

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

**GABA_B-Rezeptor-vermittelte Modulation
an Martinotti-Zellen im primär
somatosensorischen (Barrel-)Kortex der
Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Simon Badura

aus Gelsenkirchen

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Brück
Referent/in	Prof. Dr. Jochen Staiger
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. Swen Hülsmann
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Ralf Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 05.04.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "GABA_B-Rezeptor-vermittelte Modulation an Martinotti-Zellen im primär somatosensorischen (Barrel-)Kortex der Maus" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Das Nervensystem	1
1.2 Der primär somatosensorische Barrel-Kortex der Maus	2
1.3 Inhibition im Neokortex	3
1.3.1 Inhibition auf zellulärer Ebene.....	3
1.3.2 Verschiedene Arten der Inhibition.....	4
1.4 Martinotti-Zellen	5
1.5 Neuronale Plastizität.....	7
1.6 Ionotrope und metabotrope GABA-Rezeptoren	8
1.6.1 GABA _A -Rezeptoren.....	9
1.6.2 GABA _B -Rezeptoren.....	10
1.7 Fragestellung	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Versuchstiere.....	12
2.2 Anfertigen von thalamokortikalen Schnitten.....	12
2.3 Die <i>Patch-clamp</i> -Methode	13
2.4 Herstellung und Befüllen von Mikropipetten.....	14
2.5 Versuchsaufbau.....	15
2.5.1 Patchvorgang.....	16
2.5.2 Badapplikationen.....	17
2.5.3 Elektrische Stimulation.....	17
2.5.4 Identifizierung der Martinotti-Zellen	19
2.6 Elektrophysiologische Analyse der Membraneigenschaften	21
2.7 Auswertung der postsynaptischen Ströme	22
2.8 Datenanalyse und statistische Auswertung.....	23
2.8.1 Datenanalyse	23
2.8.2 Statistik.....	23
2.9 Lösungen und Pharmaka.....	23
3 Ergebnisse	27
3.1 Identifizierung der Martinotti-Zellen im Barrel-Kortex.....	27
3.2 Physiologischer Nachweis von GABA _B -Rezeptoren auf Martinotti-Zellen.....	30

3.3	Bestimmung von induzierten inhibitorischen postsynaptischen Strömen auf Martinotti-Zellen	36
3.4	GABA-vermittelte Modulation der Kurzzeitplastizität	40
4	Diskussion	50
4.1	Methodische Betrachtung	51
4.1.1	Das <i>Liquid-junction</i> -Potential	51
4.1.2	Der <i>Space-clamp</i> -Fehler	52
4.1.3	<i>In-vitro</i> - versus <i>In-vivo</i> -Versuchsaufbau	53
4.1.4	Limitationen bei der elektrophysiologischen Rezeptoranalyse	54
4.2	Identifizierung abgeleiteter Zellen	54
4.3	Expression von GABA _B -Rezeptoren auf Martinotti-Zellen	55
4.4	GABA-vermittelte Modulation der Kurzzeitplastizität	57
4.5	Physiologische Relevanz und Ausblick	61
5	Zusammenfassung	63
6	Anhang	65
7	Literaturverzeichnis	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Arten der Inhibition	5
Abbildung 2.1: Dimpling an einer Martinotti-Zelle der Schicht II/III.....	16
Abbildung 2.2: Versuchsaufbau elektrische Stimulation.....	18
Abbildung 3.1: Identifizierung von Martinotti-Zellen.....	29
Abbildung 3.2: Fotorekonstruktion abgeleiteter MC nach DAB-ABC-Färbung	30
Abbildung 3.3: Änderung des Membranpotentials durch Baclofen.....	31
Abbildung 3.4: Effekt von Baclofen auf Martinotti-Zellen der Schicht II/III	32
Abbildung 3.5: Effekt von Baclofen auf Martinotti-Zellen der Schicht V.....	33
Abbildung 3.6: Schichtenspezifischer Einfluss von Baclofen auf das Membranpotential.....	34
Abbildung 3.7: Effekt von Baclofen auf die intrinsischen Eigenschaften von Martinotti-Zellen der Schicht II/III	35
Abbildung 3.8: Ca ²⁺ -abhängige induzierte PSCs	37
Abbildung 3.9: GABA _A -vermittelte ePSCs an Martinotti-Zellen.....	38
Abbildung 3.10: Umkehrpotential der eIPSCs einer Schicht II/III MC	40
Abbildung 3.11: Einfluss von Baclofen auf die Amplitude der eIPSCs an Martinotti- Zellen	42
Abbildung 3.12: Frequenzabhängige Depression der eIPSCs auf MC der Schicht II/III.....	44
Abbildung 3.13: Einfluss von Baclofen auf die Kurzzeitplastizität	45
Abbildung 3.14: Schichtenspezifischer Einfluss von CGP auf die Amplitude der eIPSCs	47
Abbildung 3.15: Schichtenspezifischer Einfluss von CGP auf die Kurzzeitplastizität	49
Abbildung 4.1: Modellvorstellung einer inhibitorischen Synapse an den MC.....	60
Abbildung 6.1: Effekt von Baclofen auf die intrinsischen Eigenschaften von Martinotti- Zellen der Schicht V.....	65
Abbildung 6.2: Vergleich elektrophysiologischer Parameter vor und nach der Applikation von CGP	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Zusammensetzung von Präparationslösung und ACSF	24
Tabelle 2.2: Zusammensetzung verwendeter Intrazellulärlösungen	24
Tabelle 2.3: Übersicht verwendeter Pharmaka	25
Tabelle 2.4: Übersicht verwendeter Pufferlösungen	26
Tabelle 2.5 Protokoll der Versilberung nach Kevin Bender zur Intensivierung einer DAB-Färbung:	26
Tabelle 3.1: Elektrophysiologische Eigenschaften von Martinotti-Zellen.....	28
Tabelle 6.1: Verhältnis des PSC 10 zum PSC 1 nach Einwasch CGP (MW + SEM).....	67
Tabelle 6.2: Frequenzabhängige Werte für PSC 6-10 zu PSC 1 schichtenspezifisch	67
Tabelle 6.3: Statistischer Vergleich der Modulation der Kurzzeitplastizität	68

Abkürzungsverzeichnis

5HT _{3a} R	Serotoninrezeptor 3a
ABC-DAB	Avidin-Biotin-Komplex-3,3'-Diamino-benzidin-tetradhydrochlorid
ACSF	<i>artificial cerebro spinal fluid</i> (künstliche Hirnflüssigkeit)
AMPA	Agonist ionotroper Glutamatrezeptoren
AP	Aktionspotential
AP-5	spezifischer NMDA-Rezeptor-Antagonist
Aq. dest.	Destilliertes Wasser
cAMP	3',5'-zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat
CCD-Kamera	<i>Charge-coupled-device</i> -Kamera (Ladungsgekoppeltes-Gerät-Kamera)
CGP	Spezifischer GABA _B -Repetor-Antagonist
eIPSC	<i>evoked inhibitory postsynaptic current</i> (induzierter inhibitorischer postsynaptischer Strom)
ePSC	<i>evoked postsynaptic current</i> (induzierter postsynaptischer Strom)
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i> (gamma-Aminobuttersäure)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grünes fluoreszierendes Protein)
GIN	<i>GFP-expressing inhibitory neurons</i> (GFP-exprimierende inhibitorische Neurone)
GTP	Guanosintriphosphat
IPSC	<i>inhibitory postsynaptic current</i> (inhibitorischer postsynaptischer Strom)
LED	<i>light emitting diode</i> (Licht-emittierende Diode)
LJP	<i>liquid junction potential</i> (Flüssigkeitsgrenzschichtenpotential)
LTD	<i>long-term depression</i> (Langzeitdepression)
LTP	<i>long-term plasticity</i> (Langzeitplastizität)
MC	<i>Martinotti Cell(s)</i> (Martinotti-Zelle(n))
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
NBQX	Antagonist ionotroper Glutamat-Rezeptoren
NGFC	Neurogliaforme-Zelle(n)
NMDA	Agonist ionotroper Glutamatrezeptoren
PB-Puffer	<i>phosphate buffer</i> (Phosphatpuffer)
PNS	Peripheres Nervensystem
PSC	<i>postsynaptic current</i> (postsynaptischer Strom)
PV	Parvalbumin
QX314-Cl	Intrazellulärer Antagonist spannungsabhängiger Na-Kanäle
R _{in}	Eingangswiderstand
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler vom Mittelwert)
SST	Somatostatin
STD	<i>short-term depression</i> (Kurzzeitdepression)
STF	<i>short-term facilitation</i> (Kurzzeitfaszilitation)
STP	<i>short-term plasticity</i> (Kurzzeitplastizität)

TB	<i>tris buffer</i> (Trispuffer)
TBS	<i>tris buffered saline</i> (Trisgepufferte Kochsalzlösung)
ttpeak	<i>time to peak</i> (Zeit bis zum Amplitudenmaximum)
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
V_m	Membranpotential
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Das Nervensystem

Das Nervensystem ist ein komplexes System, welches der Reizwahrnehmung und Reizverarbeitung dient und den Wirbeltieren die Interaktion mit der Umwelt ermöglicht. Es gilt als das komplexeste und höchstentwickelste Organsystem des Menschen. Schon die kleinste Bewegung erfordert ein Zusammenspiel von Millionen Zellen, sensorischen Eingängen, komplexen Verschaltungen und einer Balance zwischen Hemmung und Erregung (Kandel et. al 2012).

Morphologisch besteht das Nervensystem aus zwei Kompartimenten: dem peripheren Nervensystem (PNS) und dem zentralen Nervensystem (ZNS). Dabei hat das PNS die Aufgabe sensorische Informationen aus der Umwelt an das ZNS weiterzuleiten und die Impulse des ZNS an die peripheren Muskeln und Organe zu übermitteln. Das ZNS wiederum beinhaltet das Gehirn und Rückenmark (Sobotta 2019). Schon seit der Antike beschäftigt die Medizin die Erforschung des Gehirns. So entbrannte bereits vor über 2000 Jahren ein Streit in der Wissenschaft darüber, ob das Herz oder das Gehirn als Sitz der Seele angesehen werden sollte. Die Seele oder Persönlichkeit gilt auch in der heutigen Zeit noch als das, was den Menschen von allen anderen Lebensformen unterscheidet. Folgen dieser Jahrtausende währenden Diskussion sind auch in der modernen Medizin noch zu erkennen. So wird heute noch zwischen Herztod und Hirntod unterschieden. Der Begründer unserer modernen Medizin, Hippokrates, verfasste um 430-410 v. Chr. das bis heute bekannte Werk „Über die heilige Krankheit“ und schrieb in diesem als Erster, dass Epilepsie eine Erkrankung des Gehirns sei und damit behandelbar wäre. Damit widersprach er der bis dahin geltenden These Epilepsie sei eine Strafe der Götter. Heute werden inhibitorischen Interneuronen – vor allem Martinotti-Zellen, die in dieser Arbeit Gegenstand der Untersuchung sind – eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese dieser Erkrankung zugesprochen (Abs. 4.5).

Unser Gehirn besteht aus Nervenzellen, den sogenannten Neuronen, und Stützzellen, den sogenannten Gliazellen. Beide Teile des ZNS sind von *liquor cerebrospinalis* umschlossen, der hauptsächlich der Polsterung des ZNS dient. Makroskopisch kann es weiterhin in die weiße (*substantia alba*) und graue Substanz (*substantia grisea*) eingeteilt werden. Die graue Substanz enthält eine höhere Anzahl an Nervenzellkörpern (*Somata*), die weiße Substanz enthält einen

höheren Anteil an Nervenfasern (Axone). Die Rinde (graue Substanz) des Gehirns wird Kortex genannt und besteht aus dem *Isocortex* (gleichförmiger Kortex) – gleichzusetzen mit dem *Neocortex* (neuer Kortex) – und *Allocortex* (anderer Kortex), bestehend aus *Archicortex* (alter Kortex) und *Paleocortex* (älterer Kortex) (Welsch und Kummer 2014; Trepel 2015).

Wenn man die Neuronenpopulation des Neokortexes betrachtet, ist die größte Gruppe, welche etwa 80-85 % der Neurone ausmacht, die der erregenden (exzitatorischen) Prinzipalneurone. Die restlichen Neurone (15-20 %) sind hemmende (inhibitorische) Nervenzellen (Stai-ger et al. 2015). Diese Einteilung ist allerdings nur bei Betrachtung einer einzelnen Zelle zutreffend. In übergeordneten Systemen oder Regelkreisen kann beispielsweise ein inhibitorisches Interneuron A ein anderes inhibitorisches Interneuron B hemmen und somit den Wegfall der Hemmung, also eine Erregung, bewirken – was auch Disinhibition genannt wird. Andersherum kann gleichermaßen ein Prinzipalneuron C zur Aktivierung eines inhibitorischen Interneurons D führen und damit eine Hemmung vermitteln – was auch laterale Inhibition genannt wird. Diese vereinfachte Darstellung reicht allerdings nicht aus um die komplexen Regelkreise im Neokortex zu beschreiben, denn es gibt eine Vielzahl weiterer solcher Verschaltungsmotive. Neben mechanischen Kontakten sind Zellen auch über elektrische Kontakte (*gap junctions*) und chemische Kontakte (Synapsen) miteinander verbunden (Trepel 2015).

1.2 Der primär somatosensorische Barrel-Kortex der Maus

Mikroskopische Unterschiede in bestimmten Regionen des Kortex führten Brodmann im Jahr 1909 zu einer zytoarchitektonischen Einteilung in 52 Areale (Brodmann 1909). Doch nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell werden diesen Arealen bestimmte Aufgaben zugeordnet. Der gesamte Kortex zeigt in der Nissl-Färbung einen sechsschichtigen Aufbau, wobei sich jede dieser Schichten in ihrer zellulären Zusammensetzung unterscheidet. Laut gängiger Modellvorstellungen besteht neben der horizontalen Einteilung im Kortex auch eine durch vertikal angeordnete Kolumnen, welche als Funktionseinheiten angesehen werden können. Dieses Konzept kommt im Barrel-Kortex am klarsten zum Vorschein (Feldmeyer et al. 2013).

Der Barrel-Kortex ist eine beim Nager vorkommende Region, in welcher sensorische Informationen der Vibrissen verarbeitet und weitergeleitet werden (Woolsey und Van der Loos 1970). Vibrissen sind spezialisierte Haare, die über mit ihnen assoziierte trigeminale Mechanorezeptoren taktile Informationen aufnehmen. Diese werden an den Thalamus weitergeleitet, welcher vor allem in Schicht IV des somatosensorischen Kortex projiziert. Fassartige

Strukturen (sog. *barrels*) in Schicht IV repräsentieren jeweils eine Funktionseinheit, die einer bestimmten Vibrisse zugeordnet werden kann und dabei einer somatotopischen Ordnung unterliegen (Simons und Woolsey 1984). Diese lichtmikroskopisch sichtbaren Strukturen erscheinen, weil jedes einzelne *barrel* aus zentralen zeldichten Anteilen besteht, welche von zellarmen Arealen umgeben sind (Simons und Woolsey 1984). Jedes *barrel* repräsentiert eine eigene Kolumne, die aus tausenden Neuronen besteht und sich über alle sechs Schichten des Kortex erstreckt (Mountcastle 1997; Lübke und Feldmeyer 2007). Diese Kolumnen stellen funktionell eigenständige Einheiten dar, die der lokalen Kontrolle kortikaler Interneurone unterliegen (Petersen und Sakmann 2001). Allerdings vermitteln einige der dort enthaltenen Zellen ihre Funktion auch über die Grenzen der Kolumnen hinaus. Durch die mögliche Zuordnung der Strukturen im Barrel-Kortex eignet sich dieser besonders für die Forschung, da Funktionseinheiten in anderen Kortexarealen nicht ohne experimentelle Eingriffe lichtmikroskopisch erkennbar sind.

1.3 Inhibition im Neokortex

Inhibition im Kortex hat vielfältige Aufgaben. Sie ist zur sogenannten Kontrastschärfung bei der Verarbeitung von Sinnesinformationen notwendig, an Lernprozessen beteiligt und ein entscheidender Faktor bei den Umbauvorgängen, die unser Gehirn zu einem sich stetig wandelnden Gebilde machen. Erst diese mannigfaltigen Prozesse ermöglichen uns eine Interaktion mit der Umwelt. Es existieren verschiedene Formen der Inhibition (Abs. 1.3.2), die durch kortikale Interneurone und komplexe neuronale Netzwerke vermittelt werden (Roux und Buzsáki 2015).

1.3.1 Inhibition auf zellulärer Ebene

Kortikale inhibitorische Neurone können in drei nicht-überlappende Subgruppen mit Hilfe von molekularen Markern eingeteilt werden: Somatostatin (SST), Parvalbumin (PV) und den Serotoninrezeptor 3a (5HT_{3aR}) (Xu et al. 2010; Rudy et al. 2011; Staiger et al. 2015; Feldmeyer et al. 2018).

Die Gruppe der SST⁺-Zellen (etwa 30 % der kortikalen Interneurone) besteht zum größten Teil aus Martinotti-Zellen (*martinotti cells*, MC), die in dieser Arbeit untersucht wurden. Neben MC exprimieren auch GABAerge Projektionsneurone und eine bislang unzureichend charakterisierte Gruppe von Nicht-Martinotti-Zellen Somatostatin (Tremblay et al. 2016). Eine Unterscheidung ist aufgrund des charakteristischen Feuerverhaltens von Martinotti-Zellen möglich (Ascoli et al. 2008).

Am häufigsten kommen unter den inhibitorischen Neuronen die PV⁺-Zellen vor. Sie stellen etwa 40 % der kortikalen Interneurone und bestehen morphologisch aus Korbzellen und Axo-axonalen-Zellen (Staiger et al. 2015). Elektrophysiologisch zeichnen sich diese Neurone durch ihre schnelle Feuerfrequenz (sog. *fast spiking cells*) aus.

Die heterogenste Gruppe kortikaler Interneurone exprimiert den ionotropen Serotoninrezeptor 3a und kommt mit 30 % etwa gleich häufig wie SST⁺-Interneurone im Neokortex vor, stellt aber die häufigste Population inhibitorischer Interneurone in den Schichten I-III dar (Lee et al. 2010). Sie besteht aus bipolaren oder doppeltgebüschelten Zellen, welche neben dem Serotoninrezeptor auch das Vasoaktive Intestinale Polypeptid (VIP) exprimieren, aus Neurogliaformen-Zellen und einer unzureichend charakterisierten Gruppe anderer Interneurone. Nicht nur morphologisch, sondern auch elektrophysiologisch zeigt sich eine Heterogenität in dieser Neuronenpopulation, insbesondere der VIP-exprimierenden Zellen (Proenneke et al. 2015). Ihr Feuerverhalten wird häufig als irregulär beschrieben (Staiger et al. 2015). Eine Besonderheit der Neurogliaformen-Zellen ist, dass sie zur sogenannten *volume transmission* in der Lage sind (Oláh et al. 2009). Das bedeutet, dass sie Transmitter in den extrazellulären Raum abgeben, welcher durch Diffusion an extrasynaptisch lokalisierten Rezeptoren wirken kann (Agnati et al. 1995).

1.3.2 Verschiedene Arten der Inhibition

Laut den Autoren Roux und Buzsáki (2015) lässt sich Inhibition im Kortex in fünf verschiedene Typen (oder Motive) einteilen (Abb. 1.1). (i) Vorwärtsgerichtete Inhibition (*feedforward inhibition*) beschreibt dabei eine von exzitatorischen Zellen ausgelöste anterograde Hemmung von Prinzipalneuronen, die über die Aktivierung lokaler inhibitorischer Interneurone abläuft (Abb. 1.1 A). (ii) Bei der rückwärtsgerichteten Hemmung (*feedback inhibition*) aktivieren Prinzipalneurone inhibitorische Interneurone, welche dann wiederum die ursprünglich aktiven Prinzipalneurone inhibieren (Abb. 1.1 B). (iii) Laterale Inhibition läuft ab, indem in exzitatorischen Prinzipalneuronen Aktionspotentiale ausgelöst werden, welche kortikale Interneurone rekrutieren. Diese wiederum inhibieren andere Prinzipalneurone, die ursprünglich nicht aktiv sein mussten (Abb. 1.1 C). Dies dient der sogenannten Kontrastschärfung. (iv) Direkte Inhibition kann sowohl Prinzipalneurone als auch Interneurone betreffen (oder beide gleichzeitig) und wird von langen Axonen inhibitorischer Projektionsneurone aus entfernten kortikalen Arealen ausgelöst (Abb. 1.1 D). (v) Die letzte bekannte Form der Inhibition ist die Disinhibition. Sie beschreibt einen Mechanismus bei welchem durch inhibitorische Interneu-

rone vermittelte Inhibition von Prinzipalneuronen dadurch entfällt, dass andere Interneurone diese hemmen (Abb. 1.1 E). Dies erlaubt die Erregung der nachgeschalteten Prinzipalneurone.

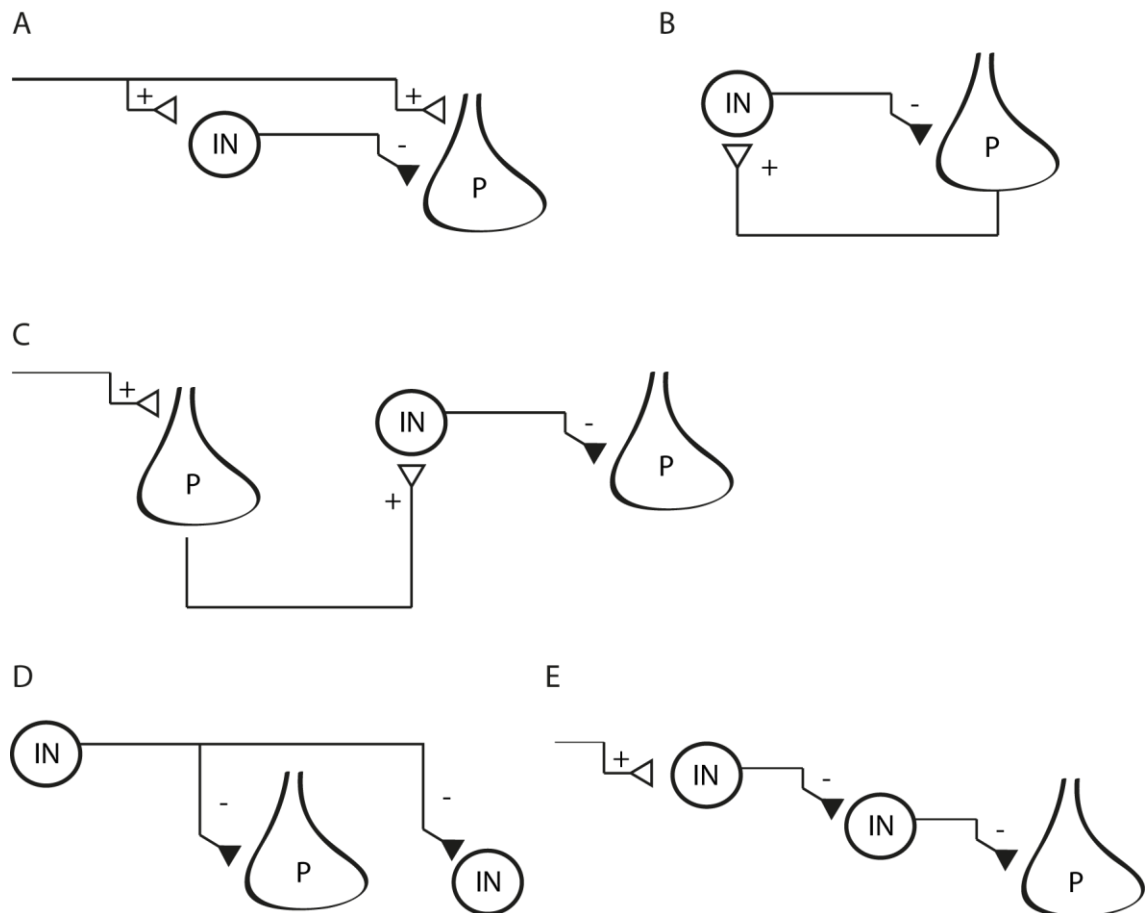


Abbildung 1.1: Arten der Inhibition

Dargestellt sind die verschiedenen Arten der Inhibition, die durch kortikale Interneurone vermittelt werden. IN = inhibitorische Neurone, P = exzitatorische Prinzipalneurone, schwarze Dreiecke = inhibitorische Synapsen, weiße Dreiecke = exzitatorische Synapsen, + = Exzitation, - = Inhibition. **(A)** vorwärtsgerichtete Hemmung, **(B)** rückwärtsgerichtete Hemmung, **(C)** laterale Inhibition, **(D)** direkte Hemmung, **(E)** Disinhibition. Modifiziert nach Roux und Buzsáki (2015).

1.4 Martinotti-Zellen

Martinotti-Zellen (*martinotti cells*, MC) sind eine Gruppe GABAerger kortikaler Interneurone, die erstmals 1889 durch Carlo Martinotti als kortikale Neurone mit einem aufsteigenden Axon beschrieben wurden (Martinotti 1889). Dieses Axon steigt immer bis in Schicht I des Kortex auf, wo es sich weit verzweigt (De Felipe et al. 2013; Staiger et al. 2015). MC exprimieren unter anderem den molekularen Marker Somatostatin (SST). SST ist ein Peptidhormon, welches aus zwei Peptidketten von 14 und 28 Aminosäuren besteht. Im Kortex existieren fünf verschiedene Somatostatin-Rezeptoren auf nahezu allen kortikalen Neuronen,

wobei die Bedingungen unter denen dieses Peptid freigesetzt werden kann noch nicht ausreichend untersucht sind (Bologna und Leroux 2000). Die SST⁺-Interneurone stammen – zusammen mit den PV⁺-Interneuronen – embryologisch aus der medialen ganglionischen Eminenz und wandern von dort in unterschiedliche Areale, wie den Neokortex, ein (Xu et al. 2004).

Martinotti-Zellen zeigen elektrophysiologisch ein adaptierendes Feuerverhalten (Ascoli et al. 2008). Neben dem adaptierenden Feuerverhalten mit dabei kontinuierlich abnehmender Amplitude (Ma et al. 2006), stellt die hohe spontane Aktivität von MC ein weiteres elektrophysiologisches Charakteristikum dar. Diese Spontanaktivität mit einer Frequenz von 3 – 10 Hz (sog. theta-Frequenz) ist weitestgehend unabhängig von GABAergen und glutamatergen Eingängen (Fanselow et al. 2008). Komplexe Verhaltensweisen sind jedoch dazu in der Lage diese basale Feuerrate zu modulieren, was bereits für das Lernen durch Angst, auditive Diskrimination und positiver Konditionierung gezeigt werden konnte (Kvitsiani et al. 2013; Pi et al. 2013; Lovett-Barron et al. 2014). Ein Grund dafür können elektrische Kopplungen zwischen Martinotti-Zellen über *gap junctions* sein (Gibson et al. 1999; Hu und Agmon 2015). So findet eine synchrone Netzwerkaktivität statt, die nicht auf der Übertragung durch chemische Synapsen basiert (Ma et al. 2012; Pfeffer et al. 2013).

Funktionell sind MC an der Modulation der Exzitation durch Inhibition im Kortex beteiligt (Roux und Buzsáki 2015). So wurde beschrieben, dass sie von Pyramidenzellen aktiviert werden und dabei andere Pyramidenzellen hemmen (Silberberg und Markram 2007). Diese Form der lateralen Inhibition (Abb. 1.1 C) soll zur sogenannten Kontrastschärfung bei der Verarbeitung von Sinnesinformationen dienen. Zudem sind Martinotti-Zellen die einzige Gruppe kortikaler Interneurone, die regelmäßig inhibitorische Synapsen mit Schicht-I-Interneuronen bilden (Pfeffer et al. 2013).

Martinotti-Zellen selbst erhalten inhibitorische Afferenzen von PV⁺-Zellen und VIP⁺-Zellen (Pfeffer et al. 2013; Lee et al. 2013; Pi et al. 2013; Walker et al. 2016). Für Martinotti-Zellen der Schicht II/III kommen überwiegend lokale PV⁺-Zellen und VIP⁺-Zellen für deren Inhibition in Betracht (Walker et al. 2016).

Die Aktivität von MC wird abhängig vom elektrischen Aktivitätsniveau des Gehirns (*UP*- oder *DOWN-state*) reguliert und scheint eine entscheidende Rolle bei Lernvorgängen zu spielen (Urban-Ciecko und Barth 2016). Neben der GABA_A-vermittelten Inhibition, die in postsynaptischen Zellen ausgelöst wird, konnte auch gezeigt werden, dass MC über GABA_B-Rezeptoren dazu in der Lage sind, exzitatorische Prinzipalneurone schnell und reversibel zu blockieren (Urban-Ciecko et al. 2015). Damit scheint ihre Hauptaufgabe auf zellulärer Ebene

die Kontrolle von Prinzipalneuronen zu sein, welche sowohl über dort lokalisierte GABA_A- als auch GABA_B-Rezeptoren vermittelt wird.

