoren auf der Membran von Martinotti-Zellen wurden zuvor unter analogen Experimentbedingungen ebenfalls für die Schicht 2/3 ausgeschlossen (Delchmann 2017). Allerdings konnte mit Hilfe der Langzeitapplikation (5-10 min) des GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen extrasynaptisch gelegene GABA_B-Rezeptoren sowohl auf MC der Schicht 2/3 als auch für Schicht 5 nachgewiesen werden (Badura 2016). Allerdings zeigten nur 3 von 6 MC eine Hyperpolarisation infolge einer Baclofen Applikation. Zur Überprüfung der Existenz von postsynaptischen GABA_B-Rezeptoren auf L5 MC bedarf es noch weiterer *Whole-cell-patch-clamp*-Untersuchungen in Kombination mit einer Langzeitapplikation von Baclofen. Um herauszufinden, ob es sich um synaptische oder extrasynaptische Rezeptoren handelt, wäre eine elektronenmikroskopische Untersuchung der jeweiligen Zellabschnitte nötig.

Postsynaptische GABA_B-Rezeptoren sind in der Lage über eine Erhöhung der Kalium-Leitfähigkeit das Ruhemembranpotential zu hyperpolarisieren und dadurch die Ausbildung bzw. Weiterleitung von EPSP am Dendriten zu hemmen. Somit könnten wirkungsvoll Dendritenabschnitte für längere Zeit gehemmt und aus dem Netzwerk genommen werden. Der Effekt von aktivierten postsynaptischen GABA_B-Rezeptoren in einem definierten kortikalen Netzwerk (insbesondere von GABAergen Interneuronen) ist nur unzureichend beschrieben und unter *In-vivo*-Bedingungen gänzlich unbekannt. Hier könnten *In-vitro-patch-clamp*-Ableitungen mit Sicherheit erste Anhaltspunkte liefern, mit dem Ziel die Quelle des extrazellulären GABA's zu identifizieren. Es ist bekannt, dass neurogliaforme Zellen den Neurotransmitter GABA auch als Volumentransmission in den Extrazellulärraum abgeben und darüber die extrasynaptischen GABA_B-Rezeptoren an den MC aktivieren könnten. Die präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren an den inhibitorischen Terminalen an den MC der Schicht 5 haben im Gegensatz zu Schicht 2/3 keinen Einfluss auf die Kurzzeitplastizität der inhibitorischen Transmission. Unter dem Einfluss von Baclofen ist die depressive Wirkung in der Kurzzeitplastizität von IPSC signifikant geringer als unter Kontrollbedingungen (Delchmann 2017). Die Ursache hierfür könnte in einem kleineren Vesikelpool der inhibitorischen Terminalen auf

Schicht 5 MC liegen. Welche Konsequenzen dies auf die inhibitorische synaptische Transmission zwischen zwei Zellen hat, kann zum jetzigen Stand nicht ermittelt werden. Mittels der verwendeten elektrischen Stimulation wurden in dieser Arbeit in mehr als einem Axon Aktionspotentiale ausgelöst, so dass die gemessenen eIPSC durch mehrere präsynaptische Zellen hervorgerufen werden. In Frage kommen hierfür sowohl die VIP- als auch die PV-exprimierenden Interneuronen (Walker et al. 2016). Um die Größe des Vesikelpools der inhibitorischen Terminalen zu untersuchen, sind weitere Paarableitungen in der Schicht 5 nötig. Für die Schicht 2/3 MC liegen die Daten insbesondere zur Kurzzeitplastizität bereits vor und können als Referenz für die Schicht 5 MC dienen (Walker et al. 2016).

Es besteht ein großes Interesse daran, die Funktion kortikaler Interneurone umfassend zu klären, da eine Fehlfunktion von diesen im Kontext mit bestimmten neurologischen Krankheiten wie Epilepsie, Schizophrenie oder Angststörung gesehen werden (Glausier und Lewis 2011; Tai et al. 2014). Um die Ursachen pathologischer Verhaltensmuster von Interneuronen in ihrer Gänze zu klären, muss zunächst die Physiologie neuronaler Netzwerke, insbesondere von GABAergen Interneuronen, erschlossen werden. Um dies zu erreichen, bedarf es noch weiterer Untersuchungen.

5 Zusammenfassung

Inhibitorische Interneurone besitzen trotz ihrer geringen Zahl eine bedeutende Rolle in der neuronalen Informationsverarbeitung im somatosensorischen Kortex (Walker 2016; Feldmeyer et al. 2018). Des Weiteren werden auftretende untypische Verhaltensmuster GABAerger Neurone mit diversen neurologischen Krankheiten wie Epilepsie, Schizophrenie oder Angststörung in Zusammenhang gebracht (Glausier und Lewis 2011; Tai et al. 2014) und rücken deshalb zunehmend in den Fokus der medizinischen und neurobiologischen Forschung. Martinotti-Zellen (MC) gehören zu den Somatostatin-exprimierenden inhibitorischen GABAergen Interneuronen. Ihnen wird eine Schlüsselrolle in der Verarbeitung taktiler Informationen zugesprochen. Außerdem sind sie nachweislich an der Empfindungsverarbeitung und insbesondere an Lernvorgängen beteiligt. MC sind in ein komplexes synaptisches Netzwerk benachbarter exzitatorischer und inhibitorischer Neurone eingebunden.