1.5 Neuronale Plastizität

Neuroplastizität beschreibt die Fähigkeit des Gehirns sich in Abhängigkeit von der Nutzung zu verändern. Dabei kann es sowohl zu funktionellen als auch zu strukturellen Veränderungen kommen. Unter strukturellen Veränderungen werden die Neuroneogenese, Veränderungen der Axone und Dendriten und auch Umbauvorgänge der Synapsen zusammengefasst. Während die Neuroneogenese beim adulten Vertebraten nur im Hippocampus und *Bulbus olfactorius* vorkommt, finden subzelluläre Umbauvorgänge ständig in allen Regionen des Gehirns statt. Unter funktionellen Veränderungen werden Änderungen der Übertragungsstärke einzelner neuronaler Impulse zusammengefasst. Die synaptische Plastizität, welche also sowohl strukturell als auch funktionell sein kann, wurde zum ersten Mal von Donald O. Hebb postuliert (Hebb 1949; Morris 1999). Der Neurobiologe und spätere Nobelpreisträger Eric Kandel beschrieb im Folgenden, dass diese Plastizität sowohl die präsynaptische als auch die postsynaptische Seite oder beide gleichzeitig betreffen kann und eine Interaktion zwischen Genen und Synapsen erfordert (Kandel 2001).

Synaptische Plastizität kann unter Berücksichtigung der Zeitspanne, über welche die Effekte anhalten, weiterhin in Kurzzeit- und Langzeitplastizität eingeteilt werden, wobei das Grundprinzip das Gleiche ist. Eine Unterform der Langzeitplastizität ist die Langzeitpotenzierung (*long-term potentiation*, LTP). Diese ist am besten für glutamaterge Neurone des Hippocampus erforscht. Glutamat besitzt dort zwei unterschiedliche postsynaptische Rezeptoren: die ionotropen AMPA- und NMDA-Rezeptoren. Im physiologischen Zustand ist der Ionenkanal der NMDA-Rezeptoren extrazellulär durch ein Mg²⁺-Ion blockiert und kann damit durch Glutamat nicht geöffnet werden. Treffen jedoch räumlich oder zeitlich mehrere Aktionspotentiale präsynaptischer Terminalen auf der postsynaptischen Zelle ein, wird durch die langanhaltende positive Umladung der Zellmembran diese Blockade „abgestoßen“ und der NMDA-Rezeptor kann durch Glutamat aktiviert werden. NMDA-Rezeptoren besitzen eine erhöhte Leitfähigkeit für Ca²⁺-Ionen, wodurch es zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration kommt. Sobald dies geschieht, findet über eine intrazelluläre Signalkaskade des *second messengers* Ca²⁺ eine postsynaptische Modifikation statt. Diese umfasst neben dem Einbau weiterer AMPA-Rezeptoren und der Sensitivierung der Rezeptoren für Glutamat, ebenfalls morphologische Anpassungen, wie dem Wachstum von dendritischen Dornforts-

ätzen, welche letztlich die Erregbarkeit des Neurons erhöhen. Würde jedoch nur eine Langzeitpotenzierung stattfinden, könnte die Erregbarkeit der Nervenzelle nur gesteigert werden bis ein Maximum der Erregbarkeit erreicht ist. Daher existiert auch ein gegensätzlicher Effekt, die sogenannte Langzeitdepression (*long-term depression*, LTD). Diese verläuft nach dem prinzipiell gleichen, aber umgekehrten Prinzip. An ein und derselben Synapse kann je nach vorausgegangener Zahl und Frequenz von Aktionspotentialen LTP oder LTD auftreten. Neben den ionotropen Glutamatrezeptoren haben zudem metabotrope Glutamatrezeptoren einen Einfluss auf die synaptische Plastizität. Auf struktureller Ebene kann es dabei zum Aufbau (Synaptogenese) oder Abbau von Synapsen kommen. Doch nicht nur die Synapse, sondern auch ganze Abschnitte von Axonen oder Dendriten können auf diese Art auf- oder abgebaut werden.

Im Gegensatz zur Langzeitplastizität, welche mehrere Minuten bis zu mehreren Jahren andauert, existiert auch eine Kurzzeitplastizität (*short-term plasticity*, STP), die Veränderungen der synaptischen Übertragung innerhalb von wenigen Millisekunden bis zu einigen Minuten bewirkt. Bei der Kurzzeitplastizität spielen im Gegensatz zur LTP Veränderungen in der Präsynapse eine zentrale Rolle. Bei der Kurzzeitdepression (*short-term depression*, STD) kommt es in Folge repetitiver Aktionspotentiale in der präsynaptischen Terminale zu einer Reduktion des Vesikelpools. Dies führt zu einer Reduktion von ausgeschüttetem Neurotransmitter und demzufolge zu geringeren postsynaptischen Strömen an der Postsynapse. Bei der Kurzzeitfazilitation (*short-term facilitation*, STF) nimmt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch repetitive AP in der präsynaptischen Terminale zu. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Vesikelauslösung und zu einer Erhöhung der Konzentration des ausgeschütteten Neurotransmitters im synaptischen Spalt. An der Postsynapse können infolge einer STF höhere Amplituden postsynaptischer Ströme registriert werden. Bei der Modulation der Kurzzeitplastizität spielen insbesondere präsynaptische metabotrope GABA_B-Rezeptoren eine entscheidene Rolle.

1.6 Ionotrope und metabotrope GABA-Rezeptoren

GABA (*gamma-aminobutyric acid*, gamma-Aminobuttersäure) ist der häufigste inhibitorische Neurotransmitter im adulten menschlichen Gehirn. In der Embryonalentwicklung wirkt GABA jedoch exzitatorisch und ist für den Aufbau neuronaler Verbindungen essenziell (Obata et al. 1978; Stein und Nicoll 2003). Die Synthese erfolgt durch die Abspaltung eines CO₂-Moleküls mit Hilfe der Glutamatdecarboxylase aus Glutamat, dem wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter. Der Abbau von ausgeschüttetem GABA, d.h. die Entfernung

aus dem synaptischen Spalt, erfolgt auf unterschiedlichen Wegen. So kann das präsynaptische Neuron GABA wieder in die Zelle aufnehmen und erneut in Vesikeln speichern (Zhou und Danbolt 2013) oder es mit Hilfe der GABA-Transaminase abbauen. Ein anderer metabolischer Weg ist die Aufnahme in Gliazellen mit anschließender Verstoffwechslung im Glutaminzyklus (Zhou und Danboldt 2013).

Rezeptoren an chemischen Synapsen können in ionotrope und metabotrope Rezeptoren unterteilt werden. Die Aktivierung eines ionotropen Rezeptors führt zur Öffnung eines Ionenkanals und zu einem direkten Fluss von Ionen über die Zellmembran. Metabotrope Rezeptoren hingegen besitzen ein sogenanntes G-Protein an der intrazellulären Seite. Bei einer Aktivierung dissoziiert dieses Protein (welches aus drei Untereinheiten besteht) und führt über sogenannte *second messenger* zur Rekrutierung unterschiedlicher intrazellulärer Signalkaskaden (Abs. 1.6.2). Beide Formen von Rezeptoren können durch die gleichen Transmitter aktiviert werden, so auch bei GABA-Freisetzung.

1.6.1 GABA_A-Rezeptoren

GABA_A-Rezeptoren sind ionotrope Rezeptoren. Sie bestehen aus fünf Untereinheiten, wobei bislang 19 verschiedene Untereinheiten beschrieben wurden, die in die Klassen α , β , γ , δ , ϵ , und ρ eingeteilt werden können (Sarto-Jackson und Sieghart 2008; Connelly et al. 2013). Durch die vielfältigen Möglichkeiten der Zusammensetzung unterscheidet sich die Affinität für bestimmte Pharmaka sowie die rezeptorspezifischen elektrophysiologischen Eigenschaften (Hevers und Lüddens 1998). Neben der Bindungsstelle für GABA existieren noch weitere, welche die Affinität des Rezeptors zu GABA verändern können (Puthenkalam et al. 2016). Pharmakologisch lassen sich diese zur Behandlung verschiedener neuropsychiatrischer Erkrankungen nutzen (Sieghart 2015). Obwohl die GABA_A-Rezeptoren nicht Anionen-selektiv sind, ist hauptsächlich die Leitfähigkeit für Cl⁻ und in geringerem Maße für HCO₃⁻ von physiologischer Relevanz. Bei Aktivierung des GABA_A-Rezeptors kommt es bei physiologischen Membranpotentialen zu einwärts gerichteten Chloridströmen, wodurch es bei adulten Neuronen zu einer Hyperpolarisation der Membran kommt (da das Membranpotential positiver ist als das Gleichgewichtspotential für Chlorid). Das Umkehrpotential von GABA_A-vermittelten Strömen liegt bei adulten Neuronen bei etwa -70 mV (Staiger et al. 2015). Dadurch werden exzitatorische Eingänge abgeschwächt, bzw. es ist mehr Exzitation notwendig um Aktionspotentiale auszulösen, da sich das Membranpotential weiter von der Feuerschwelle entfernt. Durch den Ionenfluss wird zudem auch der Eingangswiderstand der Zelle herabgesetzt. GABA_A-Rezeptoren kommen überwiegend auf der postsynaptischen Membran vor.

1.6.2 GABA_B-Rezeptoren

Im Gegensatz zu GABA_A-Rezeptoren sind GABA_B-Rezeptoren metabotrop und eine Aktivierung führt nicht zu einer direkten Öffnung von Ionenkanälen. Für die Funktionsweise von GABA_B-Rezeptoren sind bestimmte Untereinheiten notwendig, die als GABA_{B1} und GABA_{B2} bekannt sind (Kaupmann et al. 1998; Jones et al. 1998; White et al. 1998; Chalifoux und Carter 2011). Der Großteil der GABA_B-Rezeptoren zeigt dabei einen heterodimeren Aufbau aus einer Kombination dieser beiden Untereinheiten. Bei einer Aktivierung der Rezeptoren ändert sich deren Konformation und GDP (Guanosin-Di-Phosphat) wird gegen GTP (Guanosin-Tri-Phosphat) ausgetauscht. Das intrazellulär gelegene G_i-Protein dissoziiert in seine α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Die α -Untereinheit führt zur Hemmung der Adenylatcyclase, welche über die PKA (Proteinkinase A) die Konzentration von cAMP (zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat) herabsetzt. Im Gegensatz zur α -Untereinheit ist die $\beta\gamma$ -Untereinheit direkt dazu in der Lage Ionenkanäle und *second messenger* zu regulieren.

GABA_B-Rezeptoren können präsynaptisch oder extrasynaptisch vorkommen (Kulik et al. 2003, Booker et al. 2013). Die $\beta\gamma$ -Untereinheit kann zur Öffnung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen und/oder zu einer Hemmung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen führen. Die Arbeitsgruppe um Huang konnte zeigen, dass durch die Aktivierung von GABA_B-Rezeptoren die Leitfähigkeit für *low-voltage* Ca²⁺-Kanäle um 22 %, die für *high-voltage* Ca²⁺-Kanäle um 32 % herabgesetzt wird, was auf unterschiedliche intrazelluläre Mechanismen schließen lässt (Huang et al. 2015). Die Modulation beider Gruppen von Ionenkanälen führt dabei zu einer Hyperpolarisation der Zelle. Zusätzlich bewirkt der verminderte Einstrom von Kalzium, dass weniger Neurotransmitter enthaltende Vesikel ausgeschüttet werden, was die häufige präsynaptische Lokalisation dieser Rezeptoren erklärt. Neben einer Änderung der STP kann die intrazellulär ablaufende Signalkaskade, die auch Phospholipasen und Proteinkinasen beinhaltet, auch zu Änderungen der LTP führen. Das erklärt die ebenfalls häufig vorkommende extrasynaptische Lokalisation der GABA_B-Rezeptoren.

1.7 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es die durch den Neurotransmitter GABA vermittelte Inhibition an Martinotti-Zellen der Schichten II/III und V im primär somatosensorischen (Barrel-)Kortex der Maus zu untersuchen, um damit einen Beitrag zum Verständnis der komplexen Verschaltung kortikaler Interneurone zu leisten. Dabei sollen sowohl die postsynaptische Membran an den Martinotti-Zellen als auch die präsynaptischen inhibitorischen Terminalen im Fokus

stehen. Hierzu werden die MC mit Hilfe der *patch-clamp*-Technik abgeleitet und Membranpotentialänderungen bzw. Ionenströme über die postsynaptische Membran detektiert.

Im ersten Schritt ist zu klären, ob Martinotti-Zellen im Barrel-Kortex der Maus metabotrope GABA_B-Rezeptoren exprimieren und ob schichtenspezifische Unterschiede im elektrophysiologischen Verhalten zwischen den MC der Schicht II/III und V existieren. Dabei werden die intrinsischen Membraneigenschaften und die Wirkung des GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen auf die Membraneigenschaften miteinander verglichen und statistisch ausgewertet.

Im zweiten Schritt sollen die inhibitorischen Terminalen auf den Martinotti-Zellen mittels bipolarer Stimulationselektrode gereizt und die postsynaptisch ausgelösten inhibitorischen Membranströme (IPSCs, *inhibitory postsynaptic currents*) charakterisiert werden. Anschließend wird die potentielle Modulation der IPSCs durch präsynaptische GABA_B-Rezeptoren mit Hilfe der Gabe von Agonisten und Antagonisten untersucht. Dabei soll der Frage nachgegangen werden, ob GABA_B-Rezeptoren an einer synaptischen Autoinhibition beteiligt sind und ob es generell Unterschiede zwischen der inhibitorischen Neurotransmission an den MC der Schichten II/III und V gibt.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Durchführung der Versuche wurden Mäuse der transgenen GIN (*GFP-expressing Inhibitory Neurons*)-Linie (Tg(GadGFP)45704Swn) verwendet. Diese stammten aus der Zucht der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen. Die Haltung der Tiere und die experimentelle Durchführung fanden unter Einhaltung der Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes statt (2013). Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekapitation. Alle Untersuchungen wurden geschlechtsunabhängig an Tieren im postnatalen Alter von 23 bis 33 Tagen (P23-P33), bei einem Tier im postnatalen Alter von 42 Tagen (P42, Kontrollexperiment), durchgeführt.

2.2 Anfertigen von thalamokortikalen Schnitten

Nachdem die Tiere mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran betäubt wurden, wurde die tiefe Bewusstlosigkeit durch Ausbleiben des Lidschutzreflexes und taktile Reizung kontrolliert. Es erfolgte die Dekapitation mit Hilfe einer Schere. Im Anschluss wurde der Kopf auf eine mit Eis gefüllte Petrischale gelegt und das Fell des Tieres von kaudal nach rostral aufgeschnitten und seitlich entfernt. Entlang des zervikalen Rückenmarkes beginnend wurde die Schädelkalotte entlang der *Sutura sagittalis* in frontaler Richtung bis zu den Augen gespalten. Durch senkrecht zur Sutur verlaufende Schnitte konnte die Kalotte mit einer Pinzette entlang des Interhemisphärenspaltes nach lateral aufgeklappt werden. Nach Durchtrennung des *Bulbus olfactorius* mittels einer Schere konnten die rostral gelegenen Hirnnerven stumpf gelöst werden. Auf diese Weise konnte das Gehirn vom knöchernen Schädel getrennt und in ein Becherglas mit eiskalter Präparationslösung (Abs. 2.9) überführt werden. Während und vor (mind. 15 Min.) der Präparation wurde die verwendete Präparationslösung mit Carbogen (95 % O₂ + 5 % CO₂) begast.

Nach Herauslösen des Gehirns wurden die beiden Hemisphären entlang des Interhemisphärenspaltes mit einer Rasierklinge durchtrennt und vorsichtig zur Seite bewegt. Die Kortexhälften wurden mit Kleber auf einem Objektträger fixiert, wobei der Interhemisphärenspalt als Auflagefläche diente und der Kortex parallel zur Kante des Objektträgers ausgerichtet wurde. An der nun höchsten Stelle des Gehirns wurde das Cerebellum im 55° Winkel vom Cerebrum gelöst. Die verbliebenen Großhirnhälften wurden dann erneut in die mit Carbogen begaste Präparationslösung überführt. Sie wurden anschließend mit Kleber auf dem Teller des Vibratoms (Leica VT1200S, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) fixiert. Dabei

bildete die Schnittfläche zwischen Cerebrum und Cerebellum die Auflagefläche, während der Interhemisphärenspalt in Richtung des Präparators ausgerichtet war. Der Teller wurde dann in das Vibratom eingeführt, dessen Kammer mit eiskalter Präparationslösung gefüllt war.

Nach manueller Einstellung der Begrenzungen der Schnittfläche wurde kurz über dem Präparat mit 300 μm dicken Schnitten bei einer Geschwindigkeit von 30 mm/s begonnen. In Nähe der Zielregion, die durch optische Kontrolle des Hippocampus identifiziert wurde, wurde die Geschwindigkeit der Schnittführung auf 10 mm/s gedrosselt, um Gewebeschäden zu vermeiden und das neuronale Netzwerk nicht stärker als notwendig zu belasten. Die 300 μm dicken Schnitte des Barrel-Kortex wurden in ein Becherglas mit einem Netz überführt und in einem Wärmebad bei 32°C für 30 – 60 Minuten in ACSF (*artificial cerebro spinal fluid*, künstlicher Hirnflüssigkeit) inkubiert und mit Carbogen begast. Nach der Inkubation konnten die 300 μm dicken thalamokortikalen Schnitte für bis zu sechs Stunden für die elektrophysiologischen Versuche verwendet werden.

2.3 Die *Patch-clamp*-Methode

Die *Patch-clamp*-Methode ist ein elektrophysiologisches Verfahren zur Untersuchung von Ionenkanälen und Transmitterrezeptoren biologischer Membranen. Grundlage dieser Methode ist die von Kenneth S. Cole und H. J. Curtis entwickelte Spannungsklemm-Technik (*voltage-clamp*) (Molleman 2003). Damit gelang es in den 1930er Jahren die Änderung der Membranleitfähigkeit eines Neurons bei Erregung zu messen. Auf dieser Grundlage entwickelten Bert Sakman und Erwin Neher im Jahr 1976 die *Patch-clamp*-Methode, um die Funktion einzelner Ionenkanäle auf Zellmembranen zu untersuchen. Dafür erhielten die beiden Forscher im Jahr 1991 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Hamill und Kollegen beschrieben im Jahr 1981 die *Tight-seal*-Variante, mit welcher ein Ionenfluss über einem einzelnen Membranstück untersucht werden konnte. Mit Hilfe einer Glaspipette wurde ein Membranstück angesaugt und durch den hohen elektrischen Widerstand von über 1 G Ω von der umgebenen Membran isoliert. Die auf diese Art erreichte Ableitbedingung wird als *Cell-attached*-Konfiguration bezeichnet.

Aus dieser Konfiguration heraus ist es möglich die Membran, welche in die Pipette eingesaugt wurde, durch einen kurz anhaltenden Unterdruck zu zerreißen, um einen offenen Zugang zur Zelle zu erhalten. Durch diese Verbindung zum Zytoplasma der gepatchten Zelle kann der Stromfluss über die gesamte Zellmembran gemessen werden. Diese elektrophysiologische Konfiguration wird als *Whole-cell*-Modus bezeichnet. Dabei findet eine Vermischung

von intrazellulärer Ionenkonzentration und Pipettenlösung statt. Abhängig von der Pipettenlösung ist es möglich eine gezielte Blockade von Rezeptoren und Ionenkanälen vorzunehmen und die Zusammensetzung der einzelnen intrazellulären Ionenkonzentrationen zu beeinflussen.

Um Ionenflüsse über die Zellmembran messen zu können, wird ein chlorierter Silberdraht verwendet. Dabei wird das Prinzip der Spannungsklemme verwendet, mit dem Unterschied, dass nur eine Elektrode notwendig ist, welche mit einem Operationsverstärker (Differenzspannungs-Stromwandler) verbunden ist, der das elektrische Signal amplifiziert. In der Badlösung befindet sich eine Referenzelektrode, die mit dem Verstärker verbunden ist, wodurch ein Potential gemessen werden kann. Mit diesem Versuchsaufbau ist es außerdem möglich das Potential an der Spitze der Mikropipette festzulegen und somit auch das Potential der abgeleiteten Zelle zu kontrollieren. Im *Voltage-clamp*-Modus wird so das Haltepotential der Zelle vorgegeben. Der Netto-Ionenfluss über die Zellmembran führt zu Spannungsänderungen, die vom Operationsverstärker kompensiert werden. Die dafür benötigten Ströme können aufgezeichnet werden, welche wiederum Intensität und Dauer der Ionenbewegungen widerspiegeln.

Eine weitere Konfiguration stellt die *Current-clamp*-Methode dar. Dabei wird der Strom konstant gehalten und eine Änderung des Membranpotentials der abgeleiteten Zelle gemessen. Diese Potentialänderungen werden durch den Netto-Ionenfluss über die Zellmembran verursacht. Bei einer Potentialänderung in positive Richtung spricht man von einer Depolarisation, bei einer Potentialänderung in negative Richtung von einer Hyperpolarisation der Zellmembran. Wenn der applizierte Strom null beträgt, kann somit das Membranpotential der Zelle bestimmt werden. Findet kein Netto-Ionenfluss statt, spricht man von einem Ruhemembranpotential.

2.4 Herstellung und Befüllen von Mikropipetten

Für die elektrophysiologischen Versuche wurden Glaskapillaren aus Borosilikat (GB 150 F-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) genutzt. Diese sind mit Hilfe eines Kapillarziehgeräts (P-1000, Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA) vollautomatisch hergestellt worden. Die fertigen Mikropipetten wurden mit einer feinen Plastiknüle mit einer Intrazellulärlösung befüllt, wobei die Lösung durch Zuhilfenahme eines Filters aus PTFE-Material (Polytetrafluorethylen) mit 0,2 μm Porengröße von möglichen Verunreinigungen getrennt wurde. Entsprechend der Fragestellung kamen bei den Versuchen Kaliumgluconat- oder Cäsium-basierende Intrazellulärlösungen zur Anwendung. Die Ableitungen

der Martinotti-Zellen fanden mit Mikropipetten statt, die einen Widerstand von 4,5-9,6 M Ω hatten.

2.5 Versuchsaufbau

Für die Durchführung der Experimente wurde ein aufrechtes Mikroskop (Axio Examiner, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland) verwendet. Um die Hirnschnitte mit Nährstoffen zu versorgen ist die Kammer des Mikroskops mit Carbogen-gesättigtem ACSF umspült worden. Der Zu- und Ablauf der Flüssigkeit erfolgte mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Peristaltic Pump – Minipuls 3, Gilson International BV, Deutschland) mit einer konstanten Geschwindigkeit von 2-3 ml/Min. Die ACSF wurde während der Experimente auf eine Temperatur von 32°C erwärmt. Die Hirnschnitte wurden mit einem Gitter aus Nylonfäden (sog. *grid*) fixiert. Das Mikroskop befand sich auf einem vibrationsgedämpften Tisch (IsoSation™ Vibration Isolated Workstation, Newport Corporation, CA, USA), der von einem faradayschen Käfig (Heka Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) umschlossen wurde. So konnten einerseits ungewollte Bewegungen und andererseits elektromagnetische Störungen minimiert werden.

Eine CCD-Kamera (*Charge-coupled-device*-Kamera) (Rolera-XR, QIMAGING, Surrey, Kanada), welche oberhalb des Mikroskops angebracht war, übertrug das Bild auf einen Videomonitor. Mit einem 2,5-fachen Objektiv (EC Plan-NEOFLUAR, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) erfolgte die visuelle Identifikation des Barrel-Kortex. Mit einem Wasserimmersionsobjektiv (40-fach, LUMPlanFLN, Olympus Corporation, Tokio, Japan) wurden unter Fluoreszenzlicht die GFP-positiven Zellen der GIN-Maus in den Schichten II/III und V des Barrel-Kortex aufgesucht. Dabei wurden Zellen in einer Tiefe von 30 bis 70 μm unterhalb der Oberfläche im Hirnschnitt aufgesucht und im Anschluss unter Infrarot-Licht dargestellt.

Nach Auswahl einer Zelle wurde eine Mikropipette (Patchpipette) mit Intrazellulärlösung befüllt und in einem Elektrodenhalter mit chloriertem Silberdraht befestigt. Der Elektrodenhalter war über einen Vorverstärker an den *Patch-Clamp*-Verstärker (SEC-05X-BF, NPI Electronic GmbH, Tamm, Deutschland) angeschlossen. Elektrodenhalter und Vorverstärker befanden sich auf einem Mikromanipulator (Mini-25-XL, Luigs & Neumann Feinmechanik-Elektrodentechnik GmbH, Ratingen, Deutschland), welche über Handräder ferngesteuert werden konnten und somit eine präzise Bewegung der Patchpipette ermöglichten. Als Referenzelektrode diente ein Pellet aus Silberchlorid, welches sich in der Badlösung des Mikroskops befand.

2.5.1 Patchvorgang

In der mit Intrazellulärflüssigkeit gefüllten Patchpipette wurde vor Eintauchen in die Badlösung ein leichter Überdruck erzeugt, um Verunreinigungen der Pipettenspitze während des Patchens zu vermeiden und das Gewebe ohne Beschädigung durchdringen zu können. Nach Auffinden einer GFP-positiven Zelle unter Fluoreszenzlicht und visueller Überprüfung der Morphologie unter Infrarot-Licht wurde die Patchpipette mit Hilfe des Mikromanipulators unter Sichtkontrolle an den Schnitt herangefahren. Etwa 10 μm oberhalb des Gehirnschnittes wurde die zu patchende Zelle erneut unter Fluoreszenzlicht aufgesucht und dann der Patchvorgang im Infrarotlicht eingeleitet. Bei direktem Kontakt der Pipettenspitze mit der Zellmembran zeigte sich eine Eindellung der Zellmembran, das sogenannte *dimpling* (Abb. 2.1). Anschließend wurde der zuvor etablierte Überdruck aufgehoben, was dazu führte, dass ein Teil der Membran in die Pipettenspitze gesogen wurde und die *Cell-attached*-Konfiguration mit einem hohen elektrischen Widerstand von $>1 \text{ G}\Omega$ durch leichtes Saugen etabliert werden konnte.

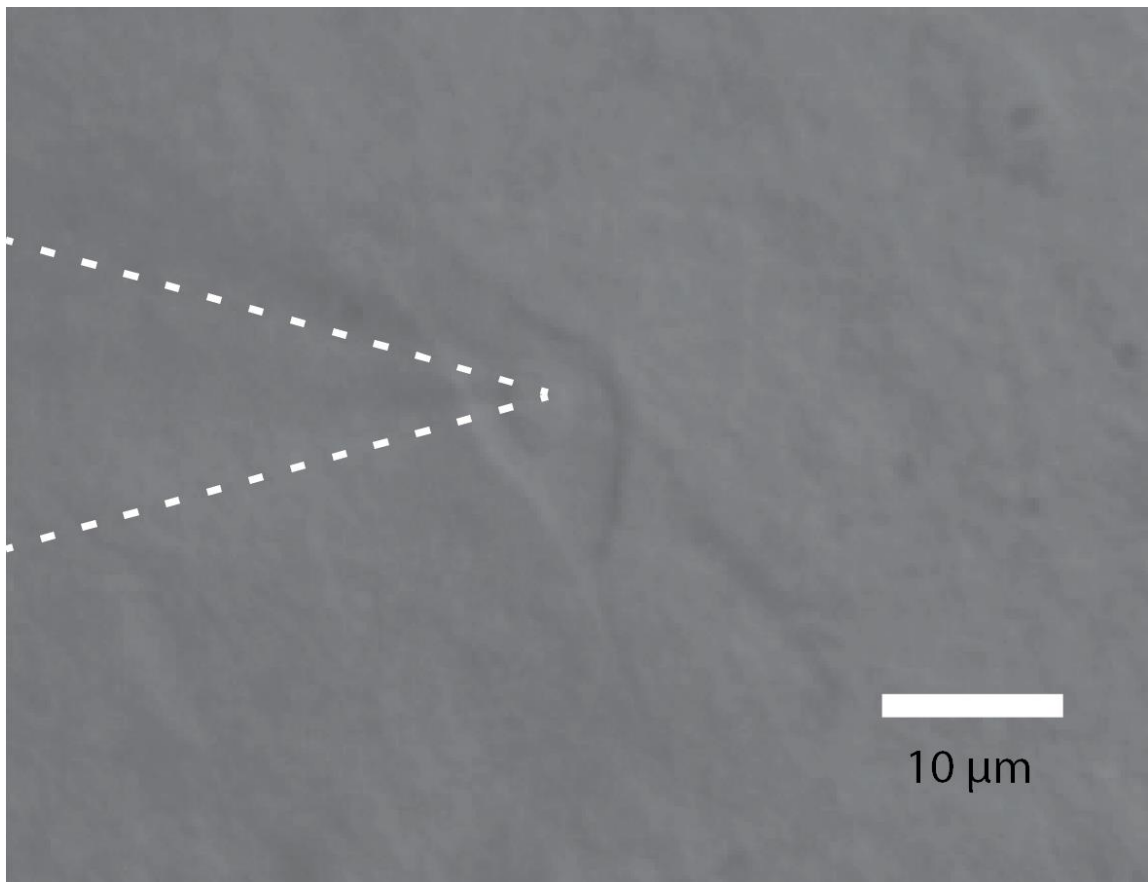


Abbildung 2.1: Dimpling an einer Martinotti-Zelle der Schicht II/III

Digitale Aufnahme des sog. *dimpling* an einer Martinotti-Zelle der Schicht II/III mittels CCD-Kamera und einem Wasserimmersionsobjektiv (40-fach) unter Infrarotlicht. Bei direktem Kontakt der Spitze der Patchpipette (weiße, gestrichelte Linie) mit der zu patchenden Zelle, entsteht eine Einstülpung der Zellmembran (runde Struktur an der Pipettenspitze).

Durch die Applikation eines kurzen Unterdrucks konnte dieses Membranstück eingerissen und ein direkter Zugang zum Zytoplasma der abgeleiteten Zelle etabliert werden, was der *Whole-cell*-Konfiguration entspricht. Das initial abgeleitete Membranpotential lag zwischen -60 mV und -72 mV. Alle durchgeführten Versuche wurden in der *Whole-cell*-Konfiguration durchgeführt. Bei Ableitungen mit kaliumglukonatbasierter Intrazellulärlösung erfolgte anschließend eine elektrophysiologische Charakterisierung der Zellen (Abs. 2.6).

2.5.2 Badapplikationen

Eine Möglichkeit für die Applikation von extrazellulär wirksamen Pharmaka ist die Badapplikation. Dabei werden die Pharmaka in ACSF gelöst und mit Hilfe der peristaltischen Pumpe über den Zulauf der Badlösung hinzugegeben. Diese Methode wurde bei den Experimenten für die extrazelluläre Applikation von Pharmaka genutzt, wohingegen die intrazelluläre Applikation über die Zusammensetzung der Intrazellulärlösung erfolgte.

In den Experimenten, bei denen die Frage nach dem Vorhandensein von GABA_B-Rezeptoren beantwortet werden sollte (Abs. 3.2) fanden die Messungen im *Current-clamp*-Modus statt um die Auswirkungen der Applikation von Baclofen – als spezifischer Agonist des Rezeptors – auf das Membranpotential messen zu können. Dabei erfolgte während der kontinuierlichen Aufzeichnung alle 10 Sekunden die Applikation eines Strompulses von 10 pA, um zusätzlich den Eingangswiderstand der Zelle über die Applikationsdauer beobachten zu können.

2.5.3 Elektrische Stimulation

Für die extrazelluläre elektrische Stimulation wurde eine bipolare Elektrode (115 µm Raster, Matrix Microelectrode, FHC Bowdoinham, ME 04008, USA) auf einem zweiten Mikromanipulator befestigt und in eine Entfernung von 20-50 µm zu der abgeleiteten Zelle positioniert (Abb. 2.2). Die Martinotti-Zellen, bei denen eine extrazelluläre elektrische Stimulation erfolgte, wurden mit einer cäsiumbasierten Intrazellulärlösung abgeleitet und im *Voltage-clamp*-Modus bei +10 mV gehalten. Cäsium führt zu einer Blockade der Kaliumkanäle und verhindert so eine Hyperpolarisation der Zelle. Durch das Haltepotential von +10 mV wurde der elektrochemische Gradient für Chloridionen erhöht, um auch kleine Ionenbewegungen durch weiter distal lokalisierte Synapsen detektieren zu können.

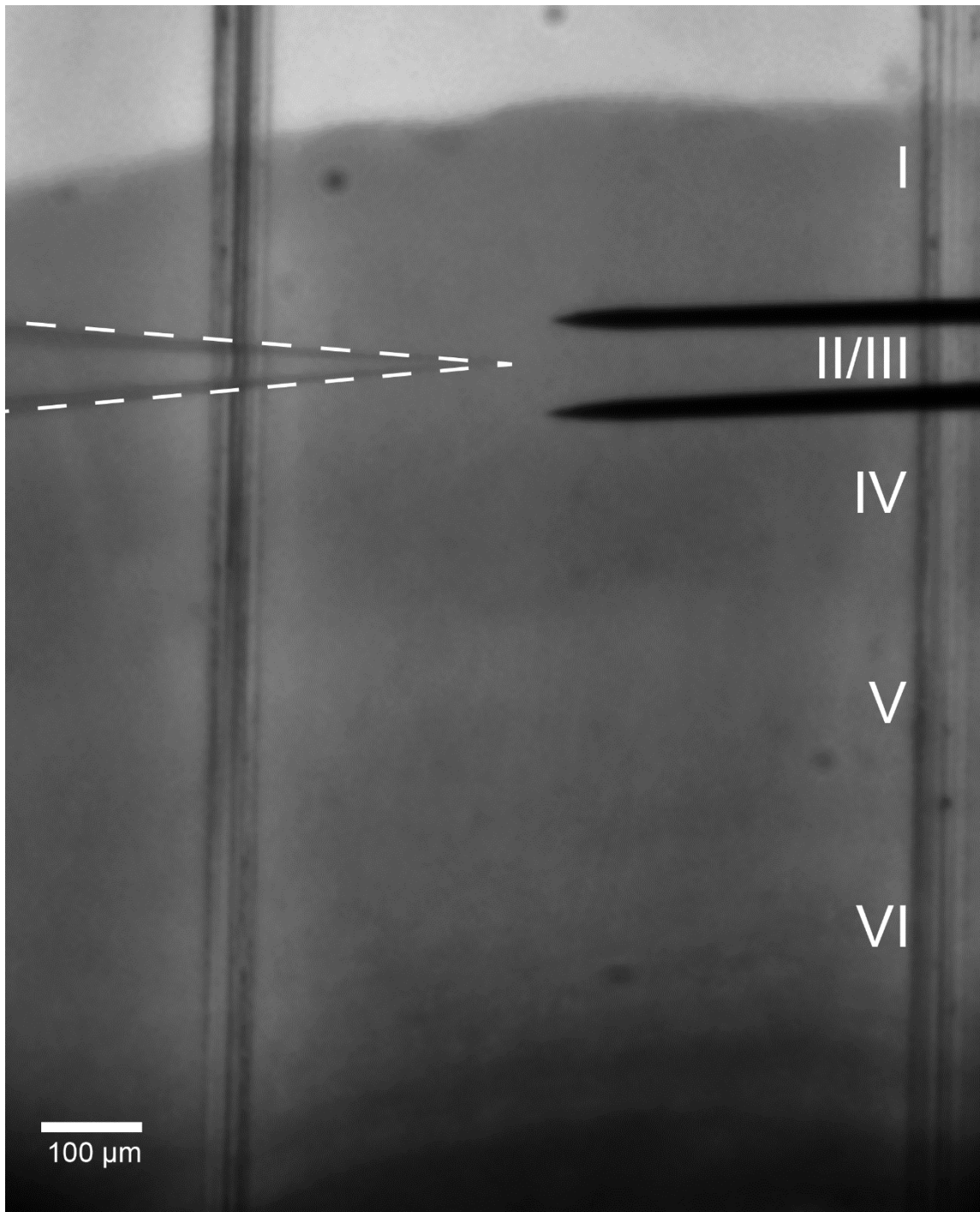


Abbildung 2.2: Versuchsaufbau elektrische Stimulation

Digitale Aufnahme mit der CCD-Kamera bei einer Übersichtsvergrößerung (Objektiv 2,5-fach). Auf der linken Seite ist die Position der Patchpipette (weiße gestrichelte Linien) und auf der rechten Seite die bipolare Stimulationselektrode dargestellt (schwarz). Die römischen Ziffern markieren die kortikalen Schichten.

Um ausschließlich inhibitorische Eingänge auf die Martinotti-Zellen zu messen, wurden die wichtigsten exzitatorischen Rezeptoren pharmakologisch blockiert. Für die Blockade der glutamatergen Transmission durch NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren wurden die spezifischen Antagonisten NBQX und AP-5 eingewaschen. Unter diesen Bedingungen konnte die Wirkung von Baclofen, CGP52432, Gabazin und Ca^{2+} -armer ACSF auf die synaptische inhibitorische Transmission untersucht werden (Abs. 3.3 und 3.4).

Bei der elektrischen Stimulation wurde darauf geachtet, dass nur eine geringe Anzahl inhibitorischer Fasern stimuliert wurden. Wenn sich in den Ableitungen IPSCs überlagert haben, wurde eine andere Position der Stimulationselektrode gewählt. Die applizierte Stimationsstromstärke der bipolaren Elektrode wurde so eingestellt, dass die evozierten IPSCs eine Amplitude zwischen 80-100 pA besitzen und somit unterhalb der maximal erreichbaren Amplitudengröße lagen. Diese Konfiguration ist durch Lageänderung der Stimulationselektrode und Anpassen der Stimationsstärke erreicht worden. Über die Kontrolle der Latenzzeit zwischen Auftreten des Stimulusartefaktes und der zellulären Antwort konnte eine direkte Stimulation des Somas ausgeschlossen werden und in nachfolgenden Versuchen (Abs. 3.3) nachgewiesen werden, dass die IPSCs durch synaptische Transmission entstanden sind.

Im Fokus der Untersuchung standen einzeln ausgelöste IPSCs, welche für die Analyse über 20 Wiederholungen gemittelt wurden und IPSC unter repetitiver Stimulation (*train*-Stimulationen). In der *train*-Stimulation wurden die IPSCs in den Frequenzen 1 Hz, 8 Hz und 40 Hz ausgelöst und über 20 Wiederholungen gemittelt. Beide Stimationsbedingungen wurden je nach Versuchsvorhaben vor (Referenz), während (Pharmaka) und nach (Auswasch) der Applikation durchgeführt. Die Stimationsdauer einer einzelnen Stimulation betrug 100 μs . Der Abstand zwischen den Wiederholungen wurde auf 15 Sekunden eingestellt, um eine annähernd vollständige Erholung des Vesikelpools in der Präsynapse und der postsynaptischen Rezeptoren zu gewährleisten.

2.5.4 Identifizierung der Martinotti-Zellen

In der vorliegenden Studie wurde die GIN-Maus (Oliva et al. 2000) verwendet. Die mittels eGFP markierten Neurone repräsentieren überwiegend Somatostatin-positive Martinotti-Zellen, insbesondere in den Schichten II/III und V (Ma et al. 2006; Walker et al. 2016). Alle hier erhobenen Daten stammen von Ableitungen GFP-positiver Zellen. In den durchgeführten Experimenten mit einer kaliumglukonatbasierten Intrazellulärlösung wurde nach Erreichen der *Whole-cell*-Konfiguration eine elektrophysiologische Charakterisierung der abgeleiteten Zelle durchgeführt (Abs. 2.6). Zusätzlich zur genetischen und elektrophysiologischen

Identifizierung der Martinotti-Zellen erfolgte im Anschluss an die Experimente eine morphologische Darstellung. Dafür wurde der verwendeten intrazellulären Lösung (Abs. 2.9) 0,1-0,2 % Biocytin hinzugefügt. Dieses ist ein Carbonsäureamid, welches aus dem Vitamin Biotin und der Aminosäure Lysin besteht und keinen Einfluss auf das elektrophysiologische Verhalten der Neurone hat. Daher wird es seit den späten 1980er Jahren zur morphologischen Darstellung von insbesondere Neuronen genutzt (King et al. 1989). Bei den Ableitungen der Zellen wurde darauf geachtet, dass ein mindestens 20-minütiger Austausch zwischen Zytoplasma und intrazellulärer Lösung stattfinden konnte. Intrazelluläre Transportproteine ermöglichten in dieser Zeit die Verteilung des Biocytins in Soma, Dendriten und Axon der Zelle. Nach Durchführung der Experimente wurden die Hirnschnitte über Nacht mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung (PFA) bei einer Temperatur von 4°C zur Fixierung gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Hirnschnitte mehrfach mit PB-Puffer (*phosphate buffer*, Phosphatpuffer) gespült und in diesem für die weitere Färbung bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt.

Zur Visualisierung der Morphologie der GFP-positiven Zellen wurde eine Färbung mit der ABC-DAB- (Avidin-Biotin-Komplex-3,3'-Diamino-benzidin-tetradhydrochlorid) und Cytochromoxidase-Methode durchgeführt (Proenneke et al. 2015; Walker 2016). Dazu erfolgte eine Vorbehandlung der Hirnschnitte mit 25%iger Saccharoselösung für 90 Minuten bei Raumtemperatur, welche anschließend mit flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, bevor die Präparate erneut mit PB gespült wurden. Um die im Gewebe vor allem in den Erythrozyten vorkommende Peroxidase zu inhibieren, wurden sie danach mit 1%igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches in PB gelöst war, gespült. Um den Schnitt von Rückständen zu reinigen, erfolgten anschließend drei Spülungen mit PB, eine mit TB (*tris buffer*, Trispuffer) und eine mit TBS (*tris buffered saline*, Trisgepufferte Saline) (Abs. 2.9). Anschließend erfolgte die Inkubation der Schnitte in einer 1:400 verdünnten ABC-Lösung (Vectastain ABC KIT, Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA) in TBS über Nacht und bei einer Temperatur von 4°C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut dreimal mit TBS und zweimal mit TB gespült. Nach diesem Schritt erfolgte die Färbung mit DAB-Lösung, indem nach 1-minütiger Inkubation der Hirnschnitte in der Lösung die Reaktion mit 300 μ l 1%igem H_2O_2 in TB in Gang gesetzt wurde. Unter einem Lichtmikroskop wurde die Intensität der Färbung kontrolliert, bevor die chemische Reaktion durch Auswaschen des Wasserstoffperoxides mit TB beendet wurde. Es folgten zwei Spülungen mit PB. Um die kortikalen Schichten und einzelnen *barrels* darstellen zu können wurde im Anschluss an die ABC-DAB-Färbung eine Cytochromoxidasefärbung (CO-Färbung) durchgeführt (Petersen und Sakmann 2000). Die Schnitte wurden mit 1 ml CO-Lösung (Abs. 2.9)

versetzt und in einem Wasserbad bei 39-41°C inkubiert. So entwickelte sich in den nächsten Stunden eine Braunfärbung, welche insbesondere die synapsenreiche Region der *barrels* anfärbt (Wong-Riley und Welt 1980; Petersen und Sakmann 2000). Die Reaktion wurde nach mikroskopischer Kontrolle bei Erreichen des gewünschten Färbegrades durch eine Spülung mit PB beendet.

Eine Intensivierung der durchgeführten DAB-Färbung wurde im Anschluss durch eine Ver Silberung nach Bender (Romeis 2015, Protokoll in Abs. 2.9) durchgeführt. Nach Eindeckeln der Schnitte mit Aqua Poly-Mount (Polyscience, Warrington, Pennsylvania, USA) wurden diese bei einer Temperatur von 4°C getrocknet und bis zur morphologischen Foto-Rekonstruktion aufbewahrt. Diese erfolgte mit einem videogestützten Lichtmikroskop (Zeiss Axio Imager, Carl Zeiss Micro-Imaging GmbH, Jena, Deutschland).

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Färbungen wurden von einer Technischen Assistentin (Frau Patricia Sprysch) des Institutes für Neuroanatomie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

2.6 Elektrophysiologische Analyse der Membraneigenschaften

Bei den Experimenten mit einer kaliumglukonatbasierten Intrazellulärlösung konnte eine elektrophysiologische Analyse der Membraneigenschaften durchgeführt werden. Nach Erreichen einer stabilen Ableitung in der *Whole-cell*-Konfiguration wurde der Serienwiderstand mittels einer mindestens 100 pA starken Strominjektion durch die schnelle und langsame Komponente am Verstärker kompensiert. Anschließend konnten die passiven Eigenschaften der abgeleiteten Zelle im *Current-clamp*-Modus aufgezeichnet werden. Dazu wurden zehn Stromimpulse einer Stromstärke von -10 pA und zehn Stromimpulse einer Stromstärke von -50 pA appliziert. Dabei wurden die Werte für Ruhemembranpotential (V_{rest}), Eingangswiderstand (R_{in}) Membrankapazität (C_m) für Membranzeitkonstante (τ_m) bestimmt. Im Anschluss erfolgte die Analyse der Strom-Spannungs-Beziehung sowie des Feuermusters, indem Stromimpulse einer Stärke von -100 pA bis +300 pA in 10 pA-Schritten appliziert und die zelluläre Reaktion aufgezeichnet wurde. Konnte das Feuer- und Adaptationsverhalten in diesem Bereich nicht ausreichend dargestellt werden, beispielsweise aufgrund eines hohen Eingangswiderstandes der abgeleiteten Zelle, wurden anschließend einzelne Stromimpulse beginnend mit +300 pA in 10 pA-Schritten appliziert.

An der Aktionspotentialschwelle (Rheobase) erfolgte die Analyse der Aktionspotentiale. Hierfür wurde die Intensität der Strominjektion unterschwellig eingestellt (kein Auslösen eines AP) und anschließend in 1-5 pA Schritten gesteigert bis ein einzelnes Aktionspotential

ausgelöst wurde. Die Messung wurde fünfmal mit der gleichen Stromstärke wiederholt. Aus den gemittelten Werten konnten Aktionspotentialschwelle, Aktionspotentialamplitude, Aktionspotential-Latenzzeit, Zeit bis zum Erreichen des Amplitudenmaximums des APs, die maximal erreichte Steigung, Dauer des Aktionspotentials, Amplitude der Nachhyperpolarisation, Dauer der schnellen Nachhyperpolarisation, Nachdepolarisationsdauer und zweite Nachhyperpolarisation bestimmt werden. Zusätzlich wurden diese elektrophysiologischen Parameter auch nach dem Einwasch von Pharmaka und nach deren Auswasch erhoben und miteinander verglichen.

Bei Zellen, die mit einer cäsiumbasierten Intrazellulärlösung gepatcht wurden, fand nur eine Charakterisierung anhand der passiven elektrophysiologischen Eigenschaften der Zelle statt, da durch die intrazelluläre Blockade von spannungsabhängigen Kaliumkanälen keine Analyse der Aktionspotentiale möglich ist.

2.7 Auswertung der postsynaptischen Ströme

Bei der Auswertung der gemessenen postsynaptischen Ströme (*postsynaptic currents*, PSCs) wurden stets 20 Wiederholungen bei gleicher Stimulationsstärke gemittelt. Für die PSCs wurden die folgenden Parameter bestimmt: Amplitude (Baseline bis max. Amplitude), Integral (Fläche unter PSC), Latenz (Zeit vom Stimulus bis Beginn PSC), Anstiegszeit (Zeit von Beginn bis Maximum des PSC), Steigung (durchschnittliche Steigung des PSC), max. Steigung des PSC, halbmaximale Breite (Zeit in der 50 % der Amplitude überschritten waren). Zusätzlich wurde aus den Ableitungen das Haltepotential der Zelle, der Eingangswiderstand (aus -10 pA Pulsen vor Stimulus) gemessen und aus dem Stimulator die Stimulationsstärke notiert. Diese Werte wurden sowohl bei den Einzelstimulationen als auch bei den *train*-Stimulationen mit den Frequenzen von 1 Hz, 8 Hz und 40 Hz ermittelt. Bei den Frequenzen 8 und 40 Hz kam es zu einer Überlagerung der einzelnen PSCs, hier wurden die Werte durch eine Annäherung mit Hilfe einer Exponentialfunktion zum tatsächlichen Verlauf der aufgezeichneten Werte ermittelt (sog. *fitting*), d.h. die Amplituden wurden nicht einfach aufsummiert, sondern für jeden einzelnen PSC bestimmt.

2.8 Datenanalyse und statistische Auswertung

2.8.1 Datenanalyse

Die erhobenen Rohdaten wurden mit dem Datenverarbeitungsprogramm CED Signal 5.09 (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, England) aufgezeichnet und ausgewertet. Die dafür benötigten Skripte wurden freundlicherweise von Dr. Martin Möck aus dem Institut für Neuroanatomie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt. Eine weitergehende Analyse und statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Sigma Plot 13.0 (Synstat Software, San Jose, USA) und MS Excel 2013 (Microsoft Corporation, WA, USA). Eine graphische Aufarbeitung der in der Arbeit dargestellten Originalspuren und Abbildungen erfolgte mit Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems Incorporated, CA, USA).

2.8.2 Statistik

Zuerst wurden die Daten auf Normalverteilung mit dem Shapiro Wilk Test getestet. Waren die beiden zu vergleichenden Gruppen nicht normalverteilt, kam ein Wilcoxon Signed Rank Test zur Anwendung. Bei unabhängigen normalverteilten Gruppen wurde ein einseitiger t-Test genutzt. Bei abhängigen (z.B. vor, während und nach Pharmaka) normalverteilten Gruppen wurde ein gepaarter t-Test zur Berechnung der p-Werte genutzt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die in dieser Arbeit angegebenen Werte stellen den Mittelwert und SEM (*standard error of the mean*, Standardabweichung vom Mittelwert) dar, Ausnahmen sind angegeben.

2.9 Lösungen und Pharmaka

Für die elektrophysiologischen Versuche wurden verschiedene extrazelluläre Lösungen verwendet. Die Herstellung der thalamokortikalen Schnitte fand unter Verwendung einer Präparationslösung statt, deren Ionenzusammensetzung die Erregbarkeit des neuronalen Netzwerkes herabsetzt und eine schonende Präparation ermöglicht. Während der Experimente wurden die akuten Hirnschnitte mit ACSF umspült, welche eine möglichst physiologische Erregbarkeit der Nervenzellen gewährleistete. Bei den Kontrollexperimenten (Abs. 3.3) wurde eine Ca^{2+} -arme ACSF genutzt, um nachzuweisen, dass die induzierten Ströme synaptischen Ursprungs sind. Alle extrazellulären Lösungen wurden mit Carbogen begast, um eine Stabilisierung des O_2 -Gehaltes und des pH-Wertes während der Experimente zu gewährleisten.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung von Präparationslösung und ACSF

	Präparationslösung	ACSF	Ca ²⁺ -arme ACSF
NaCl	87 mM	125 mM	125 mM
NaH ₂ PO ₄	1,25 mM	1,25 mM	1,25 mM
KCl	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
Glukose	10 mM	25 mM	25 mM
Saccharose	75 mM		
CaCl ₂	0,5 mM	2 mM	0,2 mM
MgCl ₂	7 mM	1 mM	1 mM
NaHCO ₃	26 mM	26 mM	26 mM

Während der Versuche kam es zum Austausch der natürlichen intrazellulären Ionenzusammensetzung durch die verwendeten Intrazellulärlösungen. Die elektrophysiologische Charakterisierung der intrinsischen Membraneigenschaften von Martinotti-Zellen, sowie deren pharmakologische Beeinflussung durch Baclofen, fand im *Current-clamp*-Modus mit einer Kaliumglukonat-basierten Intrazellulärlösung statt (Abs. 3.1 und 3.2). Für die elektrischen Stimulationen im *Voltage-clamp*-Modus wurde hingegen eine Cäsium-basierte Intrazellulärlösung verwendet (Abs. 3.3 und 3.4).

Tabelle 2.2: Zusammensetzung verwendeter Intrazellulärlösungen

	Kaliumglukonat-basiert	Cäsium-basiert
K-Glukonat	135 mM	
KCl	5 mM	
CsMeSO ₄		135 mM
CsCl		5 mM
EGTA	0,5 mM	0,5 mM
HEPES	10 mM	10 mM
MgATP	4 mM	4 mM
NaGTP	0,3 mM	0,3 mM
Na-P-creatin	10 mM	10 mM

Zur Blockade oder Aktivierung unterschiedlicher Rezeptoren und Ionenkanäle wurden verschiedene Rezeptoragonisten und -antagonisten eingesetzt, die extrazellulär mit der Badlösung appliziert wurden oder der Intrazellulärlösung hinzugegeben wurden (Tab. 2.3). QX314-Cl wurde als intrazellulärer spannungsabhängiger Natriumkanalblocker verwendet, um Kontaminationen des PSC durch spontane Aktionspotentiale zu unterbinden.

Tabelle 2.3: Übersicht verwendeter Pharmaka

Kurzbezeichnung	Chemische Bezeichnung	Funktion
AP5	D-2-Amino-5-phosphonopentaoic acid	Spezifischer NMDA-Rezeptor-Antagonist
Baclofen	(DL)-4-Amino-3-(4-chlorphenyl)butter acid	Spezifischer GABA _B -Rezeptor-Agonist
CGP52423	3-[[[(3,4-Dichlorophenyl)methyl]amino]propyl]diethoxymethyl)phosphinic acid	Spezifischer GABA _B -Rezeptor-Antagonist
Gabazin	6-imino-3-(4-methoxyphenyl)-1,6-Hyridazinebutanoic acid hydrobromide	Spezifischer GABA _A -Rezeptor-Agonist
NBQX	2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzofquinoxaline-7-sulfonamide disodium salt	Antagonist ionotroper Glutamat-Rezeptoren
QX314-Cl	2-[(2,6-dimethylphenyl)amino]-N,N,N-triethyl-2-oxoethanaminium chloride	Intrazelluläre Blockade spannungsabhängiger Na-Kanäle

Bei der Herstellung der fixierten Hirnschnitte wurden drei verschiedene Pufferlösungen verwendet und die Färbungen entsprechend der Protokolle (Abs. 2.5.4) von einer Technischen

Assistentin (Frau Patricia Sprysch) des Institutes für Neuroanatomie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

Tabelle 2.4: Übersicht verwendeter Pufferlösungen

Kurzbezeichnung	Zusammensetzung
Phosphatpuffer (PB)	0,1 M, pH 7,4 Zusammensetzung: 35,61g Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O auf 1 l Aq. dest.
Trispuffer (TB)	0,05 M, pH 7,6 Zusammensetzung: 6,06 g Tris HCl + 1,39 g Tris Base auf 1 l Aq. dest.
Trisgepufferte Saline (TBS)	TB + 0,09 % NaCl

Tabelle 2.5 Protokoll der Versilberung nach Kevin Bender zur Intensivierung einer DAB-Färbung:

Arbeitsschritt	Dauer
2x spülen mit Aq. dest.	
5 % Thioglycolsäure in Aq. dest.	1 (bis 1,5) Stunden
3x spülen mit Aq. dest.	insgesamt 10 min
1,42 % Silbernitratlsg. in Aq. dest.	30 min bei 56°C (Wasserbad)
3x spülen mit Aq. dest.	insgesamt 10 min
0,2 % Goldchloridlsg. in Aq. dest. (aus 1%iger Stammlsg.)	10 min bei RT
3x spülen mit Aq. dest.	insgesamt 10 min
5 % Na-Thiosulfatlsg.	5 min bei RT
3x spülen mit Aq. dest. (oder 2x Aq. dest. + 1x TB)	5 min

3 Ergebnisse

Diese Arbeit befasst sich mit der GABA-vermittelten Inhibition auf Martinotti-Zellen im primär somatosensorischen (Barrel-)Kortex der Maus. Sie gliedert sich in vier Hauptteile: die Identifizierung der Zielzellen im Barrel-Kortex, dem Nachweis von GABA_B-Rezeptoren auf Martinotti-Zellen, der Bestimmung von evozierten inhibitorischen postsynaptischen Strömen an Martinotti-Zellen und deren Modulation. Dabei sollte insbesondere die GABA_B-vermittelte Modulation der Kurzzeitplastizität charakterisiert werden. Hierfür wurden *Whole-cell-patch-clamp*-Ableitungen von Martinotti-Zellen der kortikalen Schichten II/III und V durchgeführt, um das elektrophysiologische Verhalten der Prä- und Postsynapse zu untersuchen.

3.1 Identifizierung der Martinotti-Zellen im Barrel-Kortex

In den angefertigten akuten thalamokortikalen Hirnschnitten im Bereich des Barrel-Kortex der GIN-Maus wurden mit Hilfe einer Fluoreszenzlampe GFP-positive Zellen aufgesucht (Abb. 3.1 A). In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die GFP-positiven Zellen Somatostatin exprimieren und hauptsächlich Martinotti-Zellen repräsentieren (Walker et al. 2016). Diese Zellen wurden danach unter Infrarotlicht aufgesucht (Abb. 3.1 B) und in der *Whole-cell*-Konfiguration abgeleitet. Sobald eine stabile Ableitung etabliert werden konnte, wurde das GFP-positive Signal der abgeleiteten Zelle im Fluoreszenzlicht kontrolliert (Abb. 3.1 A und B). Zellen, die mit einer Kaliumgluconat-basierten intrazellulären Lösung abgeleitet wurden ($n = 14$), konnten während der Experimente elektrophysiologisch charakterisiert werden (Tab. 3.1). Bei Zellen, die mit einer Cäsium-basierten intrazellulären Lösung abgeleitet wurden, konnten nur passive elektrophysiologische Eigenschaften untersucht werden, da Cäsium Kaliumkanäle blockiert und somit die Membraneigenschaften der Zellen verändert. Verglichen wurden Ruhemembranpotential, Eingangswiderstand, Rheobase, Feuerschwelle und AP-Amplitude zwischen MC der Schicht II/III ($n = 8$) und MC der Schicht V ($n = 6$). Die Amplitude des Aktionspotentials wurde jeweils von der Feuerschwelle bis zum Amplitudenmaximum gemessen. Dabei ergab sich für Martinotti-Zellen der Schicht II/III ein Ruhemembranpotential von $-60,71 \pm 2,01$ mV, für Schicht V MC von $-63,07 \pm 3,26$ mV. Der gemessene passive Eingangswiderstand von MC betrug in Schicht II/III $153,91 \pm 64,13$ M Ω bzw. $133,20 \pm 58,15$ M Ω in Schicht V. Die benötigte Stromstärke um ein einzelnes Aktionspotential auszulösen (Rheobase) lag für MC der Schicht II/III bei $114,63 \pm 79,56$ pA, in Schicht V bei $141,22 \pm 101,36$ pA. Die Feuerschwelle betrug dabei für

MC der Schicht II/III $-39,64 \pm 1,94$ mV und für Schicht V $-41,81 \pm 2,10$ mV. Des Weiteren lag die Aktionspotentialamplitude bei Martinotti-Zellen der Schicht II/III bei $70,40 \pm 8,90$ mV bzw. bei $70,94 \pm 9,33$ mV für MC der Schicht V. Keiner dieser erhobenen elektrophysiologischen Parameter zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den abgeleiteten Martinotti-Zellen der Schichten II/III und V ($p > 0,05$ Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Elektrophysiologische Eigenschaften von Martinotti-Zellen

Parameter	Schicht II/III	Schicht V	p-Wert
	n = 8	n = 6	
Ruhemembranpotential (mV)	$-60,71 \pm 2,01$	$-63,07 \pm 3,26$	0,350
Eingangswiderstand (M Ω)	$153,91 \pm 64,13$	$133,20 \pm 58,15$	0,546
Rheobase (pA)	$114,63 \pm 79,56$	$141,22 \pm 101,36$	0,592
Feuerschwelle (mV)	$-39,64 \pm 1,94$	$-41,81 \pm 2,10$	0,0677
AP-Amplitude (mV)	$70,40 \pm 8,90$	$70,94 \pm 9,33$	0,913

Des Weiteren konnte bei allen 14 abgeleiteten MC das charakteristische adaptierende Feuerverhalten, infolge einer überschwelligeren Stromapplikation für eine Dauer von 1s, beobachtet werden (Abb. 3.1 C). Das adaptierende Feuermuster ist durch eine Zunahme der zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Aktionspotentialen gekennzeichnet und charakteristisch für Martinotti-Zellen.