Das Ziel dieser Arbeit war die elektrophysiologische Charakterisierung GABA-Rezeptor-vermittelter Inhibition an Martinotti-Zellen der Schicht 5 des Barrel-Kortex. Mit Hilfe von *Whole-cell-patch-clamp*-Ableitungen wurden postsynaptische GABA-Rezeptoren auf den MC untersucht. Es sollte nachgewiesen werden, ob metabotrope GABA_B-Rezeptoren auf den inhibitorischen präsynaptischen Fasern, welche auf MC projizieren, vorhanden sind. Die *Patch-clamp*-Methode wurde in dieser Arbeit mit der Druckapplikation für das Verabreichen von spezifischen Agonisten der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren in Kombination mit der Badapplikation spezifischer Antagonisten, sowie mit der elektrischen Stimulation präsynaptischer Fasern kombiniert. Die Versuche wurden *in vitro* an thalamokortikalen Hirnschnitten von GIN-Mäusen durchgeführt. Auf der postsynaptischen Membran von Schicht 5 MC des Barrel-Kortex wurde die Expression von GABA_A-Rezeptoren nachgewiesen und deren Beteiligung an der inhibitorischen synaptischen Neurotransmission auf die MC bestätigt. Die dabei induzierten Ströme basieren hauptsächlich auf einem Einstrom von Chloridionen. Dagegen konnte eine Beteiligung von synaptisch lokalisierten GABA_B-Rezeptoren auf den MC bei einer Kurzzeitstimulation ausgeschlossen werden. Das Ausmaß der Beeinflussung der MC durch extrasynaptisch vorkommende GABA_B-Rezeptoren bei langanhaltender Stimulation bedarf weiterer Untersuchungen. Mit Hilfe der elektrischen Stimulation wurden inhibitorische postsynaptische Ströme (eIPSC) an den MC ausgelöst.

Unter dem GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen kommt es zu einer signifikanten Reduktion der eIPSC Amplituden, was als Nachweis für präsynaptisch lokalisierte GABA_B-Rezeptoren auf den inhibitorischen Terminalen gilt. Die auf die L5 MC projizierenden inhibitorischen Fasern weisen eine frequenzabhängige Kurzzeitplastizität in Form einer Depression auf. Im Unterschied zu der inhibitorischen synaptischen Transmission auf die Schicht 2/3 MC haben die präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren an den Terminalen auf die Schicht 5 MC keinen Einfluss auf die Kurzzeitplastizität, was auf einen kleineren Vesikelpool dieser Terminalen zurückzuführen sein könnte.

Martinotti-Zellen sind Bestandteil eines komplexen neuronalen Netzwerkes, wobei die verschiedenen zellulären Mechanismen der synaptischen Transmission, insbesondere durch Neuromodulatoren oder metabotrope Rezeptoren, zum Teil noch ungeklärt sind. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse leisten einen Beitrag zum besseren Verständnis von inhibitorischen kortikalen Schaltkreisen.

6 Anhang

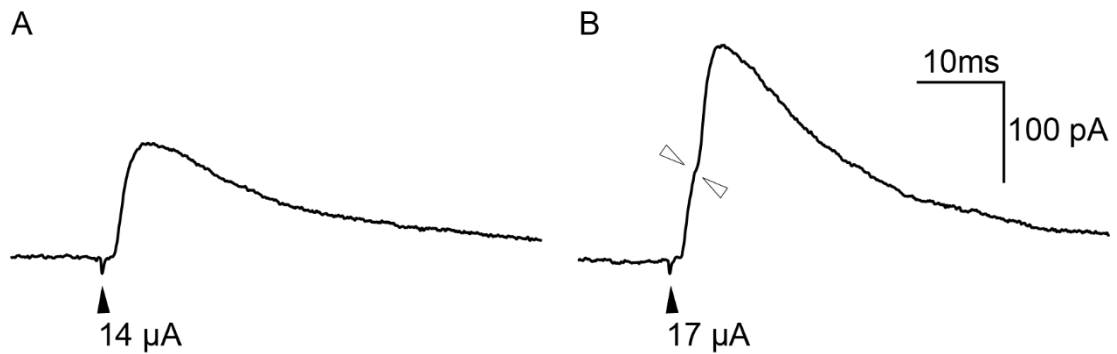


Abbildung A1: Richtige Positionierung der bipolaren Stimulationselektrode bei der elektrischen Stimulation

Durch die bipolare Stimulationselektrode wurden präsynaptische inhibitorische Fasern gereizt. Dargestellt sind postsynaptisch eIPSC an L5 MC. (A) Es sind ein stetiger Anstieg als auch Abfall der Amplitude zu erkennen. Dies weist auf die präsynaptische Stimulation weniger inhibitorischer Fasern hin. (B) Durch Δ markiert ist ein biphasischer Anstieg der Amplitude zu erkennen, was auf die Stimulation mehrerer Eingänge hindeutet. Derartige Messungen wurden nicht verwendet und es wurde die Position der Stimulationselektrode überprüft.