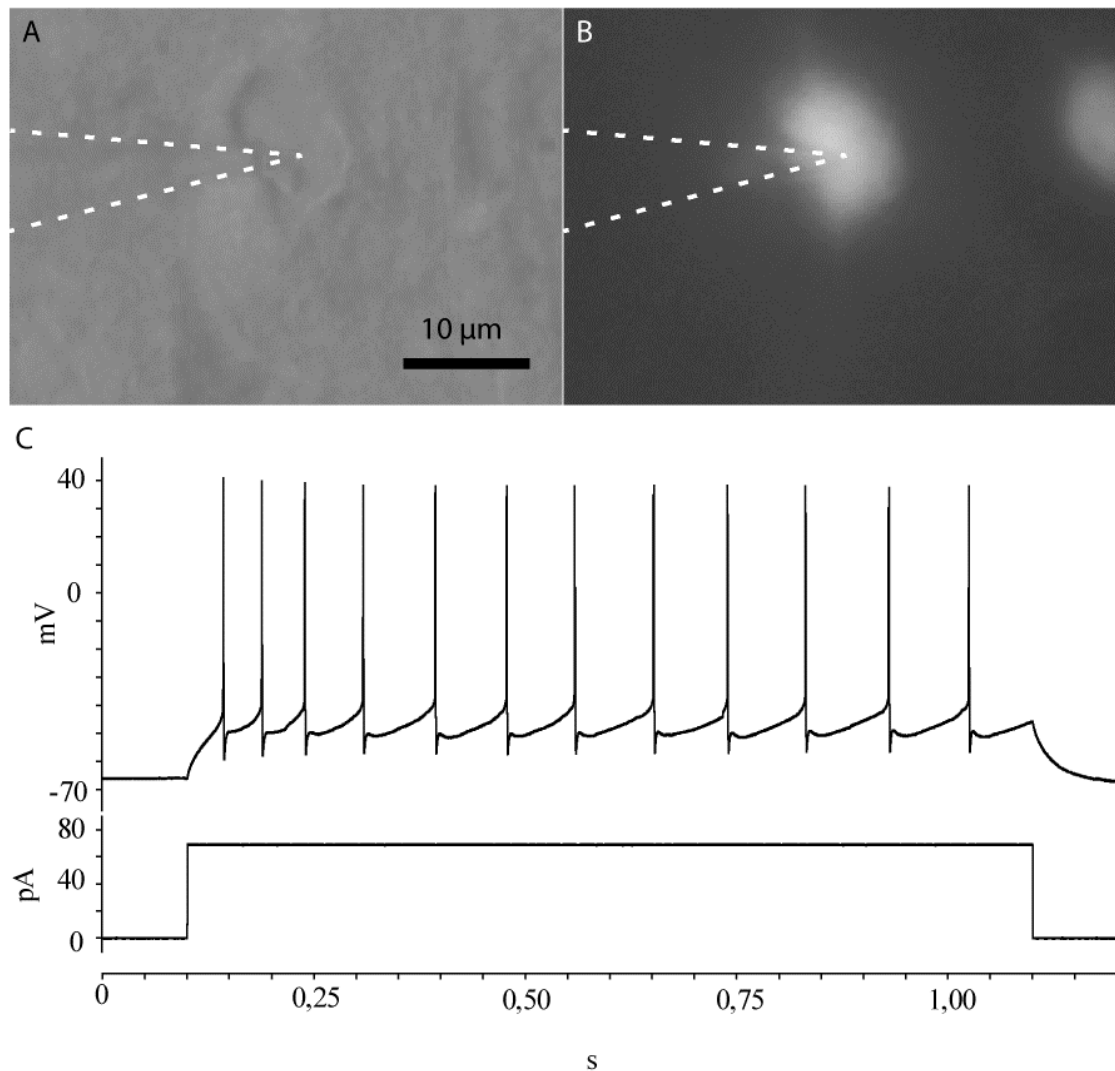


Abbildung 3.1: Identifizierung von Martinotti-Zellen

(A) + (B) Lichtmikroskopische Darstellung einer Martinotti-Zelle der Schicht II/III des Barrel-Kortex bei 400-facher Vergrößerung. **(A)** Darstellung der abgeleiteten Zelle im Infrarotlicht während des Patchvorgangs. **(B)** Dieselbe Zelle wie in **(A)** unter Fluoreszenzlicht in der GIN-Maus. **(C)** Adaptives Feuerverhalten einer MC. Die Stimulation erfolgte durch einen Strompuls von 70 pA über eine Dauer von einer Sekunde. Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Aktionspotentialen nahm dabei zu.

Alle abgeleiteten Zellen wurden während der Experimente mit Biocytin gefüllt und konnten anschließend mit der DAB-ABC-Färbetechnik lichtmikroskopisch dargestellt werden (Abb. 3.2). Auf diese Weise wurden unter Berücksichtigung der Lokalisation fassartiger Neuronensammlungen (sog. *barrels*) in der Schicht IV die Kortexschichten (I-VI) und die typische Morphologie der Martinotti-Zellen überprüft. Charakteristisch für diesen Typ von Interneuronen ist das bis in Schicht I aufsteigende Axon und dessen weitreichende Verzweigung in der obersten Kortexschicht sowie ein multipolarer Dendritenbaum, welcher von dem polygonalen Zellkörper der MC ausgeht.

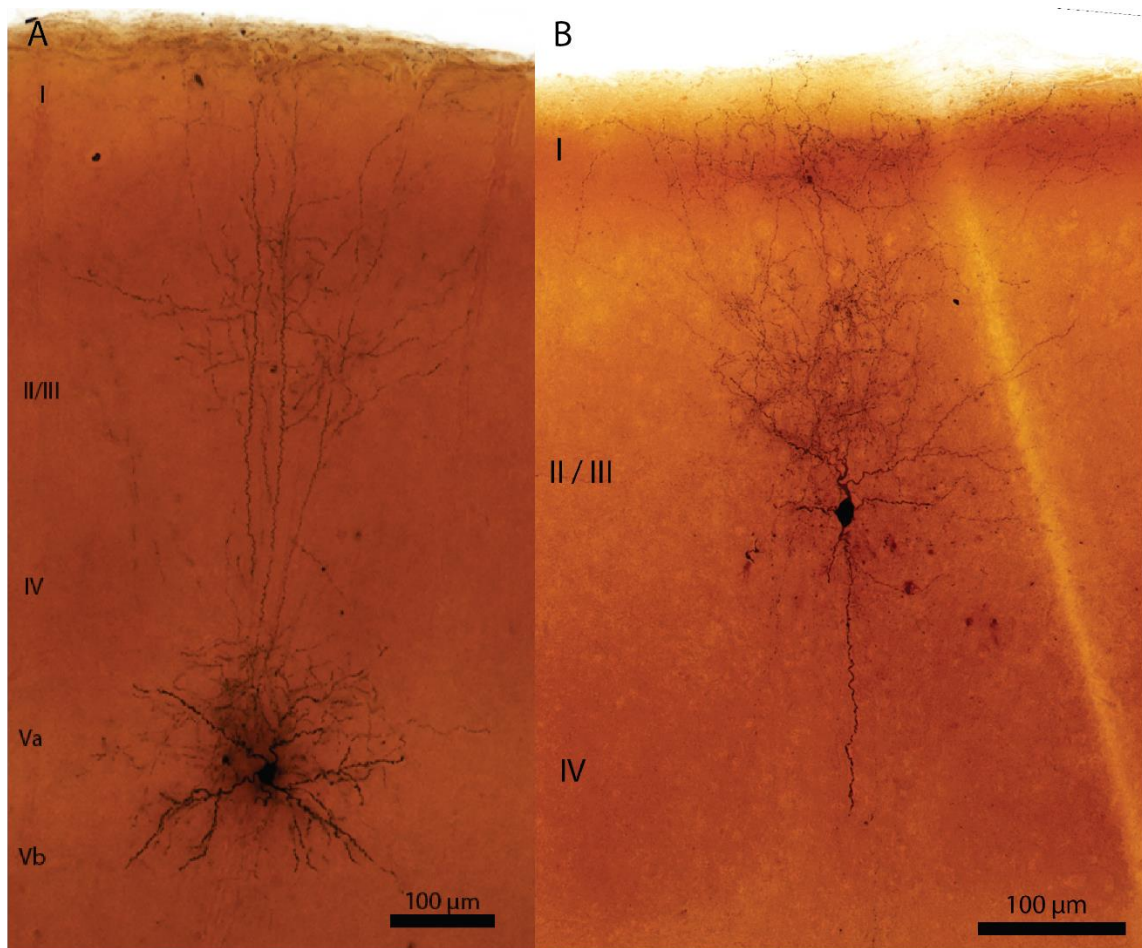


Abbildung 3.2: Fotorekonstruktion abgeleiteter MC nach DAB-ABC-Färbung

Fotorekonstruktionen zweier abgeleiteter MC nach erfolgter DAB-ABC-Färbung aus der Schicht V **(A)** und Schicht II/III **(B)** im primär somatosensorischen Kortex. Zu sehen ist die charakteristische Morphologie der Martinotti-Zellen mit einem ovalen Soma und einem aufsteigenden Axon bis in Schicht I, sowie dessen verzweigten Axonbaum insbesondere in Schicht I. Ebenfalls zu erkennen sind die multipolaren dendritischen Ausläufer. Römische Ziffern beschreiben die kortikalen Schichten.

3.2 Physiologischer Nachweis von GABA_B-Rezeptoren auf Martinotti-Zellen

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob Martinotti-Zellen der Schichten II/III und V metabotrope GABA-Rezeptoren exprimieren. Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit ein schichtenspezifischer Unterschied im Reaktionsverhalten der Martinotti-Zellen infolge einer Aktivierung des GABA_B-Rezeptors existiert. Um dieser Fragestellung nachzugehen wurden 14 Martinotti-Zellen des primär somatosensorischen

(Barrel-)Kortex der Maus in der Schicht II/III ($n = 8$) und V ($n = 6$) mittels einer Badapplikation von Baclofen (spezifischer GABA_B-Rezeptor-Agonist) auf das Vorhandensein von GABA_B-Rezeptoren überprüft.

Alle Ableitungen wurden in der *Whole-cell*-Konfiguration im *Current-clamp*-Modus aufgezeichnet. Intrazellulär wurde eine Kaliumglukonat-basierte Lösung verwendet, extrazellulär ACSF und zusätzlich NBQX, um die exzitatorischen synaptischen Eingänge pharmakologisch zu blockieren. Nach der Identifizierung der Zielzellen als Martinotti-Zellen wurden die intrinsischen elektrophysiologischen Eigenschaften bestimmt und eine Charakterisierung der Zellen durchgeführt. Anschließend wurde Baclofen in einer Konzentration von 25 μM in ACSF gelöst und über die Badlösung appliziert. Zeitgleich wurden die Änderungen des Membranpotentials der abgeleiteten Zelle über eine Dauer von 10 Minuten aufgezeichnet (Abb. 3.3). Bei den negativen Ausschlägen handelt es sich um applizierte Strompulse von 10 pA für eine Dauer von 200 ms in Abständen von jeweils 6 Sekunden, die eine Messung des Eingangswiderstandes der abgeleiteten Zelle während der Badapplikation ermöglichten.

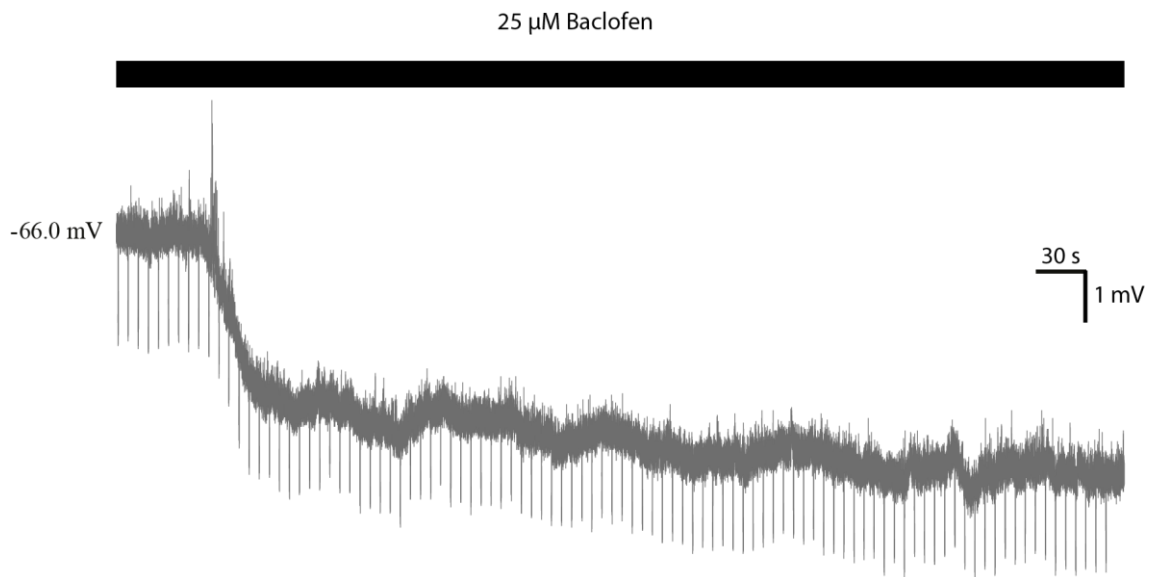


Abbildung 3.3: Änderung des Membranpotentials durch Baclofen

Änderung des Membranpotentials in der *Whole-cell*-Konfiguration einer Martinotti-Zelle der Schicht V des somatosensorischen Kortex während der Badapplikation von 25 μM Baclofen in Abhängigkeit von der Dauer der Applikation. Die Badapplikation beginnt bei 0 Sekunden. Bei den negativen Ausschlägen handelt es sich um applizierte Strompulse von 10 pA, die eine Messung des Eingangswiderstandes der abgeleiteten Zelle während der Badapplikation ermöglichten.

Es wurden nur Zellen ausgewertet, bei denen zu Beginn der Applikation ein Ruhemembranpotential von -58,5 mV oder negativer vorlag und eine stabile Ableitung über die gesamte Zeit des Einwaschens aufgezeichnet werden konnte. Alle Zellen, die diesen Kriterien nicht entsprachen, sind nicht in die Auswertung eingeschlossen.

Von den acht MC der Schicht II/III zeigten sechs Zellen eine Hyperpolarisation des Membranpotentials von mindestens 1 mV (Abb. 3.4). In Schicht V zeigten dagegen nur 50 % (3 von 6 Zellen) einen signifikanten Effekt infolge der Badapplikation von Baclofen (Abb. 3.5). Die übrigen Martinotti-Zellen wiesen keine signifikante Änderung des Membranpotentials während der Badapplikation von Baclofen auf. Diese wurde gemessen, nachdem ein *steady state* erreicht war, in welchem keine weitere Hyperpolarisation durch das Pharmakon auftrat. Neben der absoluten Änderung des V_m (Stärke des Effektes) wurde auch die Kinetik der zellulären Antwort betrachtet. Da es sich bei Baclofen um den spezifischen Agonisten eines metabotropen Rezeptors handelt, war die Kinetik der zellulären Antwort von besonderem Interesse um Rückschlüsse auf die intrazellulär ablaufende *second messenger* Signalkaskade ziehen zu können.

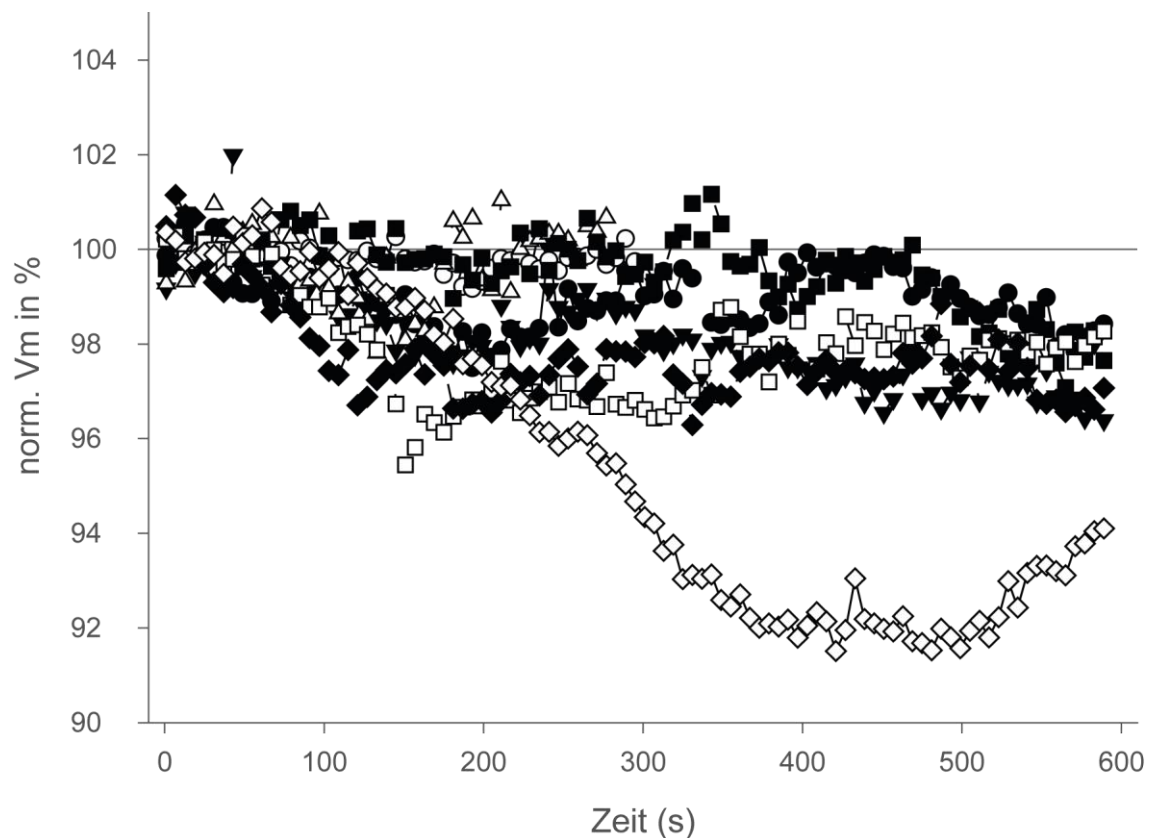


Abbildung 3.4: Effekt von Baclofen auf Martinotti-Zellen der Schicht II/III

Änderung des Membranpotentials in der *Whole-cell*-Konfiguration von acht Martinotti-Zellen in Schicht II/III des somatosensorischen Kortex während der Badapplikation von 25 μM Baclofen. Die Darstellung zeigt die prozentuale Änderung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der Dauer der Applikation. Baclofen bewirkt eine Hyperpolarisation der Martinotti-Zellen. Alle sechs Sekunden wird das Membranpotential der abgeleiteten Zelle im *Current-clamp*-Modus gemessen.

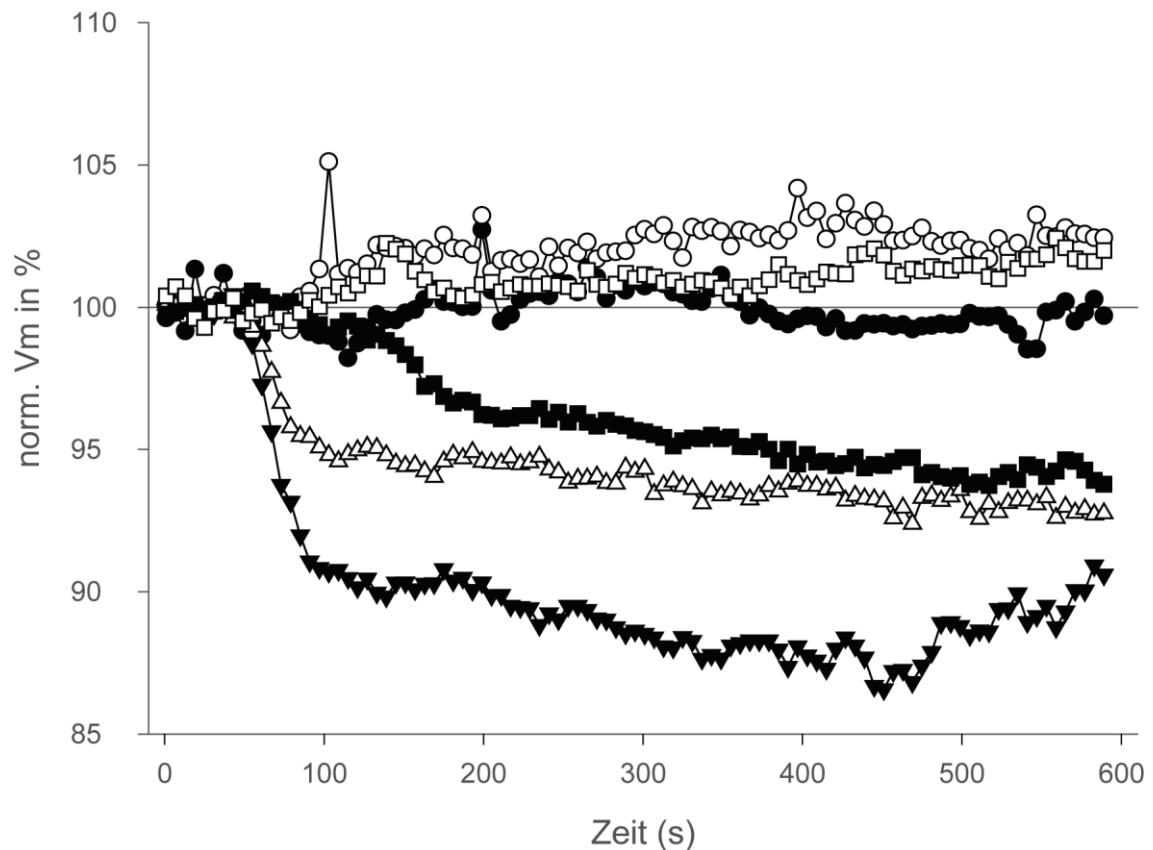


Abbildung 3.5: Effekt von Baclofen auf Martinotti-Zellen der Schicht V

Änderung des Membranpotentials in der *Whole-cell*-Konfiguration von 6 Martinotti-Zellen in Schicht V des somatosensorischen Kortex während der Badapplikation von 25 μM Baclofen. Die Darstellung zeigt die prozentuale Änderung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der Dauer der Applikation. Baclofen führte bei 50 % (3/6) der Zellen zu einer Hyperpolarisation, während die restlichen 50 % der Zellen mit keiner Änderung des Membranpotentials reagierten. Alle 6 Sekunden wurde das Membranpotential der abgeleiteten Zelle im *current-clamp*-Modus gemessen.

Martinotti-Zellen der Schicht V reagierten schneller und mit einer stärkeren Änderung des Ruhemembranpotentials als MC der Schicht II/III (Abb. 3.6 A). Dabei betrug die auf Baclofen zurückzuführende durchschnittliche Änderung des Membranpotentials in Schicht II/III $-2,50 \pm 1,59$ mV ($n = 6$) und in Schicht V $-3,80 \pm 0,76$ mV ($n = 3$) (Abb. 3.6 B). Die Änderung des Membranpotentials zwischen den beiden Zellpopulationen war statistisch nicht signifikant ($p = 0,232$). Um andere, nicht-pharmakologische Einflussfaktoren, die zu einer Membranpotentialänderung führen können, auszuschließen, wurde nach dem Experiment ein Auswasch von Baclofen durchgeführt. Dabei wurde für 20-30 Minuten die ursprüngliche Badlösung mit ACSF und NBQX eingewaschen und das Membranpotential fortlaufend beobachtet, bis ein *steady state* erreicht war. Während des Auswaschens von Baclofen wiesen Martinotti-Zellen der Schicht V eine stärkere Rehyperpolarisation (Depolarisation) der Membran auf als MC der Schicht II/III (Abb. 3.5 C). Bei Zellen der Schicht II/III betrug

die mittlere Änderung des Membranpotentials $1,43 \pm 2,16$ mV ($n = 5$). Wohingegen 2 Martinotti-Zellen der Schicht V mit einer Änderung von $+6,91$ bzw. $+3,11$ mV reagierten ($n = 2$) (Abb. 3.6 D).

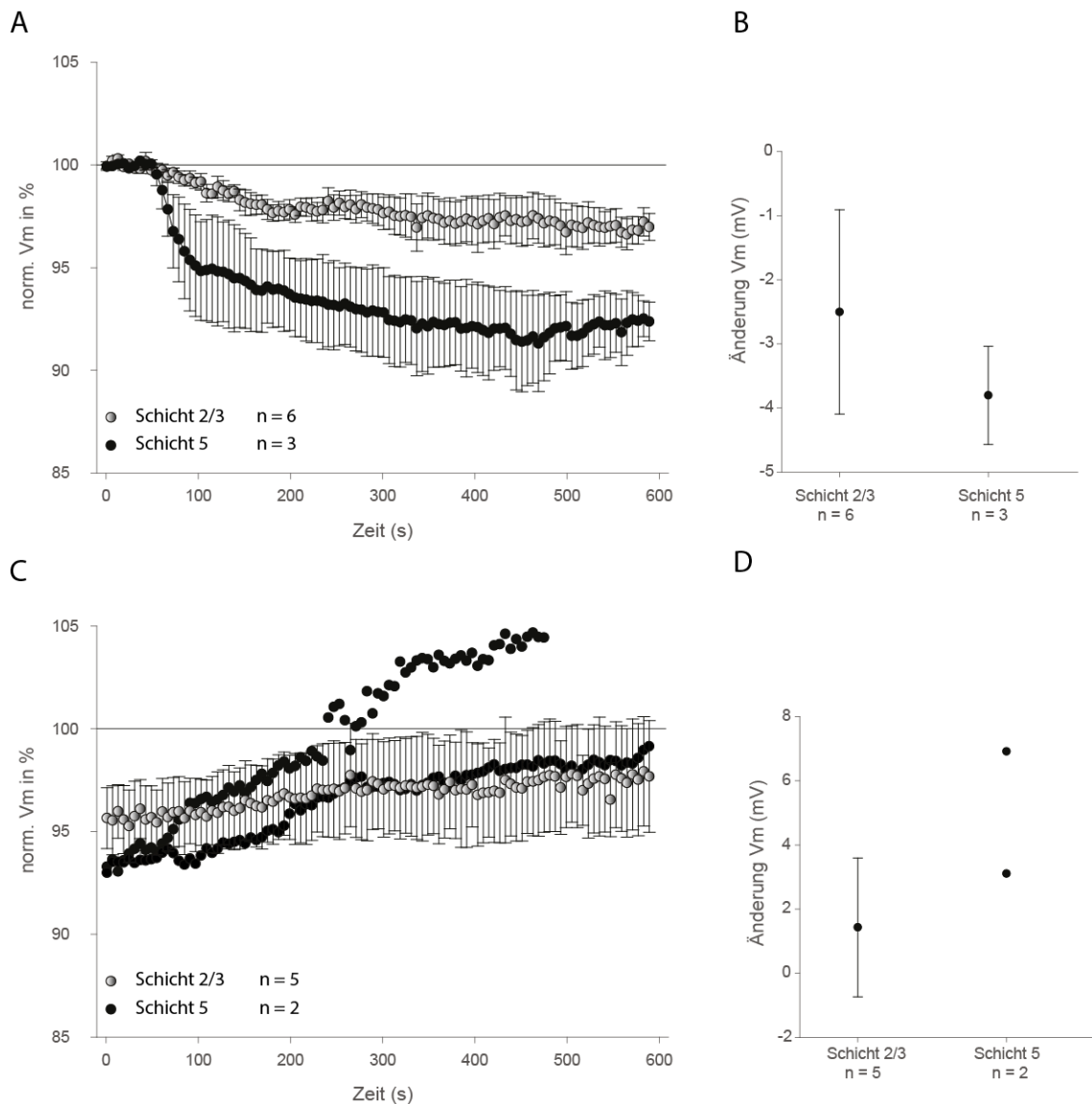


Abbildung 3.6: Schichtenspezifischer Einfluss von Baclofen auf das Membranpotential

(A) Baclofen ($25 \mu\text{M}$) induzierte mittlere Änderung des Membranpotentials von 6 Martinotti-Zellen der Schicht II/III (graue Kreise) und 3 MC der Schicht V (schwarze Kreise) in Abhängigkeit von der Applikationsdauer. Martinotti-Zellen der Schicht II/III zeigten eine geringere relative Änderung des Membranpotentials im Vergleich zu Schicht V MC während der Badapplikation von Baclofen.

(B) Die durchschnittliche Membranpotentialänderung betrug $-2,50 \pm 1,59$ mV in MC der Schicht II/III und $-3,80 \pm 0,76$ mV für Schicht V MC.

(C) Reversibilität des Baclofen Effektes in Abhängigkeit der Applikation von ACSF für 5 MC der Schicht II/III (graue Kreise) und 2 MC der Schicht V (schwarze Kreise). Durch das Auswaschen von Baclofen ging das Membranpotential annähernd auf das ursprüngliche Ruhemembranpotential (100 %) zurück.