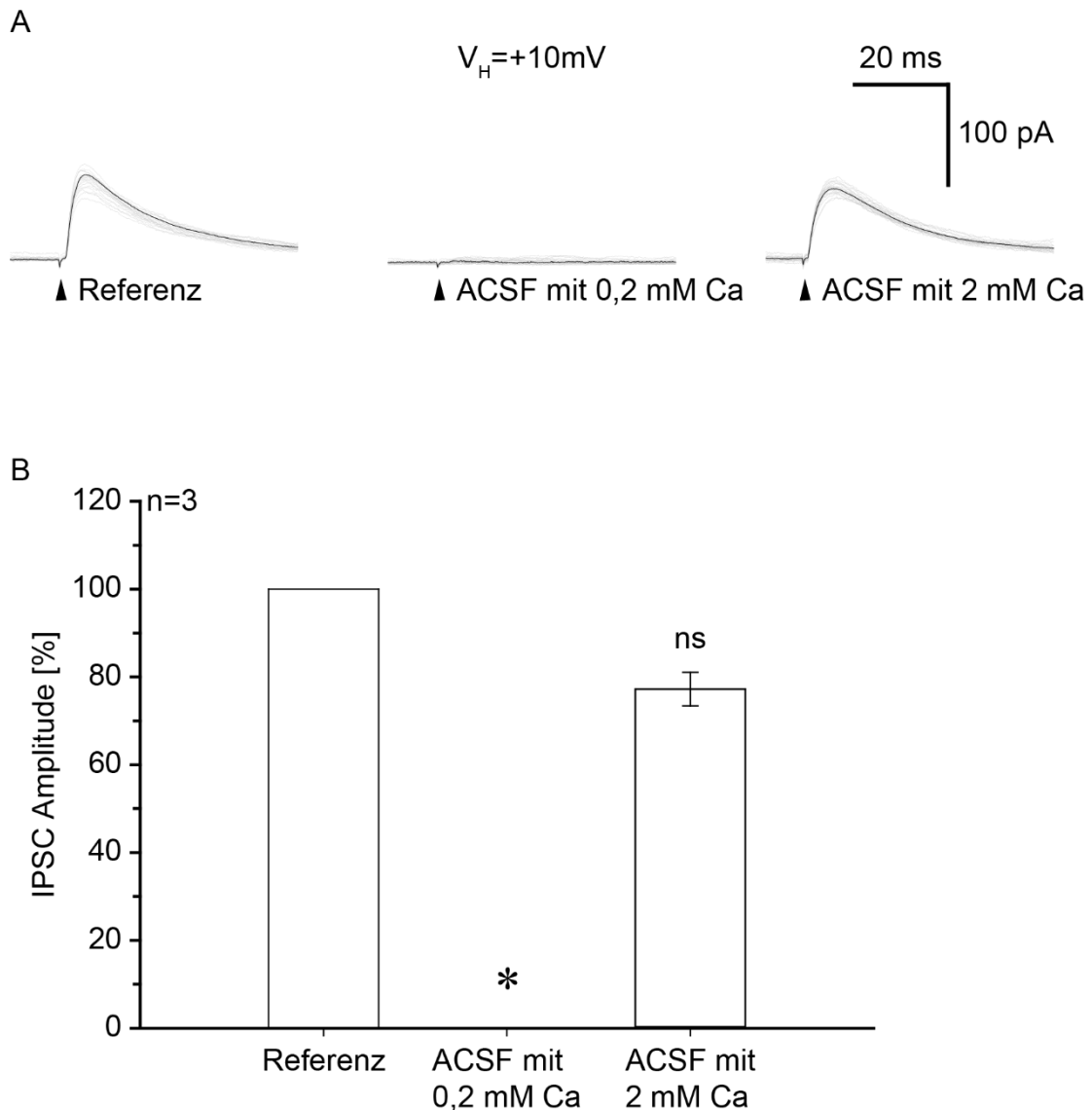


Abbildung A2: Abhängigkeit der elektrisch induzierten postsynaptischen Ströme von der extrazellulären Kalziumkonzentration

(A) Die postsynaptischen inhibitorischen Ströme (eIPSC) wurden durch lokale Feldstimulation (14 μA) an einer L5 MC bei einem Haltepotential von +10 mV ausgelöst. Die schwarzen Spuren zeigen die mittlere Antwort aus 20 Einzelstimulationen (graue Spuren). Der Auswasch der normalen 2 mM Ca^{2+} -haltigen ACSF-Lösung mit einer 0.2 mM Ca^{2+} -haltigen ACSF-Lösung für eine Dauer von 20 min führte zu einer Reduktion der Amplitude der eIPSC auf 0 % im Vergleich zur Referenz. Durch den Einwasch der ursprünglichen ACSF-Lösung für eine Dauer von 20 min war der Effekt nahezu reversibel und die Amplitude ging auf 82,2 % der Referenz zurück. Der Stimulationsbeginn ist durch eine schwarze Pfeilspitze gekennzeichnet.