(D) Die durchschnittliche Membranpotentialänderung durch Auswasch des Baclofens betrug $1,43 \pm 2,16$ mV für Martinotti-Zellen der Schicht II/III und $6,91$ bzw. $3,11$ mV für die beiden Schicht V MC.

Zusätzlich zur Änderung des Membranpotentials wurden die intrinsischen Membraneigenschaften (Eingangswiderstand, Rheobase, Feuerschwelle und Amplitude der AP) vor der Applikation von 25 μM Baclofen (Referenz), während der Applikation und nach dem Auswasch erhoben und ausgewertet (Abb. 3.7). Dabei zeigte die Applikation des spezifischen GABA_B-Rezeptor-Agonisten keinen signifikanten Einfluss auf die intrinsischen Eigenschaften (Eingangswiderstand: $p = 0,087$; Rheobase: $p = 0,937$; Feuerschwelle: $p = 0,137$; AP Amplitude: $0,263$) von MC in Schicht II/III. Das Gleiche galt für MC der Schicht V (Anhang Abb. 6.1).

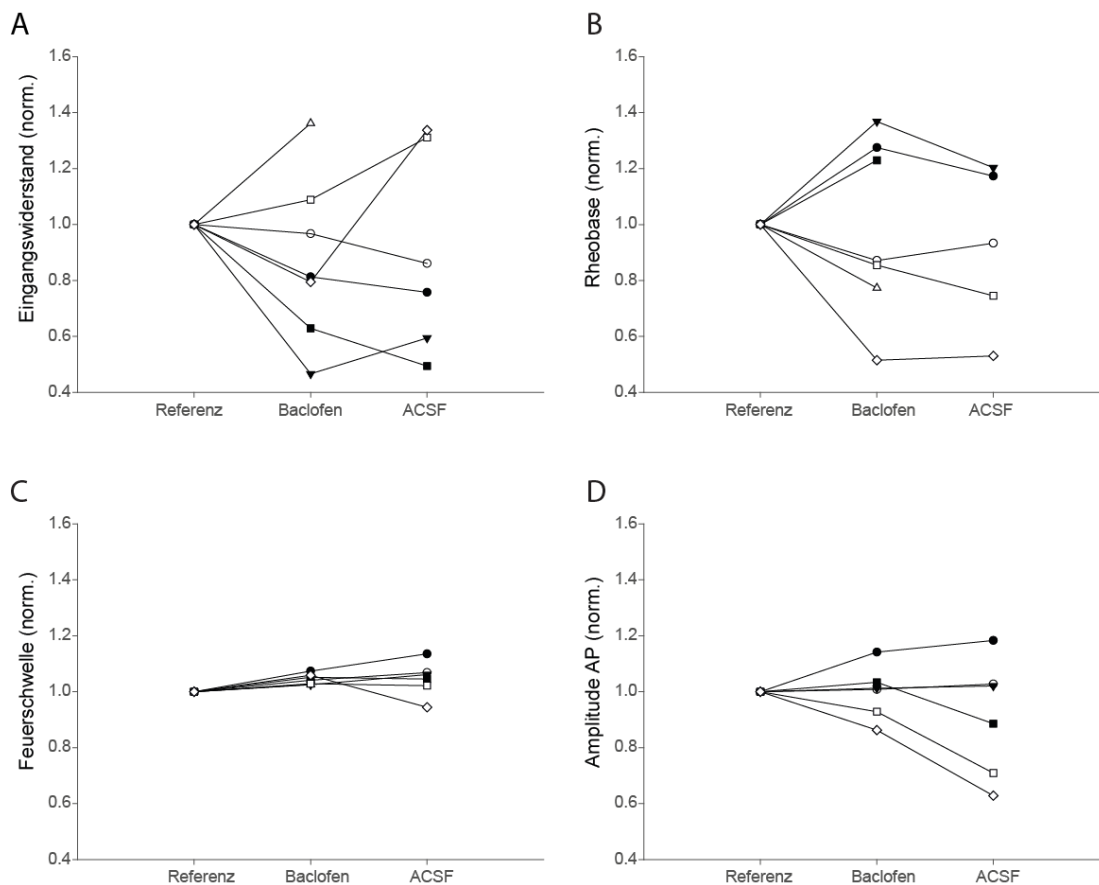


Abbildung 3.7: Effekt von Baclofen auf die intrinsischen Eigenschaften von Martinotti-Zellen der Schicht II/III

Intrinsische Membraneigenschaften von Martinotti-Zellen der Schicht II/III unter Kontrollbedingungen (Referenz), unter Baclofen (25 μM) und nach erfolgtem Auswasch mit ACSF. Die Werte **(A)** Eingangswiderstand, **(B)** Rheobase, **(C)** Feuerschwelle und **(D)** Amplitude des Aktionspotentials sind normalisiert dargestellt.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass Martinotti-Zellen der Schicht II/III und der Schicht V im Barrel-Kortex der Maus GABA_B-Rezeptoren exprimieren. Dabei führte eine Aktivierung dieser Rezeptoren zu einer Hyperpolarisation der Zellen, die an den Martinotti-Zellen der Schicht V tendenziell größer ausfiel und eine schnellere Kinetik aufwies.

3.3 Bestimmung von induzierten inhibitorischen postsynaptischen Strömen auf Martinotti-Zellen

Nachdem die Ergebnisse nahelegten, dass Martinotti-Zellen über postsynaptische GABA_B-Rezeptoren verfügen, sollte in einem weiteren Versuchskomplex der Frage nachgegangen werden, ob die auf der Martinotti-Zelle terminierenden inhibitorischen Fasern präsynaptische GABA_B-Rezeptoren besitzen (Abs. 3.4). Im Vorfeld dieser Experimente sollte sichergestellt werden, dass ausschließlich induzierte inhibitorische postsynaptische Ströme an den Martinotti-Zellen gemessen werden. Inhibitorische Ströme werden durch GABA_A-Rezeptoren vermittelt und sind weitestgehend von Chloridionen getragen.

In den Experimenten wurde mittels geeigneter elektrischer Stimulation das Umfeld, d.h. Axone und ihre Präsynapsen, der abgeleiteten Zelle stimuliert. Die Martinotti-Zellen wurden in der *Whole-cell*-Konfiguration im *Voltage-clamp*-Modus bei einem Haltepotential von +10 mV gehalten. Die nachgewiesenen GABA_B-Rezeptoren auf Martinotti-Zellen (Abs. 3.1) wurden durch eine cäsiumbasierte Intrazellulärlösung blockiert. Exzitatorische Eingänge wurden mit 10 µM NBQX pharmakologisch geblockt. Bei den Versuchen mit einem Einwasch von CGP wurden zusätzlich potentiell vorhandene NMDA-Rezeptoren mit 50 µM AP-5 blockiert. Des Weiteren wurden bei allen Versuchen 5 µM QX314-Cl der intrazellulären Lösung beigefügt, um eine Kontamination der PSCs durch spontane Aktionspotentiale auszuschließen.

Zur Überprüfung, ob die gemessenen Ströme nach zuvor erfolgter extrazellulärer elektrischer Stimulation synaptischen Ursprungs sind, wurde die Latenz zwischen Stimulusartefakt und biphasischem Beginn der Zellantwort gemessen. Sie betrug im Mittel $1,7 \pm 0,1$ ms und zeigte, dass keine direkte Stimulation der abgeleiteten Somata stattgefunden hat. Da für eine Vesikelfreisetzung in den synaptischen Spalt Ca²⁺ notwendig ist, wurde bei drei Martinotti-Zellen der Schicht II/III eine Badapplikation mit Ca²⁺-armer ACSF (0,2 mM Ca²⁺ anstelle 2,0 mM Ca²⁺) durchgeführt (Abb. 3.8). Im Durchschnitt zeigte sich nach dem Einwasch eine Reduktion der Amplitude des gemessenen Stromflusses um $98,5 \pm 0,4$ % ($p = 0,0000706$). Dieser Effekt war nach dem Auswasch zu $90,0 \pm 3,1$ % reversibel ($p = 0,000104$) (Abb. 3.8 D). So konnte gezeigt werden, dass es sich bei den gemessenen Strömen um induzierte postsynaptische Ströme (*evoked postsynaptic currents*, ePSCs) handelte.

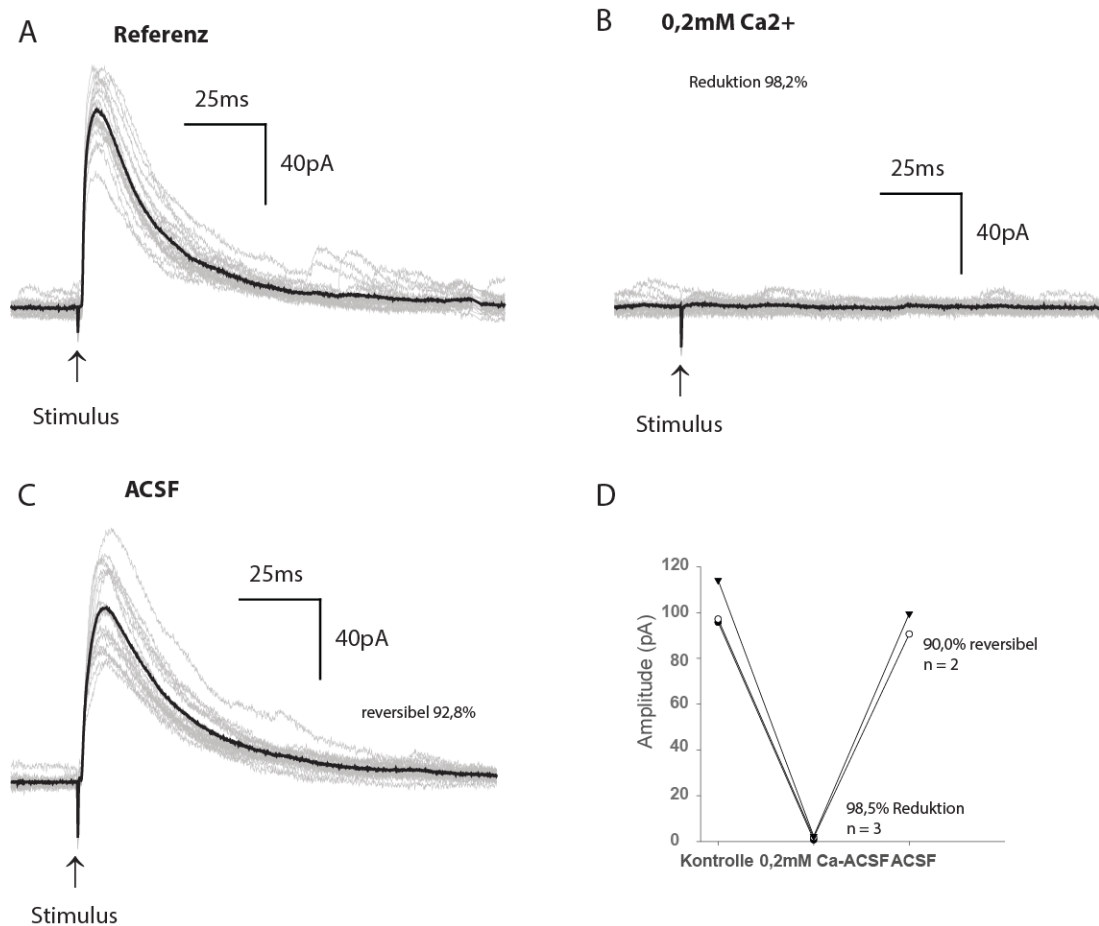


Abbildung 3.8: Ca²⁺-abhängige induzierte PSCs

(A) - (C) Postsynaptische Ströme wurden mittels elektrischer Stimulation an einer Martinotti-Zelle der Schicht II/III ausgelöst. Die induzierten Ströme bei einem Haltepotential von +10 mV sind in Abhängigkeit von der Zeit infolge des Stimulus (schwarzer Pfeil) dargestellt. Schwarze PSCs stellen das Mittel aus 20 Einzelstimulationen (graue Spuren) dar. Die Stimulation wurde unter Kontrollbedingungen (ACSF mit 2 mM Ca²⁺) (A), unter ACSF mit 0,2 mM Ca²⁺ (B) und nach erfolgtem Auswasch (C) durchgeführt. Eine Reduktion der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration führte zu einer 98,2 %igen Reduktion der PSP Amplitude. Dieser Effekt war zu 92,8 % reversibel.

(D) Die gemessenen Amplituden für drei Martinotti-Zellen für die 3 Ableitungen zeigten eine klare Abhängigkeit der Amplitude von der Ca²⁺-Konzentration.

Zum Nachweis, dass es sich bei den PSCs um GABA_A-vermittelte Ströme handelte, wurde der spezifische GABA_A-Rezeptor-Antagonist Gabazin verwendet. In den Versuchen wurden zunächst zehn ePSCs unter Kontrollbedingungen und anschließend zehn ePSCs nach Badapplikation von 10 μM Gabazin aufgezeichnet (Abb. 3.9). Die registrierten ePSCs unter Gabazin wiesen eine Reduktion um 99,1 % im Vergleich zur Kontrollbedingung auf. Insgesamt konnte bei sechs Martinotti-Zellen der Schicht II/III eine Reduktion der Amplitude des ePSCs um $98,7 \pm 0,9$ % beobachtet werden (Abb. 3.9 D). Der Gabazin bedingte Effekt war durch einen Auswasch zu 75,3 % reversibel (Abb. 3.9 C). Um einen methodischen Einfluss auszuschließen, wurden Kontrollexperimente an drei MC der Schicht II/III durchgeführt, bei denen nur eine Badapplikation von ACSF mit 10 μM NBQX stattfand. Dabei

zeigte sich, dass es nach einem 30-minütigen kontinuierlichen Einwasch von ACSF mit NBQX zu keiner signifikanten Änderung der Amplitude der ePSCs ($p = 0,861$) kam (Abb. 3.9 E). Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei den gemessenen ePSCs um induzierte inhibitorische ($GABA_A$ -vermittelte) postsynaptische Ströme (*evoked inhibitory postsynaptic currents*, eIPSCs) handelte.

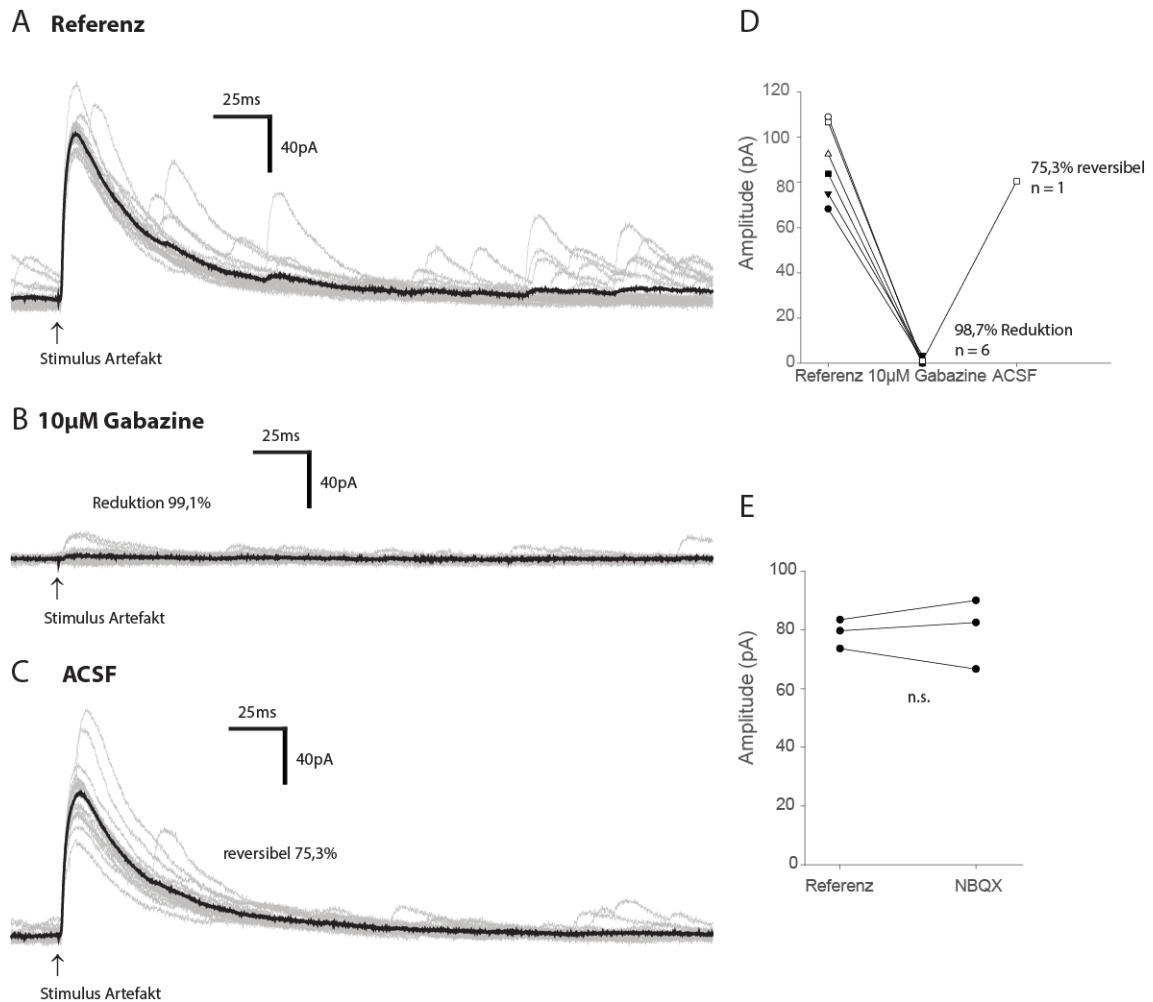


Abbildung 3.9: $GABA_A$ -vermittelte ePSCs an Martinotti-Zellen

(A) - (C) Postsynaptische Ströme wurden mittels elektrischer Stimulation an einer Martinotti-Zelle der Schicht II/III ausgelöst. Die induzierten Ströme bei einem Haltepotential von +10 mV sind in Abhängigkeit von der Zeit infolge des Stimulus (schwarzer Pfeil) dargestellt. Schwarze ePSCs stellen das Mittel aus 20 Einzelstimulationen (graue Spuren) dar. Die Stimulation wurde unter Kontrollbedingungen (A), nach Badapplikation von 10 µM Gabazine (B) und nach erfolgtem Auswasch (C) durchgeführt. Eine Applikation des spezifischen $GABA_A$ -Rezeptor-Antagonisten führte zu einer 99,1%igen Reduktion der PSC-Amplitude. Nach Auswasch war dieser Effekt zu 75,3% reversibel. (D) Im Mittel konnte durch den Einwasch von Gabazine die Amplitude der ePSCs an sechs abgeleiteten Martinotti-Zellen um $98,7 \pm 0,8\%$ reduziert werden. Ein Auswasch konnte nur in einem Fall (C) erreicht werden. (E) Die Langzeitmessung unter konstantem Einwasch von ACSF mit NBQX zeigt die mittlere Amplitude (in pA) bei 20 Einzelstimulationen zum Zeitpunkt 0 (Referenz) und nach 30 Min. Martinotti-Zellen der Schicht II/III ($n = 3$) antworteten mit keiner signifikanten Änderung der Amplitude ($p > 0,05$) des eIPSCs unter Einfluss von ACSF mit NBQX.

In einem letzten Versuch zur Charakterisierung der eIPSCs sollte festgestellt werden, welcher Ionenfluss über die Zellmembran der Martinotti-Zelle hauptsächlich für die Ausbildung der eIPSCs verantwortlich ist. Dazu wurden eIPSCs durch elektrische Stimulation von Axonen, nahe einer Martinotti-Zelle in der Schicht II/III ausgelöst. Die Aufnahme der eIPSCs erfolgte anschließend bei Haltepotentialen von +10 mV bis -110 mV in 10 mV Schritten (Abb. 3.10 A). Bei Haltepotentialen negativer als -70 mV war ein negativer Ionenstrom (Ausstrom) und bei Haltepotentialen positiver als -70 mV ein positiver Ionenstrom (Einstrom) zu beobachten. Demnach lag das Umkehrpotential der ausgelösten IPSCs, da wo kein Netto-Fluss stattfindet, um die -70 mV. Wenn das Membranpotential der Zelle dem Gleichgewichtspotential des geöffneten Ionenkanals entspricht, findet kein Nettofluss der Ionen über die Membran statt, da die elektrochemische Triebkraft an diesem Punkt null entspricht. Die ausgelösten IPSCs an Martinotti-Zellen sind durch GABA_A-Rezeptoren vermittelt und diese sind hauptsächlich für Chloridionen durchlässig. Aufgrund der Kenntnis der intra- (5 mM) und extrazellulären Chloridionenkonzentration (133,5 mM) lässt sich mit Hilfe der Nernst-Gleichung das Gleichgewichtspotential für Chloridionen berechnen ($E_{Cl} = -67,5$ mV). Die Bestimmung des Umkehrpotentials der ausgelösten eIPSCs lässt sich unter Annahme einer linearen Regression (für gleichgerichtete Ionenkanäle) in der Strom-Spannungs-Beziehung bestimmen (Abb. 3.10 B). Das so bestimmte Umkehrpotential liegt bei -56,0 mV und entspricht nicht dem Gleichgewichtspotential von Chloridionen. Betrachtet man die Strom-Spannungs-Beziehung, so besteht nur für den Bereich zwischen -60 mV und +20 mV ein linearer Zusammenhang. Um den Bereich von -60 mV bis -110 mV in die Strom-Spannungs-Beziehung zu integrieren, ist hingegen eine Funktion zweiter Ordnung notwendig, um die Messergebnisse mathematisch zu beschreiben (Abb. 3.10 B). Das mittels exponentieller Regression berechnete Umkehrpotential der eIPSCs liegt für diese Ableitung bei -63,1 mV. Das entspricht am ehesten dem mit der Nernst-Gleichung errechneten Gleichgewichtspotential von Chloridionen (-67,5 mV). Dies weist zum einen darauf hin, dass die positiven Ausschläge der eIPSCs einwärtsströmende Chloridionen und negative Ausschläge ausströmende Chloridionen an der abgeleiteten Martinotti-Zelle sind. Zum anderen wird deutlich, dass es, durch die Notwendigkeit einer exponentiellen Regression für einen gleichgerichteten Rezeptorkanal (GABA_A-Rezeptor), nicht möglich ist, durch Anlegen einer Spannung im Bereich des Zellsomas alle Dendriten auf eine vorgegebene negative Spannung zu klemmen.

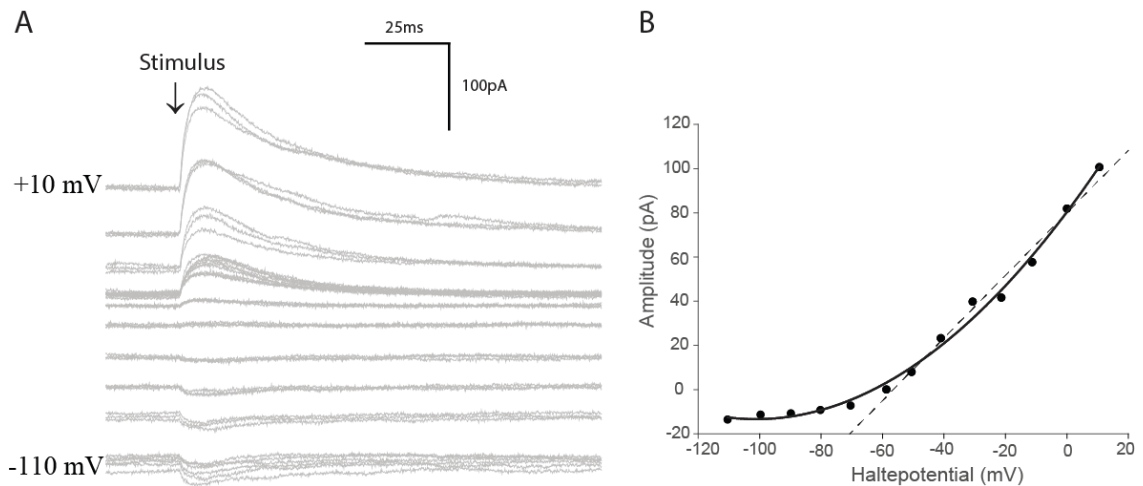


Abbildung 3.10: Umkehrpotential der eIPSCs einer Schicht II/III MC

(A) Mittels elektrischer Stimulation induzierte IPSCs einer Martinotti-Zelle der Schicht II/III bei Haltepotentialen von -110 mV bis $+10$ mV im *voltage-clamp*-Modus. Die Richtung der über die Zellmembran fließenden Ionen ändert sich am Umkehrpotential der ePSCs. (B) Die gemessenen Ströme wurden in Abhängigkeit des angelegten Haltepotentials als Strom-Spannungs-Beziehung aufgetragen. Dabei zeigte sich bei Haltepotentialen von -60 mV bis $+10$ mV ein linearer Zusammenhang (gestrichelte Linie). Im Bereich zwischen -60 mV und -110 mV blieben die Amplituden nahezu konstant und machen die Annahme eines exponentiellen Zusammenhanges notwendig (durchgezogene Linie). Für den linearen Bereich ergibt sich ein errechnetes Umkehrpotential von $-56,0$ mV. Unter Berücksichtigung des horizontalen Anteils wurde eine exponentielle Regression verwendet, das EPSC beträgt $-63,1$ mV. Dies entspricht am ehesten dem mit der Nernst-Gleichung errechneten Gleichgewichtspotential für Chloridionen von $-67,5$ mV.

Mit diesem Teil der Experimente konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den gemessenen eIPSCs um GABA_A -Rezeptor-induzierte, Cl^- -Ionen-vermittelte inhibitorische postsynaptische Ströme handelte.

3.4 GABA-vermittelte Modulation der Kurzzeitplastizität

Nachdem in vorangegangenen Versuchen nachgewiesen werden konnte, dass es sich bei den evozierten Signalen an den Martinotti-Zellen um inhibitorische postsynaptische Ströme handelt, befasst sich dieser Teil der Arbeit mit der Kurzzeitplastizität von IPSCs an Martinotti-Zellen und deren Modulation durch präsynaptische GABA_B -Rezeptoren. Die Bedingungen für die Durchführung dieser Experimente glichen denen bei der Bestimmung von eIPSCs (Abs. 3.3).

In den Experimenten wurden die postsynaptischen GABA_B -Rezeptoren intrazellulär mit einer cäsiumbasierten Pipettenlösung blockiert, während die präsynaptischen GABA_B -Rezeptoren durch die Badapplikation von $10 \mu\text{M}$ Baclofen aktiviert wurden (Abb. 3.11). Die intrazellulär eingebrachten Cäsiumionen blockierten sämtliche Kaliumkanäle der Zelle, so auch

die G-Protein-gekoppelten Kaliumkanäle, die bei einer Aktivierung von GABA_B-Rezeptoren geöffnet werden. Dadurch konnte kein Kalium aus den abgeleiteten Zellen fließen und es kam zu keiner GABA_B-vermittelten Hyperpolarisation der Zellen. In den Versuchen wurden die Präsynapsen von drei Martinotti-Zellen der Schicht II/III vor (Abb. 3.11 A) und während (Abb. 3.11 B) der Badapplikation von Baclofen mit einer bipolaren Elektrode extrazellulär stimuliert und die Amplitude der eIPSCs gemessen. Eine Inaktivierung der GABA_B-Rezeptoren (Abb. 3.11 C) erfolgte durch die Applikation von 10 µM Baclofen und 15 µM CGP52432 (spezifischer GABA_B-Rezeptor-Antagonist). Baclofen bewirkte eine mittlere Reduktion der Amplitude um $65,0 \pm 10,1$ %. Dieser Effekt war zu $84,0 \pm 18,0$ % reversibel (Abb. 3.11 D). Die Ergebnisse deuten auf die Existenz präsynaptischer GABA_B-Rezeptoren an den inhibitorischen Terminalen auf den Martinotti-Zellen hin, welche einen Einfluss auf die Amplitude der eIPSCs haben und damit verbunden die Fähigkeit besitzen, die Transmitterausschüttung in den synaptischen Spalt zu verringern.