(B) Das Balkendiagramm stellt die Amplitudenstärke der eIPSC (Mittelwert \pm SEM) von 3 L5 MC unter Kontrollbedingungen (2 mM Ca^{2+} -haltige ACSF-Lösung) (links), nach Einwasch einer 0.2 mM Ca^{2+} -haltigen ACSF-Lösung (Mitte) und nach Auswasch mit der normalen 2 mM Ca^{2+} -haltigen ACSF-Lösung (rechts) dar. Mit reduzierter Ca^{2+} -Konzentration lässt sich ein Rückgang der Amplitude auf 0 % beobachten. Im nachfolgenden Auswasch mittels normaler 2 mM Ca^{2+} -haltige ACSF-Lösung erreicht die Amplitude im Mittel 77,2 % der Referenz.

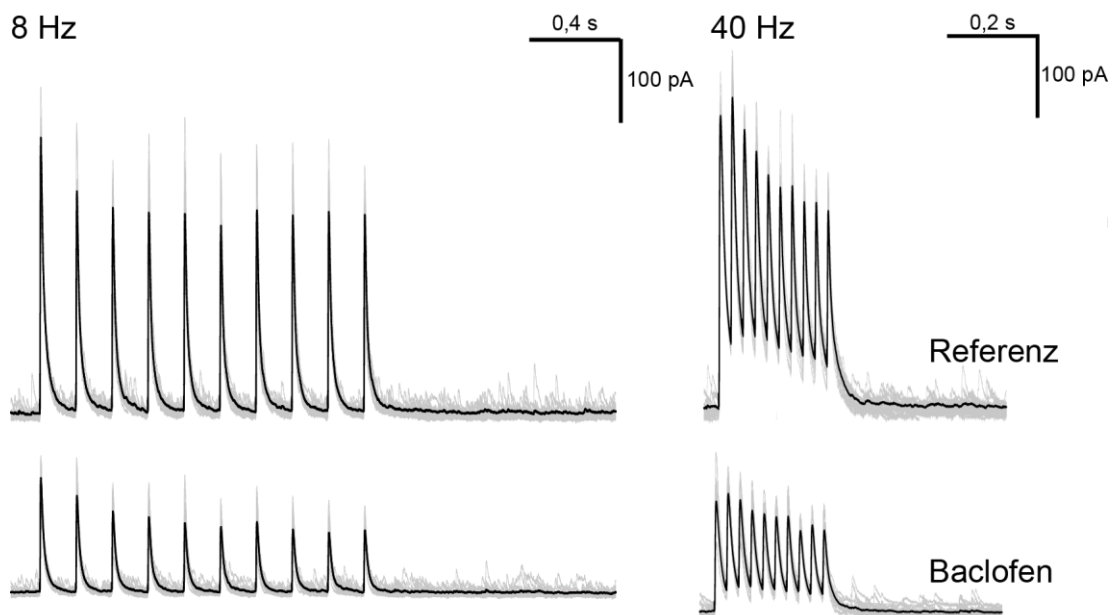
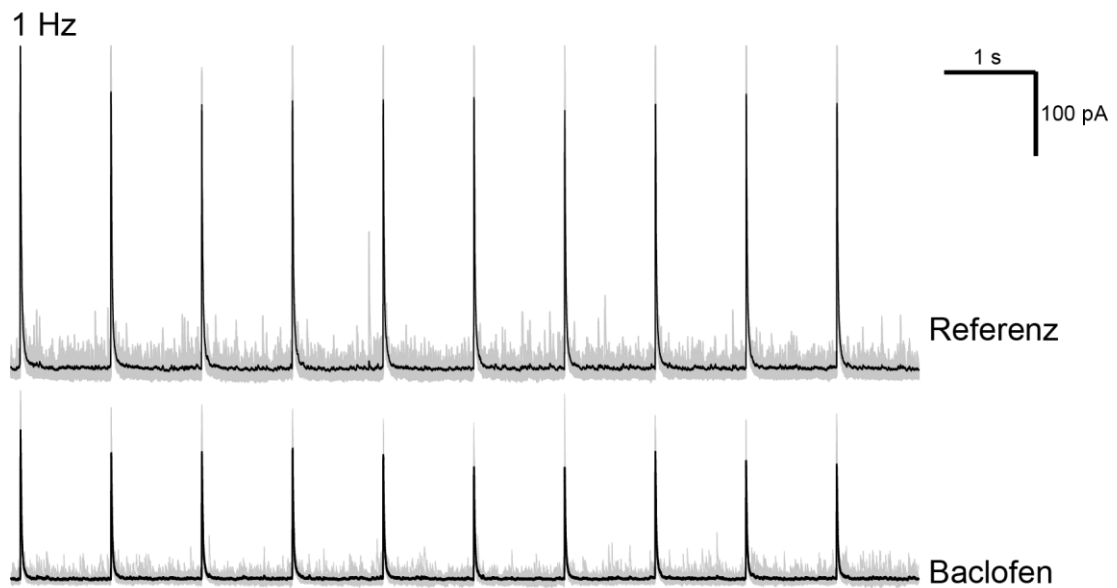


Abbildung A3: Synaptische Kurzzeitplastizität von eIPSC bei Mehrfach-Stimulation unter Baclofen

Die evozierten inhibitorischen postsynaptischen Ströme (eIPSC) wurden durch 10 repetitive Mehrfachstimulationen ($17 \mu\text{A}$) mit den Frequenzen 1, 8 und 40 Hz an einer L5 MC bei einem Haltepotential von $+10 \text{ mV}$ unter ACSF (Referenz) und unter $10 \mu\text{M}$ Baclofen ausgelöst. Die schwarzen Spuren zeigen die mittlere Antwort aus 20 Einzelstimulationen (graue Spuren). Für alle drei Frequenzen ist unter Baclofen eine Reduktion der Amplitude um ca. 50 % im Vergleich zur Referenzmessung zu beobachten.