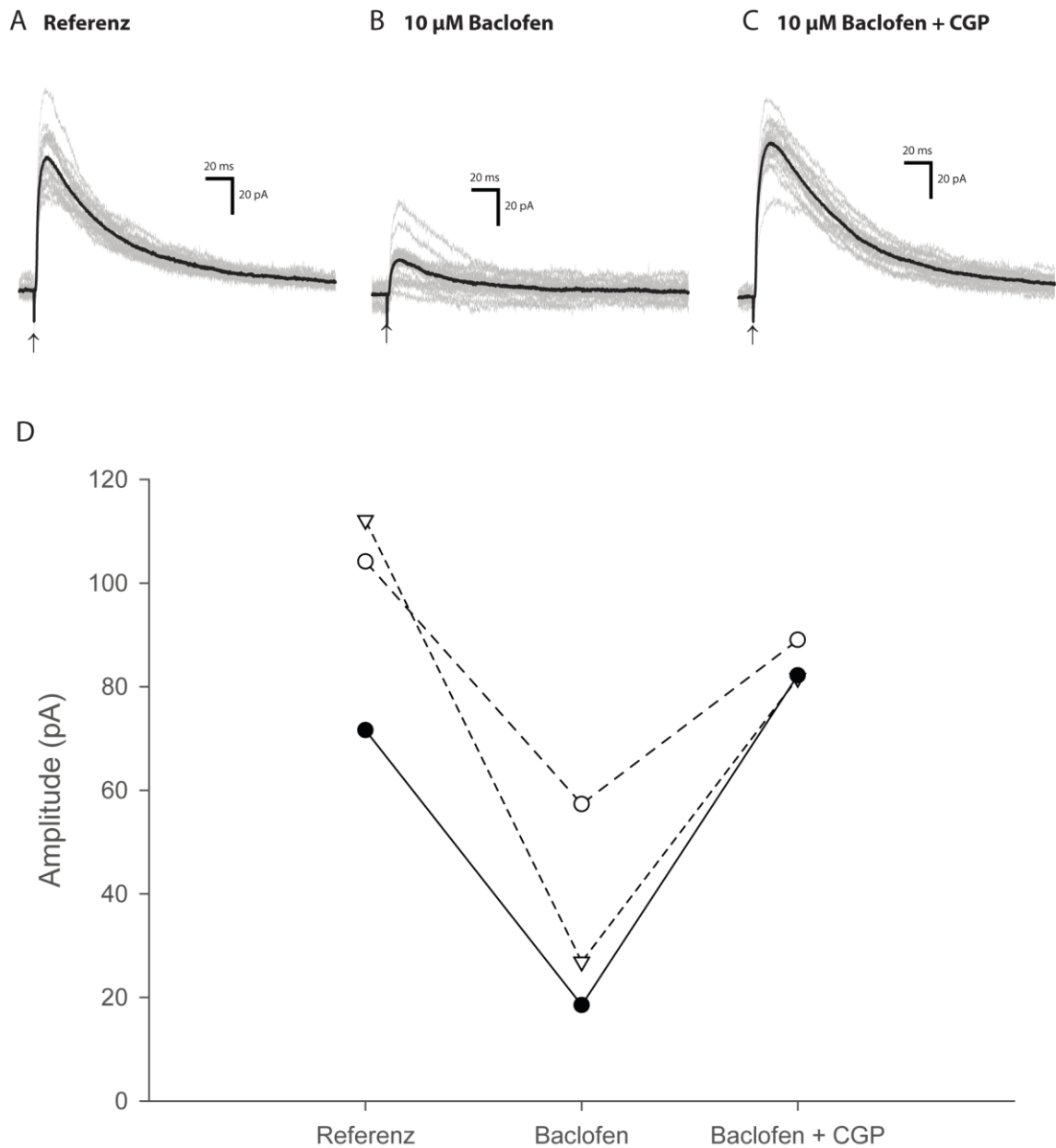


Abbildung 3.11: Einfluss von Baclofen auf die Amplitude der eIPSCs an Martinotti-Zellen
(A) - (C) Postsynaptische Ströme wurden mittels elektrischer Stimulation an einer Martinotti-Zelle der Schicht II/III ausgelöst. Die induzierten Ströme bei einem Haltepotential von +10 mV sind in Abhängigkeit von der Zeit infolge des Stimulus (schwarzer Pfeil) dargestellt. Schwarze eIPSCs stellen das Mittel aus 20 Einzelstimulationen (graue Spuren) dar. Die Stimulation wurde unter Kontrollbedingungen **(A)**, während Badapplikation von 10 μM Baclofen **(B)** und nach Badapplikation von 10 μM Baclofen und 15 μM CGP52432 **(C)** durchgeführt. Eine Applikation des spezifischen GABA_B-Rezeptor-Agonisten führte zu einer 65,0 %igen Reduktion der IPSC-Amplitude. Nach Applikation des GABA_B-Rezeptor-Antagonisten wurden 86,2 % der ursprünglichen Amplitude des eIPSCs erreicht.
(D) Durch den Einwasch von Baclofen reduzierten sich die Amplituden der IPSCs von drei Martinotti-Zellen auf durchschnittlich $65,0 \pm 10,1$ %. Durch Applikation von Baclofen und CGP52432 war dieser Effekt zu $84,0 \pm 18,0$ % reversibel.

Nach der Einzelstimulation sollte im nächsten Schritt der Effekt von GABA_B-Rezeptoren auf die inhibitorischen Eingänge bei einer repetitiven Stimulation untersucht werden. Hierfür wurden bei 8 Martinotti-Zellen der Schicht II/III elektrische Reihenstimulationen (*train*-Stimulationen) mit den Frequenzen 1 Hz (Abb. 3.12 A), 8 Hz (Abb. 3.12 B) und 40 Hz (Abb. 3.12 C) durchgeführt. Die registrierten IPSCs zeigten eine frequenzabhängige Abnahme der Amplitude zwischen dem 1. und dem 10. Stimulus (Abb. 3.12 D). Bei 1 Hz erreichte die Amplitude des 10. Pulses nur noch 66,6 % des ersten eIPSC, bei 8 Hz 46,1 % und bei 40 Hz 46,4 %. Ab dem 6. Puls blieben die Amplituden der eIPSCs weitestgehend konstant und es kam zur Ausbildung eines Plateaus (*steady state*). Die Reduktion der Einzel-IPSC-Amplituden bei repetitiver Stimulation bedeutet, dass die inhibitorischen Terminalen auf den Martinotti-Zellen einer *short-term depression* (STD), einer Form von Kurzzeitplastizität unterliegen. Bei den Stimulationsfrequenzen 8 Hz und 40 Hz konnte eine signifikant stärkere Depression der IPSCs gegenüber 1 Hz festgestellt werden ($p = 0,000324$). Zwischen den Frequenzen 8 Hz und 40 Hz war dagegen kein signifikanter Unterschied in der *short-term depression* zu beobachten ($p = 0,363$).

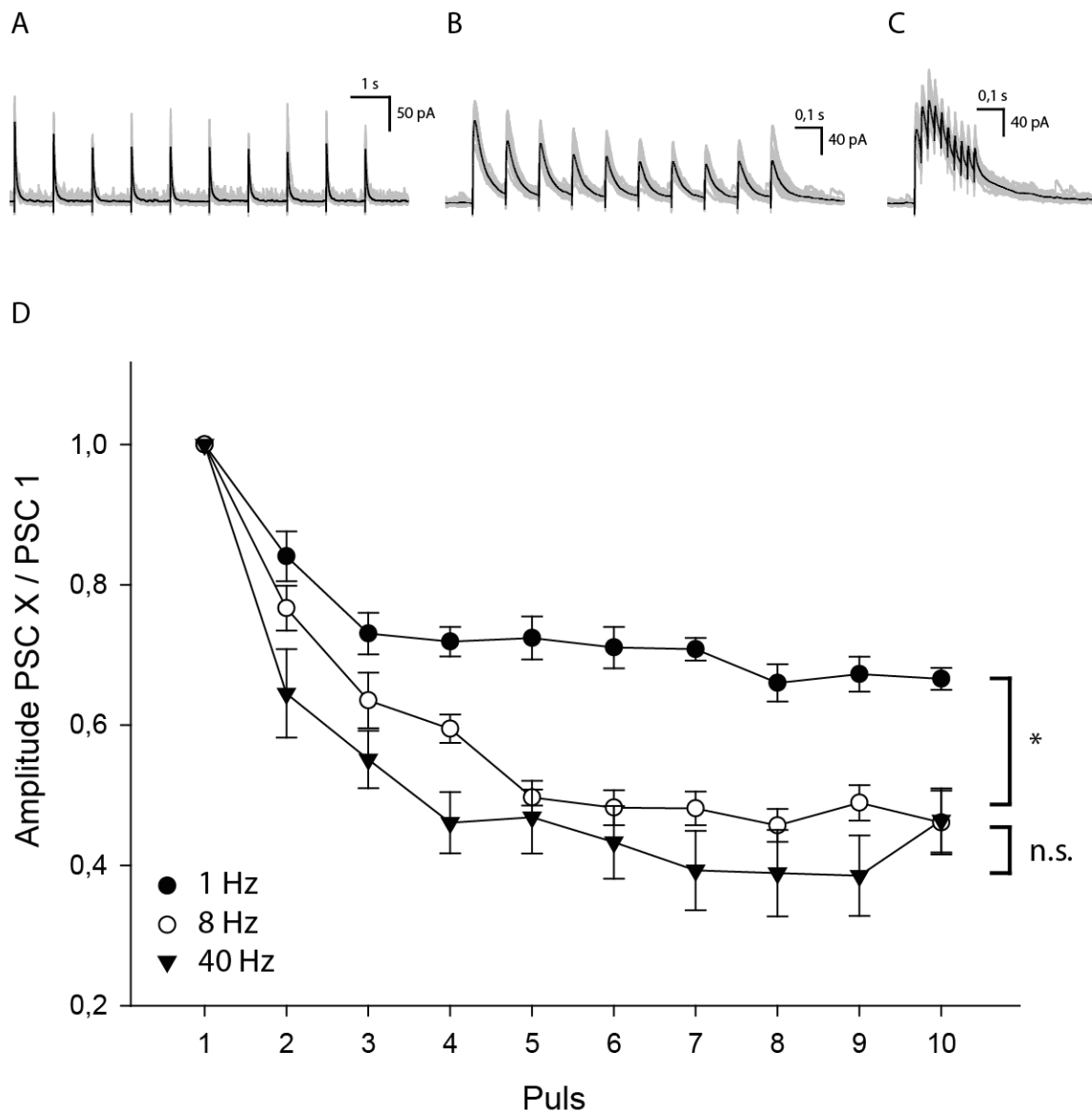


Abbildung 3.12: Frequenzabhängige Depression der eIPSCs auf MC der Schicht II/III

(A) - (C) Postsynaptische Ströme wurden mittels elektrischer Stimulation an einer Martinotti-Zelle der Schicht II/III bei einem Haltepotential von +10 mV ausgelöst. Schwarze eIPSCs stellen jeweils den Mittelwert aus 20 *train*-Stimulationen (grau) in den Frequenzen (A) 1 Hz, (B) 8 Hz und (C) 40 Hz dar.

(D) Normalisierte Darstellung der Amplituden der einzelnen eIPSCs in der *train*-Stimulation von 8 MC der Schicht II/III bezogen auf den jeweils ersten eIPSC. Die ausgelösten eIPSCs zeigten durch eine Reduktion der Amplitude eine deutliche Depression in ihrer Kurzzeitplastizität. Bei 1 Hz erreichte die Amplitude des 10. Pulses nur noch 66,6 % des Ausgangswertes, bei 8 Hz 46,1 % und bei 40 Hz 46,4 %. Demnach nimmt die Depression mit höheren Frequenzen zu (1 Hz vs. 8 Hz, $p < 0,001$; 8 Hz vs. 40 Hz, $p > 0,05$).

Um nun den Effekt von GABA_B-Rezeptoren auf die Kurzzeitplastizität der inhibitorischen Eingänge der Martinotti-Zellen zu untersuchen, wurden die Versuche ebenfalls unter dem Einfluss von Baclofen durchgeführt.

Infolge des Einwaschens von Baclofen kam es bei der repetitiven Stimulation auch zu einer Reduktion der Amplitude des 1. PSC (Daten nicht gezeigt). Vergleicht man die Werte für die Kurzzeitplastizität im *steady-state*-Bereich (PSC 6-10) unter ACSF (Referenz) mit denen nach der Badapplikation von 10 μM Baclofen und nach dem Auswasch mit 10 μM Baclofen und 15 μM CGP52432, so ist für die Stimulationsfrequenzen 1 Hz, 8 Hz und 40 Hz eine signifikante Reduktion der STD unter Baclofen zu beobachten (Abb. 3.13). Das Verhältnis der Amplitude von PSC 6-10 zum PSC 1 veränderte sich bei 1 Hz von $0,72 \pm 0,02$ auf $0,93 \pm 0,17$ ($p = 0,003$; Wilcoxon Signed Rank Test), bei 8 Hz von $0,47 \pm 0,01$ auf $0,66 \pm 0,10$ ($p = 0,000842$) und bei 40 Hz von $0,54 \pm 0,03$ auf $0,71 \pm 0,09$ ($p = 0,00141$). Ein Auswasch, d.h. eine vollständige Blockade der GABA_B-Rezeptoren durch CGP konnte nicht erreicht werden.

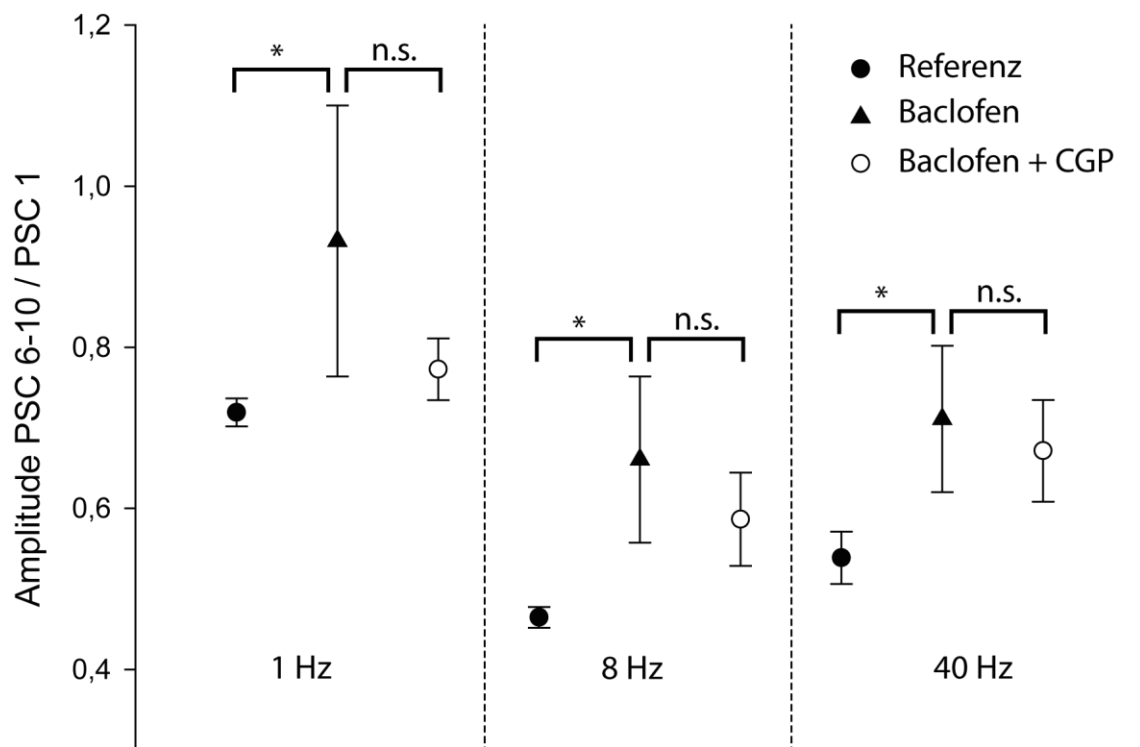


Abbildung 3.13: Einfluss von Baclofen auf die Kurzzeitplastizität

Bei drei Martinotti-Zellen der Schicht II/III wurden *train* Stimulationen bei Frequenzen von 1 Hz, 8 Hz und 40 Hz unter ACSF (Referenz), unter 10 μM Baclofen und unter Baclofen und 15 μM CGP52432 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und der SEM der Amplitude der 6. bis 10. Stimulation (*steady state*) bezogen auf die Amplitude des ersten Stimulus für die unterschiedlichen Frequenzen und Bedingungen. Unter Kontrollbedingungen zeigten die eIPSCs eine deutliche Depression bei 1, 8 und 40 Hz. Durch den Einwasch von 10 μM Baclofen kam es bei den Frequenzen 8 und 40 Hz ebenfalls zu einer Depression in der Kurzzeitplastizität der IPSCs, allerdings fiel diese signifikant geringer aus im Vergleich zur Referenz (*8 Hz $p < 0,001$; *40 Hz $p = 0,001$; Wilcoxon Signed Rank Test). Bei der 1 Hz Stimulation war unter Baclofen im Mittel keine Veränderung der Amplitude zwischen dem 1. und 6.-10. IPSC zu beobachten (*1 Hz: $p = 0,003$). Ein vollständiger Auswasch mit 10 μM Baclofen und 15 μM CGP52432 war allerdings nicht möglich ($p > 0,05$).

Die erhobenen Messwerte nach der Badapplikation von 10 μM Baclofen + 15 μM CGP52432 sind statistisch nicht signifikant unterschiedlich gegenüber den Werten unter Baclofen (1 Hz: $p = 0,0534$; 8 Hz: $p = 0,131$; 40 Hz: $p = 0,784$). Diese Ergebnisse zeigen, dass Baclofen neben der Wirkung bei der Einzelstimulation (Abb. 3.11) auch die Kurzzeitplastizität der inhibitorischen Synapsen auf den MC beeinflussen kann. Aufgrund der Depression der eIPSCs unter Kontrollbedingungen, insbesondere bei höheren Frequenzen (Abb. 3.12), kann vermutet werden, dass diese Depressionswirkung durch eine Art „synaptische Autoinhibition“ hervorgerufen wird. Bei hohen Frequenzen der eIPSCs besteht die Möglichkeit, dass es durch einen Überfluss von GABA im synaptischen Spalt (sog. *spillover*) zu einer GABA_B-vermittelten präsynaptischen Inhibition des transmitterausschüttenden Neurons kommt. Um diese Frage beantworten zu können, wurden im Folgenden elektrische Einzelstimulationen und *train*-Stimulationen an Martinotti-Zellen der Schicht II/III und V durchgeführt, bei der präsynaptische GABA_B-Rezeptoren durch 10 μM CGP52432 blockiert wurden.

Exemplarisch ist eine *train*-Stimulation für 1, 8 und 40 Hz unter CGP für dieselbe Martinotti-Zelle der Schicht II/III (Referenz Abb. 3.12 A-C) bei einem Haltepotential von +10 mV gezeigt (Abb. 3.14 A-C). Für fünf MC der Schicht II/III (Abb. 3.14 D+E) und für drei MC der Schicht V (Abb. 3.15 F und G) ließ sich bei den *train*-Stimulationen mit 1, 8 und 40 Hz eine frequenzabhängige Depression der IPSCs beobachten. Mit steigenden Frequenzen nahm die STD sowohl unter Referenzbedingungen (Abb. 3.15 D und E) als auch unter Einfluss des spezifischen GABA_B-Rezeptor-Antagonisten CGP52432 (10 μM) stetig zu (Abb. 3.15 F und G). Im Vergleich zwischen Kontrolle und CGP änderte sich das Verhältnis des letzten PSC (PSC 10) zum ersten PSC (PSC 1) bei MC der Schicht II/III von $0,65 \pm 0,02$ auf $0,80 \pm 0,04$ für 1 Hz, bei 8 Hz von $0,48 \pm 0,07$ auf $0,49 \pm 0,05$ und bei 40 Hz von $0,38 \pm 0,04$ auf $0,38 \pm 0,11$. Für MC der Schicht V lag die Änderung für 1 Hz von $0,74 \pm 0,04$ auf $0,77 \pm 0,06$, für 8 Hz $0,45 \pm 0,16$ auf $0,59 \pm 0,04$ und für 40 Hz von $0,38 \pm 0,12$ auf $0,40 \pm 0,05$ (Anhang Tab. 6.1).

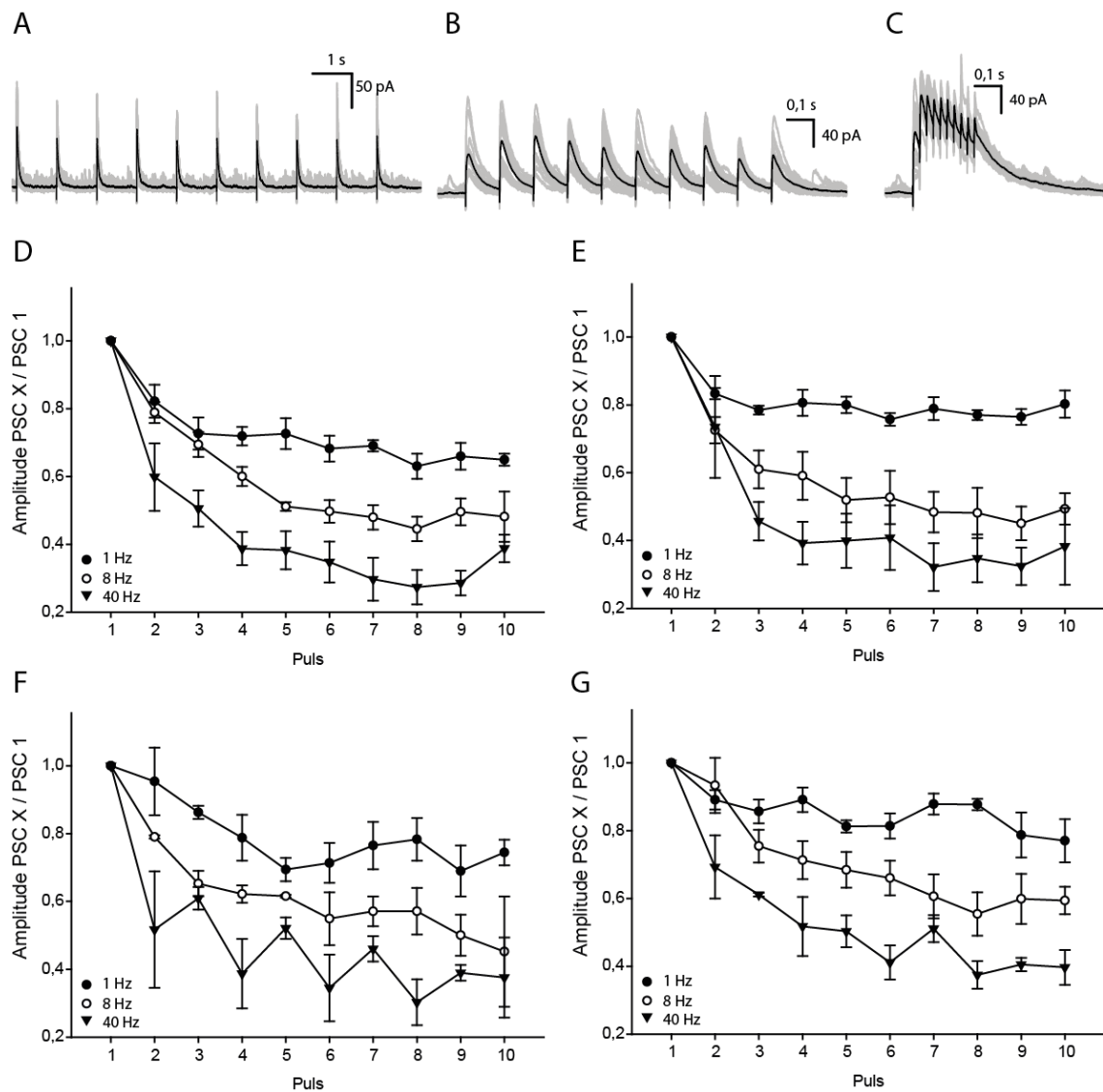


Abbildung 3.14: Schichtenspezifischer Einfluss von CGP auf die Amplitude der eIPSCs

(A) - (C) Postsynaptische Ströme wurden mittels elektrischer Stimulation an einer Martinotti-Zelle der Schicht II/III nach der Badapplikation von CGP bei einem Haltepotential von +10 mV ausgelöst. Schwarze eIPSCs stellen jeweils den Mittelwert aus 20 *train*-Stimulationen (grau) in den Frequenzen (A) 1 Hz, (B) 8 Hz und (C) 40 Hz dar.

(D) + (E) Normalisierte Darstellung der Amplituden der einzelnen eIPSCs in der *train*-Stimulation von 5 MC der Schicht II/III bezogen auf den jeweils ersten eIPSC vor (D) und nach der Badapplikation von CGP (E).

(F) + (G) Normalisierte Darstellung der Amplituden der einzelnen eIPSCs in der *train*-Stimulation von 3 MC der Schicht V bezogen auf den jeweils ersten eIPSC vor (F) und nach der Badapplikation von CGP (G).

Das dargestellte Verhältnis beschreibt die Kurzzeitplastizität der IPSCs. Unabhängig von der Lokalität der Zellen kam es mit und ohne Zugabe von CGP bei steigenden Frequenzen zu einer zunehmenden Depression (Tab. 3.2). Zwischen den Pulsen 6 und 10 stellte sich ein *steady state* Zustand ein.

Um die potentiellen Änderungen der Kurzzeitplastizität der IPSCs unter den zwei Bedingungen (Kontrolle und CGP) in der *train*-Stimulation mit den Frequenzen 1 Hz, 8 Hz und 40 Hz besser vergleichen zu können, wurde analog zur Baclofenwirkung auf die Kurzzeitplastizität das Verhältnis des *steady state* Bereiches der IPSCs (IPSC 6-10) zum ersten IPSC gebildet. Dabei erfolgte weiterhin eine Trennung zwischen den MC der Schicht II/III ($n = 5$) und der MC der Schicht V ($n = 3$) (Abb. 3.15). Für dieses Verhältnis, welches die *short-term depression* beschreibt, ergaben sich folgende Werte: Schicht II/III vor dem Einwasch von CGP (Referenz) bei 1 Hz $0,66 \pm 0,23$, nach dem Einwasch von CGP $0,78 \pm 0,02$. In Schicht V bei 1 Hz Referenz $0,74 \pm 0,05$, nach dem Einwasch $0,83 \pm 0,02$. Bei einer Stimulationsfrequenz von 8 Hz änderte sich das Verhältnis in Schicht II/III von $0,48 \pm 0,04$ auf $0,49 \pm 0,06$, in Schicht V von $0,53 \pm 0,08$ auf $0,60 \pm 0,06$, bei einer Frequenz von 40 Hz von $0,32 \pm 0,04$ auf $0,36 \pm 0,08$ in Schicht II/III und von $0,37 \pm 0,05$ auf $0,42 \pm 0,04$ (Anhang Tab. 6.2).

Anhand dieser Werte lassen sich folgende Erkenntnisse formulieren: Es existiert kein signifikanter Unterschied in der Kurzzeitplastizität der IPSCs an den MC der Schicht II/III und Schicht V für die getesteten Frequenzen 1, 8 und 40 Hz ($p > 0,05$). Unter dem Einfluss von CGP (dunkle Symbole) kommt es bei den MC, unabhängig ihrer Lokalität, zu keiner signifikanten Änderung der Depressionsstärke der IPSCs, mit Ausnahme der Schicht II/III MC bei der 1 Hz Stimulation ($p < 0,001$) (Anhang Tab. 6.3). Weiterhin verhält sich die Depression der eIPSCs an MC beider Schichten unter dem Einfluss von CGP gleich, unabhängig von den getesteten Frequenzen (Anhang Tab. 6.3).

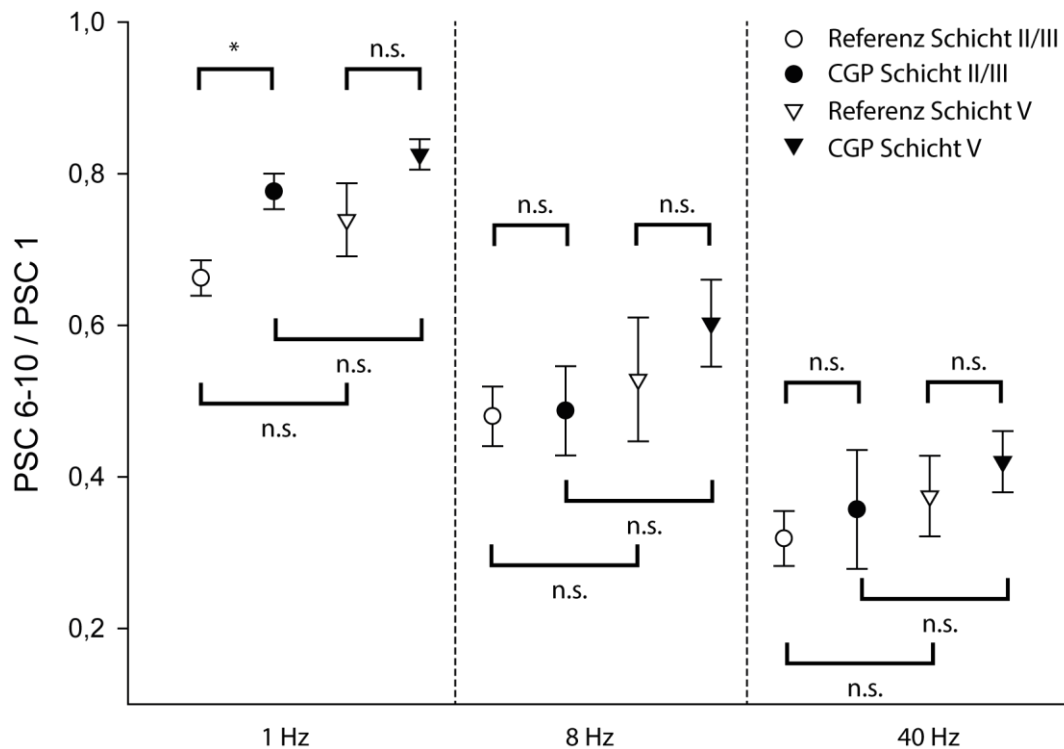


Abbildung 3.15: Schichtenspezifischer Einfluss von CGP auf die Kurzzeitplastizität

Normierte Darstellung der Kurzzeitplastizität von eIPSCs an 5 Martinotti-Zellen der Schicht II/III (Kreise) und an 3 MC der Schicht V (Dreiecke) unter *train*-Stimulationen mit 1, 8 und 40 Hz. Gegenübergestellt sind die Verhältnisse der gemittelten Amplituden der PSCs 6-10 (*steady state*) zum PSC 1 unter Kontrollbedingungen (nicht-ausgefüllte Symbole) bzw. unter Blockade des GABA_B-Rezeptors durch CGP (geschlossene Symbole). Dieses Verhältnis beschreibt die Depressionsstärke der eIPSCs an MC. Mit steigender Stimulationsfrequenz kam es zu einer stärker ausgeprägten Depression der eIPSCs an MC, unabhängig ihrer Lokalität; Referenz 1 Hz Schicht II/III: $0,6625 \pm 0,0233$; Schicht V: $0,7393 \pm 0,0482$; Referenz 8 Hz Schicht II/III: $0,4799 \pm 0,0394$; Schicht V: $0,5288 \pm 0,0818$; Referenz 40 Hz Schicht II/III: $0,3186 \pm 0,0364$; Schicht V: $0,3746 \pm 0,0533$; nach Einwasch CGP 1 Hz Schicht II/III: $0,7767 \pm 0,0235$; Schicht V: $0,8255 \pm 0,0201$; nach Einwasch CGP 8 Hz Schicht II/III: $0,4872 \pm 0,0591$; Schicht V: $0,6028 \pm 0,0575$; nach Einwasch CGP 40 Hz Schicht II/III: $0,3569 \pm 0,0786$; Schicht V: $0,4199 \pm 0,0403$.

Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den MC der Schicht II/III und Schicht V für die Frequenzen 1, 8 und 40 Hz ($p > 0,05$). Unter dem Einfluss von CGP kam es bei den MC zu keiner signifikanten Änderung der Depressionsstärke ($p > 0,05$), mit Ausnahme der Schicht II/III MC bei der 1 Hz Stimulation ($p < 0,001$). Weiterhin verhielt sich die Depression der eIPSCs an MC beider Schichten unter dem Einfluss von CGP gleich, unabhängig von den getesteten Frequenzen ($p > 0,05$).

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass an den präsynaptischen inhibitorischen Terminalen auf die Martinotti-Zellen der Schichten II/III und V im Barrel-Kortex GABA_B-Rezeptoren vorhanden sind. Bei Aktivierung dieser präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren kommt es zur Reduktion des postsynaptischen IPSC, allerdings sind diese nicht an einer „synaptischen Autoinhibition“ bei einer repetitiven Stimulation beteiligt. Die Modulation der Kurzzeitplastizität muss daher andere Ursachen haben.

4 Diskussion

Martinotti-Zellen, die eine Subpopulation SST-exprimierender Interneurone darstellen, sind durch ihr Wirkungsprinzip der lateralen disynaptischen Inhibition zwischen benachbarten Pyramidenzellen und ihre Beteiligung an disinhibitorischen Schaltkreisen maßgeblich an der Informationsverarbeitung im Neocortex beteiligt (Feldmeyer et al. 2018; Tremblay et al. 2016; Roux und Buzsáki 2015; Silberberg und Markram 2007). Des Weiteren spielen SST-Interneurone eine entscheidende Rolle bei Lernvorgängen, da ihre Aktivität stark vom Aktivitätsniveau der Pyramidenzellen abhängig ist (Urban-Ciecko und Barth 2016). Ebenso scheinen sie an einer Vielzahl von Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Ramos et al. 2006), neurodegenerativen Erkrankungen (Zhang et al. 2016) oder Epilepsien (Peng et al. 2013) beteiligt zu sein. Diese Arbeit hat sich mit der GABA-vermittelten Modulation von Martinotti-Zellen und ihrer präsynaptischen inhibitorischen Terminalen im somatosensorischen (Barrel-)Kortex der Maus beschäftigt. Die elektrophysiologischen Untersuchungen *in vitro* konnten folgendes zeigen:

Martinotti-Zellen (MC) exprimieren GABA_B-Rezeptoren sowohl in Schicht II/III als auch in Schicht V des somatosensorischen Kortex. Dabei zeigt sich für Zellen der Schicht V eine tendenziell stärkere und schnellere Hyperpolarisation der Zellmembran als Reaktion auf die Badapplikation des spezifischen GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen. Des Weiteren lösen inhibitorische Eingänge an MC postsynaptische inhibitorische Ströme (IPSCs) aus, die über GABA_A-Rezeptoren vermittelt und hauptsächlich durch Chloridionen getragen sind. Die IPSCs unterliegen einer frequenzabhängigen *short-term depression*, als Unterform der Kurzzeitplastizität. Auf den präsynaptischen inhibitorischen Terminalen auf MC werden GABA_B-Rezeptoren exprimiert, die die Kurzzeitplastizität der IPSCs modulieren können. Der spezifische GABA_B-Rezeptor-Antagonist CGP zeigt keinen Einfluss auf die Kurzzeitplastizität. Präsynaptische GABA_B-Rezeptoren sind an keiner „synaptischen Autoinhibition“ bei repetitiver Stimulation beteiligt.

Durch die erhobenen Ergebnisse konnte verdeutlicht werden, dass Inhibition im Neokortex mehr als nur durch GABA_A-Rezeptoren vermittelt ist. Metabotrope GABA_B-Rezeptoren sind an einer langsameren und langfristigeren Modulation komplexer kortikaler Schaltkreise beteiligt, ihre genaue Funktion auf MC und ihren präsynaptischen Terminalen ist bislang allerdings noch nicht ausreichend bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.1 Methodische Betrachtung

Die *Patch-clamp*-Methode in der *Whole-cell*-Konfiguration stellt den Goldstandard in der elektrophysiologischen Untersuchung von Neuronen dar. Kombiniert mit der Möglichkeit die Ionenkonzentration sowohl intra- als auch extrazellulär festzulegen, lässt sich die Expression von Rezeptoren und der Ionenfluss über die Zellmembran charakterisieren. So wurden in dieser Arbeit beispielweise eine kaliumglukonatbasierte Intrazellulärlösung für die Detektion postsynaptischer GABA_B-Rezeptoren verwendet (Abs. 3.1) und eine cäsiumbasierte Intrazellulärlösung zur Charakterisierung der IPSCs und deren potentielle Modulation durch präsynaptische GABA_B-Rezeptoren (Abs. 3.4). Bei den hier untersuchten GABA-Rezeptoren erlaubt die elektrophysiologische Untersuchung somit Rückschlüsse auf deren physiologische Wirkungsweise.

Die Möglichkeit mit Hilfe von Verstärkern an die Membran der abgeleiteten Zelle eine beliebige Spannung anzulegen, ist für Untersuchungen hinsichtlich der Rezeptorfunktion besonders wertvoll. Im *Current-clamp*-Modus konnte so die Änderung des Membranpotentials als Reaktion auf eine Rezeptoraktivierung gemessen werden. Wohingegen im *Voltage-clamp*-Modus ein positives Membranpotential von +10 mV angelegt wurde, um die elektrochemische Triebkraft für Chloridionen zu erhöhen und somit auch geringe Netto-Stromflüsse beim Ruhemembranpotential messen zu können.

Zudem bietet die *Patch-clamp*-Methode vielfältige Kombinationsmöglichkeiten mit anderen Techniken. In dieser Arbeit wurde neben der Applikation von Pharmaka zur Rezeptoranalyse die extrazelluläre elektrische Stimulation genutzt, um eingehende präsynaptische Fasern und ihre Synapsen zu stimulieren. Damit ist es möglich auf die MC terminierende Axone und deren Synapsen zu charakterisieren, insbesondere deren Kurzzeitplastizität. Morphologische, molekularbiologische und immunhistochemische Studien lassen zwar ebenso Rückschlüsse über die Art der Rezeptoren zu, allerdings ist es so nicht möglich die Qualität und Intensität der zellulären Antwort darzustellen und deren Wirkung auf die Zellen zu beschreiben (und das in Echtzeit).

4.1.1 Das *Liquid-junction-Potential*

Ein Problem bei der elektrophysiologischen Betrachtung von Membranpotentialen ist das Flüssigkeitengrenzschichtpotential (*liquid junction potential*, LJP). Dabei kommt es an der Kontaktfläche zwischen zwei Flüssigkeiten zum Austausch von Ionen, die der elektrochemischen Triebkraft folgen. Dieses Phänomen ist schon lange bekannt und wurde bereits durch

Walther Nernst (Nernst 1888; Nernst 1889) und Max Planck (Planck 1890a; Planck 1890b) theoretisch beschrieben.

Mit Dauer der Ableitung entsteht während der *Whole-cell-patch-clamp*-Versuche eine Potentialdifferenz zwischen Messelektrode und Badlösung, die stetig zunimmt (also für jeden Messpunkt unterschiedlich sein kann) und neben der unterschiedlichen Ionenkonzentration bei der Lösungen, abhängig von der Pufferkapazität der Lösungen ist (Yamada et al. 2015). Um den Einfluss des LJP auf die Versuche zu minimieren, wurde am Ende der Ableitungen die Differenz zum eingestellten Nullpotential (Anfangswert) gemessen. Abweichungen von mehr als 4 mV führten zu einer Anpassung der angelegten Haltepotentiale in der *Voltage-clamp*-Konfiguration. Das *Liquid-junction*-Potential, welches aufgrund der verwendeten intrazellulären Lösungen entsteht, wurde nicht zur Anpassung der gemessenen Ruhemembranpotentiale berücksichtigt.

4.1.2 Der *Space-clamp*-Fehler

Der *Space-clamp*-Fehler beschreibt ein Problem des *Voltage-clamp*-Modus bei *patch-clamp*-Ableitungen (Rall und Segev 1985). Der vom Verstärker angegebene Wert für das eingestellte Membranpotential wird dabei aus dem Mittelwert zwischen der im Zellsoma und der in den distalen Zellabschnitten abgeleiteten Spannung berechnet (Bar-Yehuda und Korngreen 2008). Es ergeben sich Potentialdifferenzen, die mit einem Ladungsverlust durch Leckströme zu erklären sind. Um dieses Problem zu reduzieren wurde im *Voltage-clamp*-Modus eine cäsiumbasierte Intrazellulärlösung verwendet. Cäsium ist in der Lage unspezifisch Kaliumkanäle zu blockieren. Durch den höheren errechneten Atomradius (Cs: 298 pm; K: 243 pm) bei ähnlicher Elektronegativität nach Pauling (Cs: 0,79; K: 0,82) können die beiden Alkalimetalle gegeneinander ausgetauscht werden (Pauling und Yost 1932). Sobald Kaliumkanäle sich öffnen, besetzt Cäsium diesen Platz, ohne die Kanäle passieren zu können. Spannungsabhängige Kaliumkanäle, die entlang des Dendritenbaumes einer Zelle für die Repolarisation verantwortlich sind, d.h. zur Abschwächung zum Soma laufender Spannungsänderungen, werden durch Cäsiumionen blockiert, sodass distale Spannungsänderungen bzw. Ionenströme über die postsynaptische Membran am Soma durch die Patchpipette detektiert werden können (Sakmann und Neher 2009). In diesem Zusammenhang spricht man von einer „kompakten“ Zelle. Das angelegte Membranpotential von +10 mV erhöht zudem die elektrische Triebkraft für Chloridionen und ermöglicht die Messung auch sehr schwacher Ströme in Größenordnungen von wenigen pA (Hille 2001).

Dennoch zeigte sich bei der Bestimmung des Umkehrpotentials der ePSCs (Abs. 3.3), dass es nicht möglich war, die distalen Zellabschnitte auf ein bestimmtes Membranpotential zu klemmen. In einem Bereich für Membranpotentiale negativer als -60 mV war dies nicht uneingeschränkt durchführbar (Abb. 3.10). Da alle Versuche zur Charakterisierung der ePSCs bei einem Haltepotential von $+10$ mV stattfanden (und somit im Bereich der linearen Abhängigkeit), kann eine Kontamination der Messergebnisse durch den *Space-clamp*-Fehler weitestgehend ausgeschlossen werden.

4.1.3 *In-vitro*- versus *In-vivo*-Versuchsaufbau

Alle Experimente wurden an 300 μm dicken thalamokortikalen akuten Hirnschnitten (*in vitro*) durchgeführt. Gegenüber *In-vivo*-Experimenten haben diese den Vorteil sowohl die intra- als auch die extrazelluläre Lösung kontrollieren und die Applikation von Pharmaka durchführen zu können. Über das Wissen der genauen Ionenkonzentration der verwendeten Lösungen lassen sich präzise konzentrationsabhängige Effekte messen und mathematische Zusammenhänge bilden. Dadurch können kontrollierte, reproduzierbare Bedingungen geschaffen werden, die bei lebenden Tieren nicht möglich wären. So kann die Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Versuchen und Laboratorien gewährleistet bleiben. Der größte Nachteil ist, dass nur ein Teil des neuronalen Netzwerks betrachtet werden kann. Faserverbindungen zwischen den Neuronen können bei der Herstellung der Schnitte zerstört werden und schon während der Präparation der Versuchstiere treten postmortale Degenerationen auf. Auch während der Versuche kann trotz größter Sorgfalt im Umgang mit den Präparaten nicht verhindert werden, dass weitere Zellen oder Gewebeareale absterben.

In-vivo-Experimente haben den Vorteil, dass sie den physiologischen Bedingungen näher kommen. Hier können Phasen geringer und hoher kortikaler Hintergrundaktivität beobachtet werden (sog. *UP*- und *DOWN*-states). Doch ist nicht abschließend geklärt, welche Folgen beispielsweise durch den Einfluss von Anästhetika auf das Tier auftreten und in wie weit die Messergebnisse dadurch beeinflusst werden. Ein weiterer Vorteil ergibt sich daraus, dass die komplette Morphologie der Zellen dargestellt werden kann, da die Anfertigung von Schnitten keine Axone oder Dendriten beschädigt und somit auch weitreichende Verzweigungen in andere kortikale Areale dargestellt werden können (Joshi und Hawken 2006).

Für Experimente, deren Fokus auf Einzelzellen und die auf sie konvergierenden präsynaptischen Terminalen liegen und in denen durch eine Rezeptoranalyse ein Grundverständnis zur Funktionsweise dieser Zellen aufgebaut werden soll, überwiegen die Vorteile der *In-vitro*-Bedingungen. Jene Bedingungen kamen daher in dieser Studie zur Anwendung.

4.1.4 Limitationen bei der elektrophysiologischen Rezeptoranalyse

Da metabotrope Rezeptoren über intrazelluläre Signalmoleküle (sog. *second messenger*) ihre Wirkung entfalten, gestaltet sich die elektrophysiologische Untersuchung ihrer Wirkungsweise komplizierter, als bei ionotropen Rezeptoren, bei denen ein direkter Ionenfluss gemessen werden kann. In den Experimenten (Abs. 3.2) konnte durch die gemessene Änderung des Membranpotentials ein Effekt nachgewiesen werden, allerdings konnten mögliche Änderungen z.B. in der Langzeitplastizität nur eingeschränkt untersucht werden. Etwaige Modulationen der Genexpression durch Konformationsänderungen der im Zellkern lokalisierten Moleküle beispielsweise würden Langzeitbeobachtungen erfordern, die mit den elektrophysiologischen Untersuchungen an akuten Hirnschnitten nicht möglich sind.

4.2 Identifizierung abgeleiteter Zellen

Martinotti-Zellen (MC) sind die größte Gruppe der Somatostatin exprimierenden Interneurone im Neokortex. Somatostatin (SST), Parvalbumin (PV) und der Serotoninrezeptor 3a (5HT3aR) stellen molekulare Marker für nicht-überlappende Populationen von GABAergen Neuronen im Kortex dar (Xu et al. 2010; Rudy et al. 2011; Staiger et al. 2015).

In dieser Arbeit wurde die GIN-Maus verwendet (Oliva et al. 2000), deren GFP-positive Zellen überwiegend und in den Schichten II/III und V explizit Martinotti-Zellen repräsentieren (Rudy et al. 2011; Walker et al. 2016). Die Zellen konnten daher unter Fluoreszenzlicht aufgesucht und unter Infrarotlicht gepatcht werden (Abb. 3.1). Anschließend wurden die abgeleiteten Zellen elektrophysiologisch charakterisiert (Tab. 3.1). Ein wichtiges elektrophysiologisches Charakteristikum der MC ist ihr adaptierendes Feuerverhalten in Folge einer langanhaltenden überschwelligem Strominjektion (Kawaguchi und Kubota 1997; Ascoli et al. 2008). Während der Versuche wurden die Zellen mit Biocytin gefüllt und im Anschluss mit der ABC-DAB-Färbetechnik sichtbar gemacht und lichtmikroskopisch auf ihre Morphologie und Lage im Kortex hin untersucht (vgl. Material und Methoden). Neben dem polygonalen Zellkörper wurde dabei auf das bis in Schicht I des Kortex aufsteigende Axon geachtet, welches sich dort über die Kolumnengrenzen hinweg verzweigt (De Felipe et al. 2013; Staiger et al. 2015).

Somit kann durch (i) die Verwendung einer spezifischen Mauslinie (GIN-Maus), (ii) die elektrophysiologische Charakterisierung und (iii) die morphologische Rekonstruktion der Zellen sichergestellt werden, dass es sich bei den abgeleiteten Zellen um Martinotti-Zellen des primär somatosensorischen (Barrel-)Kortex handelt.

4.3 Expression von GABA_B-Rezeptoren auf Martinotti-Zellen

In dieser Arbeit konnten funktionell wirksame GABA_B-Rezeptoren auf Martinotti-Zellen der Schicht II/III und der Schicht V des primär somatosensorischen Kortex der Maus nachgewiesen werden. Nach der Badapplikation des spezifischen GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen konnte eine langanhaltende Hyperpolarisation des Membranpotentials beobachtet werden. Weiterhin zeigte sich eine unterschiedliche Kinetik im Antwortverhalten der Martinotti-Zellen der Schichten II/III und V (Abb. 3.6), welche allerdings nicht statistisch signifikant war. Diese Experimente lieferten die Grundlage für weiterführende Experimente der Arbeitsgruppe, in welchen eine Charakterisierung der auswärtsgerichteten GABA-vermittelten Ströme in Schicht V mittels Druckapplikation durchgeführt wurde (Glöckner 2020). Hierbei wurde zudem der Frage nachgegangen, inwiefern sich das Antwortverhalten der Kurzzeitplastizität der MC aus den Schichten II/III und V bei der Aktivierung präsynaptischer GABAerger Terminalen unterscheidet. Die Daten zeigen, dass GABA_B-Rezeptoren an der Terminalen der MC in Schicht V keinen Einfluss auf die Kurzzeitplastizität haben. Eine mögliche Ursache kann ein unterschiedlich großer Vesikelpool sein, was weiterer Untersuchungen bedarf (Glöckner 2020).

GABA_B-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Heterodimere, die über *second messenger* Einfluss auf die Aktivierungswahrscheinlichkeit unterschiedlicher Ionenkanäle haben (Jones et al. 1998) und die Ca²⁺-Permeabilität von NMDA-Rezeptoren hinabsetzen (Chalifoux und Carter 2011). Sie sind auch dazu fähig, GABA-unabhängig die Antwort metabotroper Glutamaterezeptoren zu steigern, da sie als Ca²⁺-Sensoren fungieren können (Ulrich und Bettler 2007). Postsynaptisch führt die gesteigerte Permeabilität von K⁺-Ionen zur Auslösung von IPSCs und zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran. Daher gilt GABA als der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter.

Durch den unter Abs. 3.2 verwendeten Versuchsaufbau ist davon auszugehen, dass die beobachtete Hyperpolarisation infolge einer Applikation von Baclofen durch postsynaptische bzw. extrasynaptische GABA_B-Rezeptoren auf der MC hervorgerufen wurde. Andere Arbeiten verweisen ebenfalls darauf, dass GABA_B-Rezeptoren meist prä- oder extrasynaptisch lokalisiert sind (Kulik et al. 2003; Booker et al. 2013). Inwieweit und wodurch diese GABA_B-Rezeptoren auch unter physiologischen Bedingungen aktiviert werden, konnte anhand der durchgeführten Experimente nicht geklärt werden. GABAerge Projektionen auf Martinotti-Zellen konnten bereits in vielen Studien nachgewiesen werden. Zum einen projizieren PV⁺-Zellen (Barrel-Kortex: Walker 2016, Hippocampus: Booker et al. 2013) und zum anderen VIP⁺-Zellen (Barrel-Kortex: Walker 2016; Lee et al. 2013, visueller Kortex: Fu et al. 2014;

Zhang et al. 2014; Jiang et al. 2015, auditiver und präfrontaler Kortex: Pi et al. 2013) auf MC. Diese Kontakte sind überwiegend in Form von chemischen Synapsen zwischen den Neuronen und scheinen daher für eine extrasynaptische Aktivierung von GABA_B-Rezeptoren nicht direkt in Frage zu kommen. Allerdings konnte durch Paarableitungen von Pyramidenzellen und Interneuronen im Hippocampus gezeigt werden, dass es bei hochfrequenter Stimulation zu einem *spillover* von GABA aus dem synaptischen Spalt kommt. Daraufhin werden präsynaptische GABA_B-Rezeptoren auf den Prinzipalneuronen aktiviert und die Ausschüttung von Glutamat gehemmt (Scanziani 2000). Ein einzelnes Interneuron war dazu allerdings nicht in der Lage, sondern nur die synchronisierte Netzwerkaktivität bei hochfrequenter Stimulation (Scanziani 2000). Auch GABA_A-Rezeptoren besitzen Untereinheiten, welche die Netzwerkaktivität während *spillover*-Phasen regulieren (Rossi und Hamann 1998; Bright et al. 2011). Die GABAerge Signaltransmission scheint also weitaus komplexer zu sein als bislang angenommen. Aktuelle Studien im Neokortex der Maus zeigen, dass MC auch unter *in-vivo*-Bedingungen ein Netzwerkverhalten zeigen und einige synchrone Aktionspotentiale von SST⁺-Interneuronen dazu in der Lage sind andere Zellen aus ihrer Gruppe zum Feuern zu bringen (Karnani et al. 2016). Allerdings geht man bislang davon aus, dass Martinotti-Zellen keine chemischen Synapsen untereinander ausbilden (Ma et al. 2012; Pfeffer et al. 2013). Diese Synapsen scheinen also der Kommunikation mit anderen Zelltypen zu dienen, welche auf diese Weise das Netzwerkverhalten der MC beeinflussen.

Eine weitere Möglichkeit extrasynaptische GABA_B-Rezeptoren zu aktivieren wird einer Untergruppe der 5HT_{3a}-exprimierenden Interneuronen, den Neurogliaformen-Zellen (NGFC), zugesprochen. Sie bilden überwiegend keine direkten chemischen Synapsen mit ihren Zielzellen, sondern setzen GABA als sog. Volumentransmission in den extrazellulären Raum frei (Tamás et al. 2003; Oláh et al. 2009; Rózsa et al. 2015). Durch diesen Mechanismus ist es einerseits möglich eine Vielzahl von Zielzellen gleichzeitig zu inhibieren, andererseits werden so auch extrasynaptisch lokalisierte Rezeptoren aktiviert. Einzelne NGFC sind in der Lage in 84 % der potentiellen postsynaptischen Zellen IPSPs auszulösen (Oláh et al. 2009), wobei der Effekt sowohl über GABA_A-Rezeptoren als auch über GABA_B-Rezeptoren vermittelt wurde (Tamás et al. 2003; Oláh et al. 2009; Rózsa et al. 2015). Neurogliaforme-Zellen scheinen eine bislang unterschätzte Rolle in der Informationsverarbeitung zu spielen. Diese wären – vor allem sofern die GABA_B-Rezeptoren extrasynaptisch vorkommen – ein wahrscheinlicher Ursprung der Transmitterfreisetzung, die postsynaptische GABA_B-Rezeptoren an MC aktivieren.

Bei der Komplexität der kortikalen Informationsverarbeitung ist es denkbar, dass beide Mechanismen nebeneinander existieren. Die Funktion der in dieser Arbeit nachgewiesenen Rezeptoren auf MC bedarf also weiterer Abklärung, um zu verstehen unter welchen Bedingungen diese das Interneuron unter physiologischen Bedingungen inhibieren. Auch die schichtenspezifischen Differenzen im Antwortverhalten müssen noch näher untersucht werden. Die Arbeitsgruppe um Jiang konnte für den visuellen Kortex bereits zeigen, dass sich die präsynaptischen Eingänge auf MC der Schichten II/III und V unterscheiden (Jiang et al. 2015). Dies legt nahe, dass Martinotti-Zellen schichtenspezifisch in unterschiedliche inhibitorische Regelkreise eingebunden sind und andere Funktionen in der Regulation der kortikalen Informationsverarbeitung erfüllen. Die höhere Amplitude und schnellere Kinetik der postsynaptischen Antwort von Schicht V MC wäre beispielsweise dadurch zu erklären, dass sich die Anzahl der GABA_B-Rezeptoren auf Martinotti-Zellen in den Schichten unterscheidet. Denkbar ist auch, dass sich MC der Schicht II/III und Schicht V in den intrazellulär ablaufenden, G-Protein vermittelten Signalkaskaden unterscheiden. Um diesen Verdacht erhärten oder widerlegen zu können, werden allerdings höhere Zellzahlen benötigt. Bei den hier untersuchten 14 Zellen, von denen 9 eine Änderung des Membranpotentials zeigten, war der Unterschied nicht statistisch signifikant.

Neben dem Einfluss auf die neuronale Plastizität (Abs. 1.6) wäre es denkbar, dass auf Martinotti-Zellen exprimierte GABA_B-Rezeptoren für einen Wechsel zwischen *UP*- und *DOWN*-states benötigt werden (Oldfield et al. 2010). Um diese Frage klären zu können werden allerdings *in-vivo*-Experimente mit höheren Zellzahlen benötigt.

4.4 GABA-vermittelte Modulation der Kurzzeitplastizität

In dieser Arbeit wurden inhibitorische Fasern bzw. Terminalen von GABAergen Interneuronen auf Martinotti-Zellen der Schichten II/III und V mittels elektrischer Stimulation angeregt. Die postsynaptisch hervorgerufenen IPSCs sind über GABA_A-Rezeptoren vermittelt. Für die MC der Schicht II/III konnte bereits gezeigt werden, dass es sich dabei unter anderem um Terminalen von PV- und VIP-exprimierenden Zellen handelt (Walker et al. 2016). Für die MC der Schicht V gibt es bereits vorläufige Ergebnisse, dass es sich ebenfalls um PV⁺- und VIP⁺-Zellen als präsynaptisch vorgeschaltete GABAerge Interneurone handelt (Walker 2016). Dabei wird vermutet, dass die PV⁺-Zellen mit ihren Somata eher lokal, d.h. in der Schicht V lokalisiert sind, wohingegen die VIP⁺-Zellen auch oder vermehrt in der Schicht II/III vorkommen und mit ihrem absteigenden Axon in die Schicht V ziehen (Proenneke et al. 2015).

Bereits in einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe konnten mittels *patch-clamp*-Ableitungen Anzeichen dafür gefunden werden, dass die präsynaptischen Terminalen der Martinotti-Zellen metabotrope GABA_B-Rezeptoren exprimieren (Delchmann 2017, Glöckner 2020). Durch Badapplikation von Baclofen bei gleichzeitiger Blockade der postsynaptischen GABA_B-Rezeptoren konnte dieses Ergebnis bestätigt und gezeigt werden, dass GABA_B-Rezeptoren ebenfalls auf den präsynaptischen Terminalen der Interneurone vorkommen, die mit den MC der Schicht V Synapsen bilden. Des Weiteren konnte unter repetitiver Stimulation sowohl für MC der Schicht II/III als auch in Schicht V eine frequenzabhängige *short-term depression* bei den eIPSCs nachgewiesen werden. Die Depression der eIPSCs lässt sich unter Hinzugabe des spezifischen GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen im Vergleich zu den Referenzmessungen verringern. Aufgrund dieser Beobachtung wurde der Effekt der synaptischen Autoinhibition vermutet. Bei der Autoinhibition wird davon ausgegangen, dass eine repetitive Transmitterfreisetzung an der Synapse zu hohen Transmitterkonzentrationen im synaptischen Spalt führt und durch Diffusion die extrasynaptisch gelegenen GABA_B-Rezeptoren am Axon des ausschüttenden Neurons aktiviert. Dadurch würde es für weitere in die Terminale einlaufende Aktionspotentiale zu einer reduzierten Transmitterausschüttung kommen, welche eine Depression der eIPSCs bewirken kann. Dieser Mechanismus konnte für andere Synapsen bereits nachgewiesen werden. Bei der Inhibition von PV⁺-Zellen im Hippocampus kommt es bei *theta* Oszillationen durch synchron feuernde Interneurone zu einem *spillover* von GABA aus dem synaptischen Spalt heraus, welcher extrasynaptische GABA_B-Rezeptoren an den PV⁺-Zellen aktivieren kann (Booker et al. 2013). Ebenfalls für CCK⁺ Korbzellen im Hippocampus wurde bereits eine Autoinhibition über GABA_B-Rezeptoren beschrieben (Dugladze et al. 2013).

Um eine mögliche Autoinhibition an den präsynaptischen inhibitorischen Terminalen auf die MC nachzuweisen, wurde CGP, als spezifischer GABA_B-Rezeptor-Antagonist, eingewaschen und eine repetitive elektrische Stimulation der inhibitorischen Eingänge von MC der Schicht II/III und V durchgeführt. Die Ergebnisse (Abb. 3.14) zeigen jedoch keinen signifikanten Unterschied in den Amplituden der IPSCs zwischen Kontrolle und CGP, sowie aller weiteren elektrophysiologischen Parameter bei der Analyse der eIPSCs (Anhang Abb. 6.2). Gleiches trifft für die frequenzabhängige Depression unter Blockade der präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren zu. Die Resultate belegen eindeutig, dass die Hypothese der Autoinhibition unter repetitiver Stimulation an den inhibitorischen Terminalen zu MC nicht zutrifft. Daher ist die beobachtete Depression der eIPSCs nicht über präsynaptische GABA_B-Rezeptoren vermittelt. Wie in Abs. 1.5 beschrieben, ist die Depression der eIPSCs an den MC höchstwahrscheinlich über eine Reduktion des Vesikelpools in der Präsynapse bedingt.