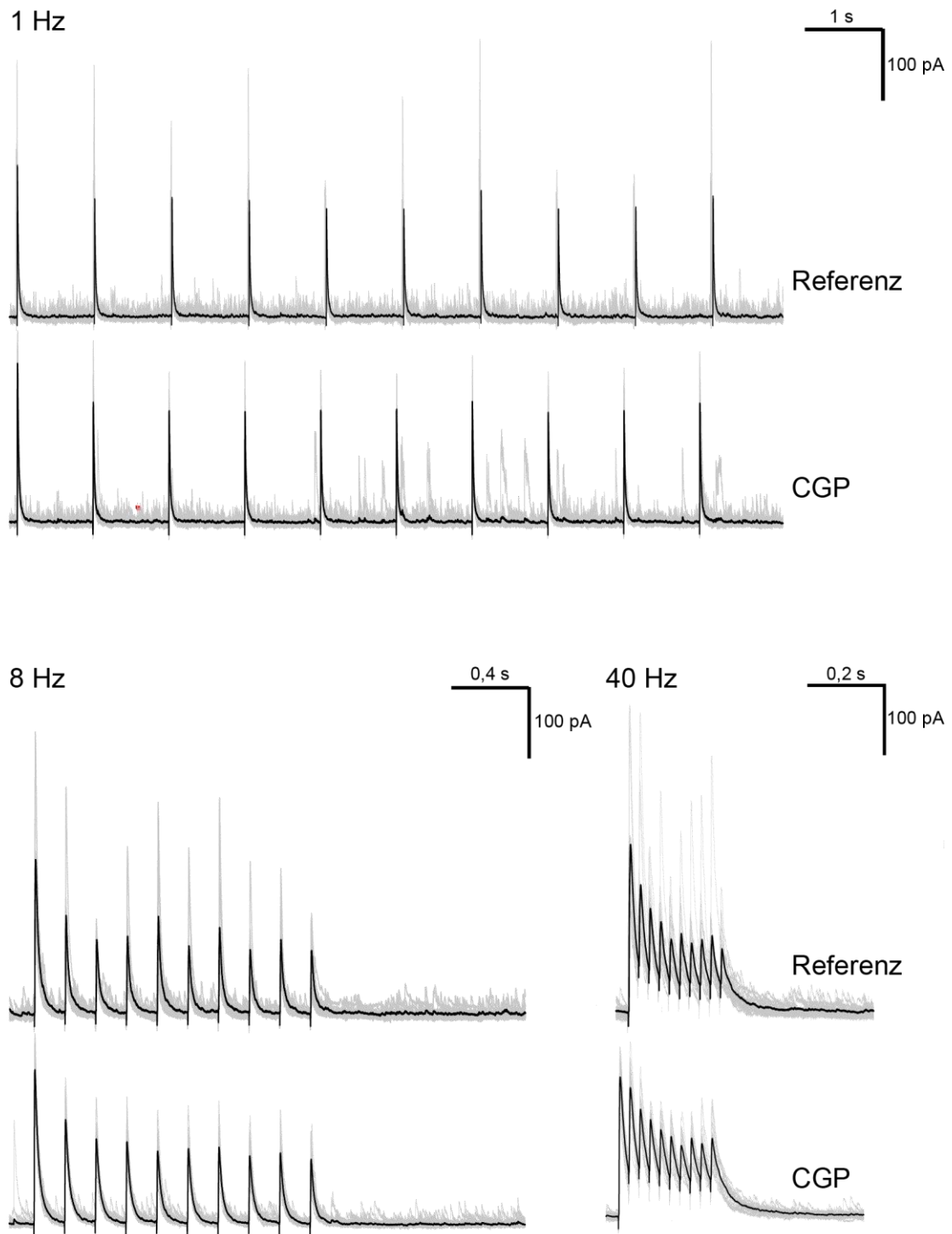


Abbildung A4: Synaptische Kurzzeitplastizität von eIPSC bei Mehrfach-Stimulation unter CGP

Die evozierten inhibitorischen postsynaptischen Ströme (eIPSC) wurden durch 10 repetitive Mehrfachstimulationen ($9 \mu\text{A}$) mit den Frequenzen 1, 8 und 40 Hz an einer L5 MC bei einem Haltepotential von +10 mV unter ACSF (Referenz) und unter $10 \mu\text{M}$ CGP35348 ausgelöst. Die schwarze Spuren zeigen die mittlere Antwort aus 20 Einzelstimulationen (graue Spuren). Für alle drei Frequenzen ist unter CGP35348 keine Veränderung im Vergleich zur Referenzmessung zu beobachten.

7 Literaturverzeichnis

- Abbott LF, Regehr WG** (2004): Synaptic computation. *Nature* 431, 796-803
- Arnt J, Krosgaard-Larsen P** (1979): GABA agonists and potential antagonists related to muscimol. *Brain Res* 177, 395–400
- Backus KH, Deitmer JW, Friauf E** (1998): Glycine-activated currents are changed by coincident membrane depolarization in developing rat auditory brainstem neurones. *J Physiol* 507, 783–794
- Badura S** (2016): GABAB-mediated modulation of Martinotti Cells in the somatosensory cortex. Progressreport of Med. Diss. Göttingen. 08.04.2016
- Bao J**: The role of short-term synaptic plasticity in neuronal microcircuit. Biol. Diss. Göttingen 2010
- Booker SA, Gross A, Althof D, Shigemoto R, Bettler B, Frotscher M, Hearing M, Wickman K, Watanabe M, Kulik Á, Vida I** (2013): Differential GABA_B-receptor-mediated effects in perisomatic- and dendrite-targeting parvalbumin interneurons. *J Neurosci* 33, 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, Hamill OP, Sakmann B** (1987a): Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* 385, 243–286
- Bormann J, Hamill OP, Sakmann B** (1987b): 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** (1993): GABAB Receptor Pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33, 109–147
- Bowery NG, Hill DR, Hudson AL, Doble A, Middlemiss DN, Shaw J, Turnbull M** (1980): (–)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature* 283, 92-94
- Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ** (2002): International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian γ -aminobutyric acid_B receptors: Structure and function. *Pharmacol Rev* 54, 247-264
- Carvell G, Simons DJ** (1990): Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci* 10, 2638-2648
- Chen C, Tan R, Qu W, Wu Z, Wang Y, Urade Y, Huang Z** (2011): Magnolol, a major bioactive constituent of the bark of magnolia officinalis, exerts antiepileptic

effects via the GABA/benzodiazepine receptor complex in mice. *Br J Pharmacol* 164, 1534–1546

Cherubini E, Conti F (2001): Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci* 24, 155–162

Connelly WM, Errington AC, Di Giovanni G, Crunelli V (2013): Metabotropic regulation of extrasynaptic GABA 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

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

Delchmann J (2017): Elektrophysiologische Charakterisierung GABA - Rezeptoren vermittelter Inhibition an Martinotti - Zellen im somatosensorischen Kortex. *Med. Diss. Göttingen* 2017

Dosenbach NUF, Fair DA, Miezin FM, Cohen AL, Wenger KK, Dosenbach RAT, Fox MD, Snyder AZ, Vincent JL, Raichle ME, et al. (2007): Distinct brain networks for adaptive and stable task control in humans. *Proc Natl Acad Sci* 104, 11073–11078

Douglas RJ, Martin KA (1991): A functional microcircuit for cat visual cortex. *J Physiol* 440, 735–769

Dugladze T, Maziashvili N, Börgers C, Gurgénidze S, Häussler U, Winkelmann A, Haas CA, Meier JC, Vida I, Kopell NJ, et al. (2013): GABA_B autoreceptor-mediated cell type-specific reduction of inhibition in epileptic mice. *Proc Natl Acad Sci* 110, 15073–15078

Dutar P, Nicoll RA (1988): Pre- and postsynaptic GABA_B receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron* 1, 585–591

Eder M, Rammes G, Zieglgänsberger W, Dodt H-U (2001): GABA_A and GABA_B receptors on neocortical neurons are differentially distributed. *Eur J Neurosci* 13, 1065–1069

Engel AK, Brecht M, Fries P, Roelfsema PR, Singer W (1997): Role of the temporal domain for response selection and perceptual binding. *Cereb Cortex* 7, 571–582

Enna SJ, McCarson KE (2013): Characterization of GABA receptors. *Curr protoc pharmacol* 63, 1.7.1–1.7.20

Fanselow EE, Richardson KA, Connors BW (2008): Selective, state-dependent activation of somatostatin-expressing inhibitory interneurons in mouse neocortex. *J Neurophysiol* 100, 2640–2652

- Feldmeyer D, Qi G, Emmenegger V, Staiger JF** (2018): Inhibitory Interneurons and their circuit motifs in the many layers of the barrel cortex. *Barrel Cortex Funct* 368, 132–151
- Fischer T** (2018): Schichtspezifische Charakterisierung Somatostatin-exprimierender Interneurone in der GIN- und SOMcre/tdTomato-Maus mittels neurochemischer Marker im primären somatosensorischen Barrel-Kortex. Med. Dis. Göttingen 2018
- Flint Beal M, Clevens RA, Mazurek MF** (1988): Somatostatin and neuropeptide Y immunoreactivity in parkinson's disease dementia with alzheimer's changes. *Synapse* 2, 463–467
- 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
- Geoffroy H, Rossier J, Perrenoud Q, Vitalis T, Gallopin T** (2012): Diversity of GABAergic Interneurons in Layer VIa and VIb of Mouse Barrel Cortex. *Cereb Cortex* 23, 423–441
- Glausier JR, Lewis DA** (2011): Selective Pyramidal Cell Reduction of GABA_A Receptor $\alpha 1$ subunit messenger RNA expression in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 36, 2103-2110
- Goldberg JH, Lacefield CO, Yuste R** (2004): Global dendritic calcium spikes in mouse layer 5 low threshold spiking interneurons: implications for control of pyramidal cell bursting. *J Physiol* 558, 465–478
- 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
- Halabisky B, Shen F, Huguenard JR, Prince DA** (2006): Electrophysiological classification of somatostatin-positive interneurons in mouse sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* 96, 834–845
- Hilscher MM, Leão RN, Edwards SJ, Leão KE, Kullander K** (2017): Chrna2-martinotti cells synchronize layer 5 type a pyramidal cells via rebound excitation. *PLOS Biol* 15, e2001392, 1-26
- Horikawa K, Armstrong WE** (1988): A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Methods* 25, 1–11
- Hutson KA, Masterton RB** (1986): The sensory contribution of a single vibrissa's cortical barrel. *J Neurophysiol* 56, 1196–1223
- Isaacson JS, Solis JM, Nicoll RA** (1993): Local and diffuse synaptic actions of GABA in the hippocampus. *Neuron* 10, 165–175
- 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, aac9462

- Johnston GAR** (1996): GABAA receptor pharmacology. *Pharmacol Ther* 69, 173–198
- Jouhanneau J-S, Kremkow J, Poulet JFA** (2018): Single synaptic inputs drive high-precision action potentials in parvalbumin expressing GABA-ergic cortical neurons in vivo. *Nat Commun* 9, 1540, 1-11
- Kaila K** (1994): Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol* 42, 489–537
- Kaila K, Lamsa K, Smirnov S, Taira T, Voipio J** (1997): Long-Lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K⁺ Transient. *J Neurosci* 17, 7662-7672
- Karagiannis A, Gallopin T, Dávid C, Battaglia D, Geoffroy H, Rossier J, Hillman EMC, Staiger JF, Cauli B** (2009): Classification of NPY-Expressing Neocortical Interneurons. *J Neurosci* 29, 3642-3659
- Kawaguchi Y** (1995): Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *J Neurosci* 15, 2638-2655
- Kawaguchi Y, Kubota Y** (1997): GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7, 476–486
- Klausberger T, Somogyi P** (2008): Neuronal diversity and temporal dynamics: The unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321, 53-57
- Kusama T, Spivak CE, Whiting P, Dawson VL, Schaeffer JC, Uhl GR** (1993): Pharmacology of GABA $\rho 1$ and GABA α/β receptors expressed in xenopus oocytes and COS cells. *Br J Pharmacol* 109, 200–206
- 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
- Lefort S, Tómm C, Floyd Sarria J-C, Petersen CCH** (2009): The excitatory neuronal network of the C2 barrel column in mouse primary somatosensory cortex. *Neuron* 61, 301–316
- Lin HH, Dun NJ** (1998): Post- and presynaptic GABAB receptor activation in neonatal rat rostral ventrolateral medulla neurons in vitro. *Neuroscience* 86, 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
- Mao T, Kusefoglul D, Hooks BM, Huber D, Petreanu L, Svoboda K** (2011): Long-range neuronal circuits underlying the interaction between sensory and motor cortex. *Neuron* 72, 111–123
- 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
- McBain CJ, Fisahn A** (2001): Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2, 11-23

- McGarry L, Packer A, Fino E, Nikolenko V, Sippy T, Yuste R** (2010): Quantitative classification of somatostatin-positive neocortical interneurons identifies three interneuron subtypes. *Front Neural Circuits* 4, 12, 1-19
- Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W** (1995): A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 46, 423–462
- 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 GABA_B receptors inhibits evoked IPSCs in rat magnocellular neurons in vitro. *J Neurophysiol* 79, 1508–1517
- Mountcastle VB** (1957): Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol* 20, 408–434
- Nigro MJ, Yoshiko H, Bernardo R** (2018): Diversity and connectivity of layer 5 somatostatin-expressing interneurons in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* 38, 1622-1633
- 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, Bureau MH, Endo S, Smith G** (1991): The GABAA receptor family in the mammalian brain. *Neurochem Res* 16, 317–325
- Pala A, Petersen CCH** (2015): In Vivo Measurement of Cell-Type-Specific Synaptic Connectivity and Synaptic Transmission in Layer 2/3 mouse barrel cortex. *Neuron* 85, 68–75
- 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
- Planck M** (1890): Ueber die Erregung von Electricität und Wärme in Electrolyten. *Ann Phys* 275, 161–186
- 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

- Pouille F, Scanziani M** (2001): Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293, 1159-1163
- Rognan D, Boulanger T, Hoffmann R, Vercauteren DP, Andre JM, Durant F, Wermuth CG** (1992): Structure and molecular modeling of GABAA receptor antagonists. *J Med Chem* 35, 1969–1977
- Roux L, Buzsáki G** (2015): Tasks for inhibitory interneurons in intact brain circuits. *Neuropharmac* 88, 10–23
- 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): GABAB 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
- Scanziani M** (2000): GABA Spillover Activates Postsynaptic GABAB Receptors to Control Rhythmic Hippocampal Activity. *Neuron* 25, 673–681
- Schubert D, Kötter R, Staiger JF** (2007): Mapping functional connectivity in barrel-related columns reveals layer- and cell type-specific microcircuits. *Brain struct funct* 212, 107–119
- 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 GABAB responses in mice lacking GABAB (1). *Neuron* 31, 47–58
- 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
- Sivilotti L, Nistri A** (1991): GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 36, 35–92
- Smith GB, Olsen RW** (1995): Functional domains of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 16, 162–168
- Staiger JF, Zilles K, Freund TF** (1996): Recurrent axon collaterals of corticothalamic projection neurons in rat primary somatosensory cortex contribute to excitatory and inhibitory feedback-loops. *Anat Embryol (Berl)* 194, 533–543
- Staiger JF, Bisler S, Schleicher A, Gass P, Stehle JH, Zilles K** (2000): Exploration of a novel environment leads to the expression of inducible transcription factors in barrel-related columns. *Neuroscience* 99, 7–16
- Staiger JF, Masannek C, Bisler S, Schleicher A, Zuschratter W, Zilles K** (2002): Excitatory and inhibitory neurons express c-fos in barrel-related columns after exploration of a novel environment. *Neuroscience* 109, 687–699

- Staiger JF, Möck M, Proenneke A, Witte M** (2015): What types of neocortical GABAergic neurons do really exist? *E-Neuroforum* 6, 49–56
- Staley K, Soldo B, Proctor W** (1995): Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABAA receptors. *Science* 269, 977-981
- 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
- Tai C, Abe Y, Westenbroek RE, Scheuer T, Catterall WA** (2014): Impaired excitability of somatostatin- and parvalbumin-expressing cortical interneurons in a mouse model of dravet syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 111, 3139-3148
- Tao W, Higgs MH, Spain WJ, Ransom CB** (2013): Postsynaptic GABA_B receptors enhance extrasynaptic GABA_A receptor function in dentate gyrus granule cells. *J Neurosci* 33, 3738-3743
- Trepel M**: Neuroanatomie, Struktur und Funktion. 5. Auflage, Urban und Fischer, München 2012
- Trevelyan AJ, Sussillo D, Watson BO, Yuste R** (2006): Modular propagation of epileptiform activity: Evidence for an inhibitory veto in neocortex. *J Neurosci* 26, 12447-12455
- Ulrich D, Huguenard JR** (1996): GABAB receptor-mediated responses in GABAergic projection neurons of rat nucleus reticularis thalami in vitro. *J Physiol* 493, 845–854
- Ulrich D, Bettler B** (2007): GABAB receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Signal Mech* 17, 298–303
- Verkhratsky A, Krishtal OA, Petersen OH** (2006): From galvanic to patch clamp: the development of electrophysiology. *Pflüg Arch* 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
- Walker F, Möck M, Feyerabend M, Guy J, Wagener RJ, Schubert D, Staiger JF, Witte M** (2016): Parvalbumin- and vasoactive intestinal polypeptide-expressing neocortical interneurons impose differential inhibition on Martinotti cells. *Nat Commun* 7, 13664, 1-8
- 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
- Witte M** (2009): Differenzierung und Reifung GABAerger und glycinerger Neurotransmission im anteroventralen Cochleariskern der Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*). *Biol. Diss. Leipzig* 2009
- Woodward RM, Polenzani L, Miledi R** (1993): Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (rho-like) gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. II. Pharmacology of gamma-aminobutyric acidA and

gamma-aminobutyric acidB receptor agonists and antagonists. *Mol Pharmacol* 43, 609-625

Woolsey TA, Van der Loos H (1970): The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S I) of mouse cerebral cortex: The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* 17, 205–242

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, 12–12

Zucker RS, Regehr WG (2002): Short-Term Synaptic Plasticity. *Annu Rev Physiol* 64, 355–405

Danksagung

Mein großer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Jochen Staiger, Direktor des Instituts für Neuroanatomie der Georg-August-Universität Göttingen, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Herrn Dr. Mirko Witte danke ich für die hervorragende Betreuung während der gesamten Durchführung und Auswertung der Arbeit und darüber hinaus. Er war zu jedem Zeitpunkt zuverlässig erreichbar und hat mich stets aufbauend und mit großer Geduld unterstützt. Auch für das mühevollen Korrekturlesen und die konstruktive Kritik möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Martin Möck für die Unterstützung beim Erlernen der *Patch-clamp*-Methode und die Anleitung zur Auswertung meiner Daten mit dem von ihm erstellten Auswertskript.

Vielen Dank an Frau Sprysch, für das Vorbereiten und Färben der Schnitte und an Herrn Truschow für die technische Unterstützung.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft bedanken, durch welche ich diese Arbeit mit Freude und Motivation bestreiten konnte.

Ich möchte mich bei meiner Familie dafür bedanke, dass sie mich mit vollem Einsatz, Verständnis und Vertrauen während meiner gesamten Ausbildung unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Ehemann Björn, der während der langen Studienzeit mein Anker war.