Diese Schlussfolgerung kann aufgrund der Baclofen-Versuche getroffen werden. Unter Baclofen lässt sich eine Reduktion der Amplitude der IPSCs beobachten, welche durch einen verringerten präsynaptischen Ca^{2+} -Einstrom und der damit einhergehenden geringeren Ausschüttung von mit Neurotransmitter gefüllten Vesikeln erklärt werden kann (Chen und van den Pol 1998; Takahashi et al. 1998; Porter und Nieves 2004). Bei einer repetitiven Stimulation unter Baclofen werden vom ersten IPSC weniger Vesikel ausgeschüttet, sodass der Vesikelpool nicht so stark reduziert wird wie unter Kontrollbedingungen. Damit stehen für die nachfolgenden IPSCs mehr Vesikel zur Verfügung und es lässt sich eine geringere Depression in der Kurzzeitplastizität der eIPSCs beobachten.

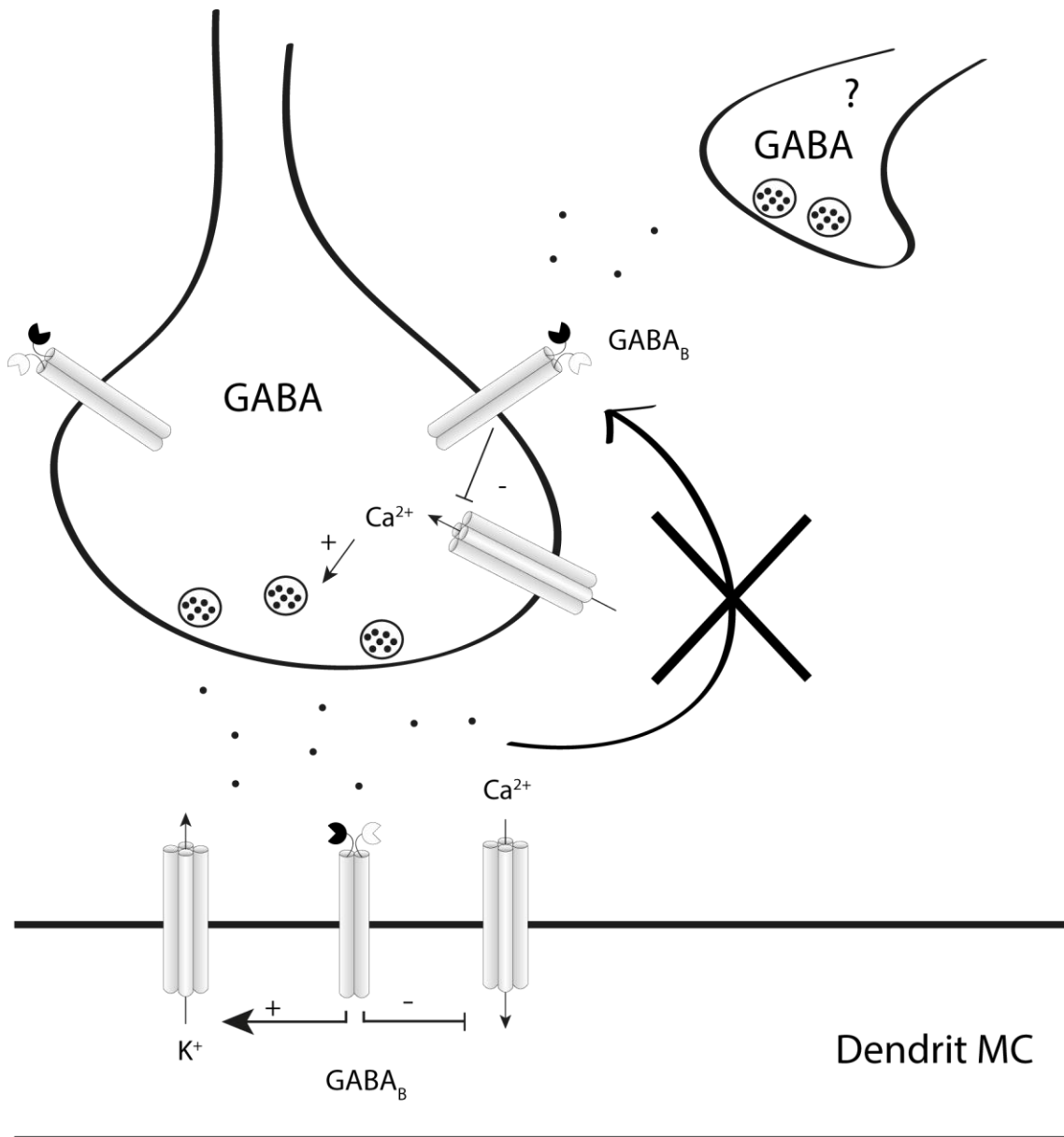


Abbildung 4.1: Modellvorstellung einer inhibitorischen Synapse an den MC

Dargestellt ist eine Synapse zwischen dem Dendriten einer Martinotti-Zelle (unten) und einer präsynaptischen GABAergen Terminale (oben). Schwarze Punkte stellen den Neurotransmitter GABA dar. Aktivierte $GABA_B$ -Rezeptoren hemmen den Ca^{2+} -Einstrom (insbesondere präsynaptisch) und fördern den K^+ -Ausstrom, welcher postsynaptisch zu einer langanhaltenden Hyperpolarisation führt. Während der Neurotransmission aktiviert GABA postsynaptische $GABA_A$ -Rezeptoren und auch extrasynaptische $GABA_B$ -Rezeptoren. Dabei diffundiert GABA nicht aus dem synaptischen Spalt um die Bindungsstellen präsynaptischer $GABA_B$ -Rezeptoren zu besetzen. Andere mit „?“ markierte Zellen müssen also die Quelle des extrasynaptischen GABA sein, welches in der Lage ist die präsynaptischen Terminalen zu den Martinotti-Zellen zu modifizieren. Modifiziert nach Ulrich und Bettler (2007).

4.5 Physiologische Relevanz und Ausblick

Martinotti-Zellen kommen nicht nur beim Nager, sondern auch beim Menschen vor. Sie sollen an der Entstehung von unterschiedlichen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen beteiligt sein. Epilepsie ist dabei das am Besten untersuchte Krankheitsbild, in welchem neben anatomischen auch funktionelle und genetische Veränderungen von Martinotti-Zellen beobachtet werden konnten (Zhang et al. 2009; Halabisky et al. 2010; Buckmaster und Wen 2011; Peng et al. 2013; Grosser et al. 2014; Tai et al. 2014). Bei einem Tiermodell für Schizophrenie konnte gezeigt werden, dass die mRNA Expression von SST erniedrigt war und auch, dass die SST⁺-Zellen, zu denen die Martinotti-Zellen gehören, niedrigere Level an Somatostatin-mRNA exprimierten, als gesunde Tiere (Morris et al. 2008).

Die Untersuchung der Funktionsweise von Martinotti-Zellen im Tiermodell stellt einen ersten Schritt dar, um die komplexen Verschaltungen der Nervenzellen zu verstehen. So scheinen die MC eine Sonderrolle unter den GABAergen Neuronen einzunehmen. Bei Nagern zeigten *in-vivo*-Experimente, dass MC tonisch aktiv sind und im Gegensatz zu allen anderen Interneuronen bei aktiven und passiven Vibrissenbewegungen durch sensorische Eingänge erregt werden (Gentet et al. 2012). Doch gerade die Diversität der kortikalen Interneurone und ihre areal- und schichtenspezifischen einzigartigen Aufgaben zeigen (Petersen 2014), dass wir uns mit dem Verständnis der Funktionalität noch am Anfang befinden. Erst wenn das komplizierte Netzwerk von Verschaltungen verstanden worden ist, ist es möglich das Modell auf den Menschen zu erweitern, um Therapieansätze für neurologische und psychologische Erkrankungen, die mit Veränderungen dieser Zellen assoziiert sind, zu entwickeln. Wie aktuell die Thematik ist, zeigt nicht zuletzt das auf zehn Jahre angelegte *Human Brain Project*. Das im Jahr 2013 gestartete internationale Forschungsprojekt der Europäischen Union, welches mind. 1,2 Mrd. Euro kosten wird, soll zum einen die Daten zum Gehirn der Maus, besonders zur zellulären und synaptischen Organisation, zusammentragen und anschließend auf das menschliche Gehirn übertragen (Markram et al. 2016). Dies verdeutlicht nicht zuletzt welchen immensen Aufwand es bedeutet, die Funktion des menschlichen Gehirns im Detail zu verstehen.

Es sind weitere Untersuchungen notwendig, bis die Funktion kortikaler Interneurone abschließend geklärt ist. So stellt sich einerseits die Frage welche Funktion die GABA_B-Rezeptoren auf Martinotti-Zellen haben und wo diese lokalisiert sind. Da diese Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum „gespeichert“ werden bis sie in die Membran eingebaut werden, stellt sich der immunhistochemische Nachweis der Lokalisation als schwierig dar. Eine Möglichkeit wäre die elektronenmikroskopische Untersuchung der einzelnen Zellabschnitte

(Soma, Dendriten, Axone), um eine Differenzierung zwischen synaptisch und extrasynaptisch gelegenen Rezeptoren durchzuführen. Um herauszufinden, welche Funktion die Rezeptoren haben, sind *paired recordings* notwendig und ggf. auch die zeitgleiche Stimulation unterschiedlicher Zellpopulationen (Neurogliaforme-Zellen, VIP⁺-Zellen, PV⁺-Zellen und andere SST⁺-Zellgruppen). Ein Ansatz wäre hier, die optogenetische Stimulation über Channelrhodopsin mit einem Laser oder einer LED, bei zeitgleicher Ableitung räumlich nahe gelegener Martinotti-Zellen. Auf diese Weise ließe sich klären, durch welche GABAergen Neurone die GABA_B-Rezeptoren auf den präsynaptischen Terminalen aktiviert werden und dadurch maßgeblich die Inhibition an den MC modulieren können. Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass eine Autoinhibition ausgeschlossen werden kann. Zudem wird davon ausgegangen, dass VIP⁺ - und PV⁺-Zellen chemische Synapsen mit Dendriten bzw. dem Soma der MC bilden (Pfeffer et al. 2013; Lee et al. 2013; Pi et al. 2013; Jiang et al. 2015; Walker et al. 2016) und die SST⁺-Zellen untereinander durch elektrische Synapsen verbunden sind (Hestrin und Galarreta 2005; Ma et al. 2011; Hu und Agmon 2015). Daher kommen für die Frage, welche GABAerge Zellen extrasynaptische bzw. präsynaptische GABA_B-Rezeptoren aktivieren können, vorrangig die Neurogliaformen Zellen in Betracht. Nachfolgende Experimente sollten sich dieser Subpopulation von inhibitorischen Interneuronen annehmen und die Funktion der NGFC im Netzwerk der Martinotti-Zellen aufklären. Dabei müsste insbesondere die mögliche Volumentransmission von GABA durch die NGFC im Fokus der Studie stehen.

Neben den Untersuchungen unter *in-vitro*-Bedingungen, welche gezieltere Experimente zur Analyse inhibitorischer Netzwerke ermöglichen, müssten nach Aufklärung der genauen Funktionsweise der inhibitorischen regulatorischen Schaltkreise, diese unter *in-vivo*-Bedingungen und zudem am wachen Tier durchgeführt werden. Nur so kann die physiologische Relevanz bei unbeeinflussten Transmitterkonzentrationen bestätigt werden. Bislang decken sich größtenteils die erzielten Ergebnisse in *in-vitro*-Studien mit denen unter *in-vivo*-Bedingungen, wenn es um die Verschaltung von Neuronen im somatosensorischen Kortex der Maus geht (Pala und Peterson 2015).

5 Zusammenfassung

Das Gehirn ist unter physiologischen Bedingungen ständigen Umbauvorgängen unterworfen. Dabei spielen Erregung (Exzitation) und Hemmung (Inhibition), und insbesondere deren Balance, eine wichtige Rolle. Neuronale Plastizität macht das Gehirn zu einem anpassungsfähigen und vielseitigen Organ. Die Komplexität der Interaktionen auf zellulärer Ebene ist bis heute Gegenstand der medizinischen Forschung, um ein besseres Verständnis der physiologischen Eigenschaften zu erlangen und damit Ansätze für neue Therapiestrategien gegen neurodegenerative Erkrankungen, Epilepsien oder neuropsychiatrischer Erkrankungen entwickeln zu können.

Martinotti-Zellen gehören zu einer Gruppe kortikaler inhibitorischer Neurone, die an komplexen Verschaltungen beteiligt sind, eine wesentliche Rolle bei Lernvorgängen spielen und deren Degeneration bei einigen Krankheitsbildern wie beispielsweise Morbus Alzheimer oder Temporallappenepilepsien beobachtet wird. Dabei ist die Modulation der Kurzzeitplastizität durch inhibitorische präsynaptische GABAerge Terminalen und der Ablauf der intrazellulären Vorgänge die zu einer Inhibition der Martinotti-Zellen führen bislang teilweise ungeklärt und Gegenstand dieser Arbeit.

Im Rahmen der Versuche wurden akute Hirnschnitte des primär somatosensorischen (Barrel-)Kortex der Maus angefertigt und *Whole-cell*-Ableitungen von Martinotti-Zellen der Schichten II/III und V durchgeführt. Dabei wurden die Zellen, neben einer elektrophysiologischen Charakterisierung, hinsichtlich ihrer Expression von metabotropen postsynaptischen GABA_B-Rezeptoren, sowie deren Wirkung durch Applikation spezifischer Pharmaka untersucht. In einer weiteren Versuchsreihe standen die inhibitorischen Eingänge auf die Martinotti-Zellen bezüglich ihrer Kurzzeitplastizität, sowie deren mögliche Modulation durch präsynaptische GABA_B-Rezeptoren an den stimulierten Terminalen im Fokus der Arbeit.

In dieser Arbeit konnten elektrophysiologisch postsynaptische GABA_B-Rezeptoren auf Martinotti-Zellen der Schicht II/III und V des Barrel-Kortex der Maus nachgewiesen werden. Bei Aktivierung bewirken diese eine leichte Hyperpolarisation der MC von $-2,50 \pm 1,59$ mV ($n = 6$) in Schicht II/III und $-3,80 \pm 0,76$ mV ($n = 3$) in Schicht V. Ebenfalls konnte auf präsynaptischen inhibitorischen Terminalen, die sich auf die Martinotti-Zellen der Schichten II/III und V verschalten, GABA_B-Rezeptoren nachgewiesen werden, die zu einer verringerten Amplitude der elektrisch evozierten (induzierten) inhibitorischen postsynaptischen Ströme führen. Unter repetitiven Stimulationsbedingungen unterliegen die induzierten inhibitorischen postsynaptischen Ströme einer Kurzzeitdepression, welche nicht über GABA_B-

Rezeptoren vermittelt ist, d. h. es liegt keine synaptische Autoinhibition der inhibitorischen Eingänge vor. In welche komplexen kortikalen Signalverarbeitungsvorgängen die präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren an den Terminalen eingebunden sind, und durch welche GABA-freisetzende Zellen sie letztlich aktiviert werden, konnte nicht abschließend geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

6 Anhang

Wie auch in Schicht II/III (Abs. 3.2) zeigte die Badapplikation von 25 μM Baclofen keinen statistisch signifikanten Effekt auf die intrinsischen Eigenschaften der Martinotti-Zellen in Schicht V (Abb. 6.1). Dabei wurden die Werte für den Eingangswiderstand (R_{in}), die Rheobase, Feuerschwelle und Amplitude der Aktionspotentiale (APs) miteinander verglichen.

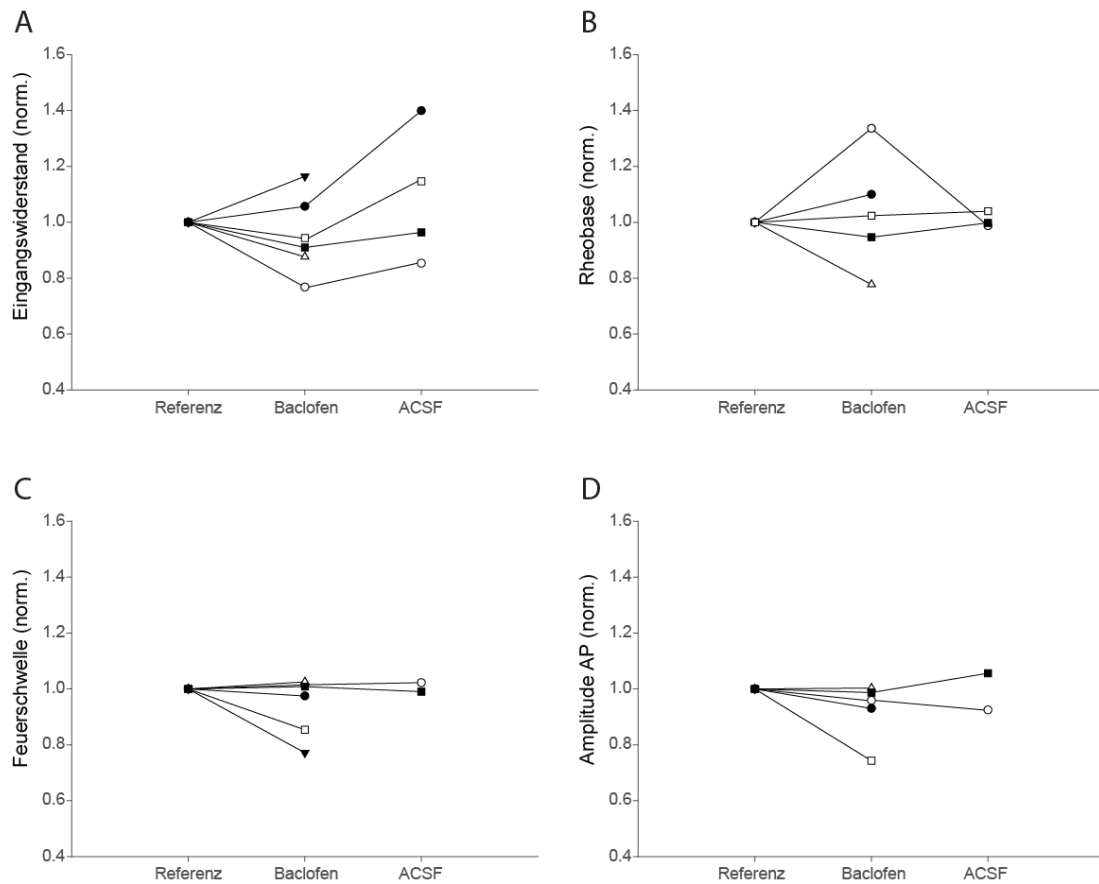


Abbildung 6.1: Effekt von Baclofen auf die intrinsischen Eigenschaften von Martinotti-Zellen der Schicht V

Intrinsische Eigenschaften von Martinotti-Zellen der Schicht V unter Kontrollbedingungen, unter Baclofen (25 μM) und nach erfolgtem Auswasch mit ACSF. Die Werte **(A)** Eingangswiderstand, **(B)** Rheobase, **(C)** Feuerschwelle und **(D)** Amplitude des Aktionspotentials sind normalisiert dargestellt.

Bei dem Vergleich der IPSCs vor (Referenz) und nach der Applikation von 10 μM CGP52432 wurden die elektrophysiologischen Parameter der eIPSCs miteinander verglichen und in ein relatives Verhältnis zueinander gesetzt. Dabei zeigt sich für die Amplitude der eIPSCs, die Latenz, das Integral unter den IPSCs, die Zeit bis zum Amplitudenmaximum (*ttpeak*), die Breite der IPSCs (*width*), die Steigung (*slope*) und die maximale Steigung (*max slope*) der IPSCs keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abb. 6.2).

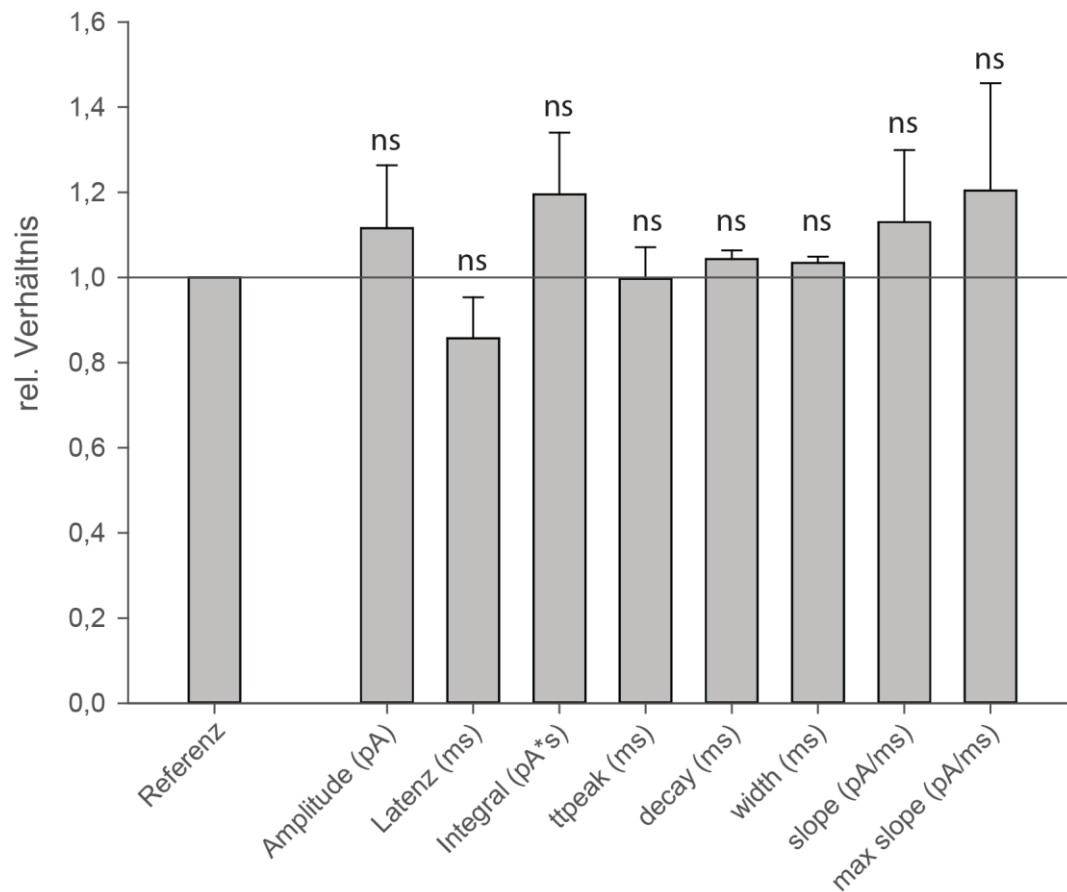


Abbildung 6.2: Vergleich elektrophysiologischer Parameter vor und nach der Applikation von CGP

Vergleich der relativen Verhältnisse der elektrophysiologischen Parameter der eIPSCs bei Einzelstimulationen vor und nach der Applikation von 10 μM CGP. Dargestellt sind die gemittelten Werte der Amplitude der eIPSCs (Amplitude), die Latenz bis zum Auftreten der IPSCs (Latenz), das Integral unter den IPSCs (Integral), die Zeit bis zum Amplitudenmaximum (tpeak), die Breite der IPSCs (width), die Steigung (slope) und die maximale Steigung (max slope) der IPSCs. Bei keinem dieser Parameter zeigte sich nach der Badapplikation von CGP ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Referenzmessungen.

Bei den *train*-Stimulationen mit den Frequenzen 1 Hz, 8 Hz und 40 Hz ergaben sich für das Verhältnis vom letzten PSC (PSC 10) zum ersten PSC (PSC 1) nach der Badapplikation von 10 μM CGP die folgenden Werte:

Tabelle 6.1: Verhältnis des PSC 10 zum PSC 1 nach Einwasch CGP (MW + SEM)

	1 Hz	8 Hz	40 Hz
Schicht II/III Referenz	0,6494 ± 0,0179	0,4815 ± 0,0741	0,3880 ± 0,0407
Schicht II/III nach CGP	0,8025 ± 0,0403	0,4930 ± 0,0463	0,3828 ± 0,1129
Schicht V Referenz	0,7446 ± 0,0376	0,4523 ± 0,1625	0,3757 ± 0,1179
Schicht V nach CGP	0,7705 ± 0,0634	0,5940 ± 0,0402	0,3971 ± 0,0516

Zusätzlich wurden die unter gleichen Bedingungen ermittelten Verhältnisse für den ersten PSC (PSC 1) zum *steady state* (PSC 6-10) frequenzabhängig und schichtenspezifisch bestimmt. Dafür ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 6.2: Frequenzabhängige Werte für PSC 6-10 zu PSC 1 schichtenspezifisch

	1 Hz	8 Hz	40 Hz
Schicht II/III Referenz	0,6625 ± 0,0233	0,4799 ± 0,0394	0,3186 ± 0,0364
Schicht II/III nach CGP	0,7767 ± 0,0235	0,4872 ± 0,0591	0,3569 ± 0,0786
Schicht V Referenz	0,7393 ± 0,0482	0,5288 ± 0,0818	0,3746 ± 0,0533
Schicht V nach CGP	0,8255 ± 0,0201	0,6028 ± 0,0575	0,4199 ± 0,0403

In den Versuchen zur Modulation der Kurzzeitplastizität von Martinotti-Zellen durch prä-synaptische GABA_B-Rezeptoren (Abs. 3.4) ergab sich nur für Zellen der Schicht II/III ein statistisch signifikanter Unterschied ($P < 0,001$) bei einer Frequenz von 1 Hz (Tab. 6.3).

Tabelle 6.3: Statistischer Vergleich der Modulation der Kurzzeitplastizität

t-test	1 Hz	8 Hz	40 Hz
Schicht II/III Referenz vs. Schicht V Referenz	0,153	0,561	0,408
Schicht II/III nach CGP vs. Schicht V nach CGP	0,208	0,231	0,515
Schicht II/III Referenz vs. Schicht II/III nach CGP	0,000170	0,918	0,646
Schicht V Referenz vs. Schicht V nach CGP	0,112	0,138	0,257

7 Literaturverzeichnis

- Agnati LF, Zoli M, Strömberg I, Fuxe K (1995): Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *J Neurosci* 69, 711–726
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsáki G, Cauli B, Defelipe J, Fairén A et al. (2008): Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9, 557–568
- Bar-Yehuda D, Korngreen A (2008): Space-clamp problems when voltage clamping neurons expressing voltage-gated conductances. *J Neurophysiol* 99, 1127–1136
- Bologna E, Leroux P (2000): Identification of multiple somatostatin receptors in the rat somatosensory cortex during development. *J Comp Neurol* 420, 466–480
- Booker SA, Gross A, Althof D, Shigemoto R, Bettler B, Frotscher M, Hearing M, Wickman K, Watanabe M, Kulik Á, Vida I (2013): Differential GABAB-receptor-mediated effects in perisomatic- and dendrite-targeting parvalbumin interneurons. *J Neurosci* 33, 7961–7974
- Bright DP, Renzi M, Bartram J, McGee TP, MacKenzie G, Hosie AM, Farrant M, Brickley SG (2011): Profound desensitization by ambient GABA limits activation of δ -containing GABAA receptors during spillover. *J Neurosci* 31, 753–763
- Brodman K: Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. Barth, Leipzig 1909
- Buckmaster PS, Wen X (2011): Rapamycin suppresses axon sprouting by somatostatin interneurons in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 52, 2057–2064
- Chalifoux JR, Carter AG (2011): GABAB receptor modulation of synaptic function. *Curr Opin Neurobiol* 21, 339–344
- Chen G, van den Pol AN (1998): Presynaptic GABAB autoreceptor modulation of P/Q-type calcium channels and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci* 18, 1913–1922
- Connelly WM, Errington AC, Di Giovanni G, Crunelli V (2013): Metabotropic regulation of extrasynaptic GABAA receptors. *Front Neural Circuits* 7, 171
- DeFelipe J, López-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Biezka 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: Elektrophysiologische Charakterisierung GABA-Rezeptoren vermittelter Inhibition an Martinotti-Zellen im somatosensorischen Kortex. Med. Diss. Göttingen 2017
- Dugladze T, Maziashvili N, Börgers C, Gurgenzidze S, Häussler U, Winkelmann A, Haas CA, Meier JC, Vida I, Kopell NJ, Gloveli T (2013): GABAB autoreceptor-mediated cell type-specific reduction of inhibition in epileptic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 15073–15078

- 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, Brecht M, Helmchen F, Petersen CCH, Poulet JFA, Staiger JF, Luhmann HJ, Schwarz C (2013): Barrel cortex function. *Prog Neurobiol* **103**, 3–27
- Feldmeyer D, Qi G, Emmenegger V, Staiger JF (2018): Inhibitory interneurons and their circuit motifs in the many layers of the barrel cortex. *J Neurosci* **368**, 132–151
- Fu Y, Tucciarone JM, Espinosa JS, Sheng N, Darcy DP, Nicoll RA, Huang ZJ, Stryker MP (2014): A cortical circuit for gain control by behavioral state. *Cell* **156**, 1139–1152
- Gentet LJ, Kremer Y, Taniguchi H, Huang ZJ, Staiger JF, Petersen CCH (2012): Unique functional properties of somatostatin-expressing GABAergic neurons in mouse barrel cortex. *Nat Neurosci* **15**, 607–612
- Gibson JR, Beierlein M, Connors BW (1999): Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* **402**, 75–79
- Glöckner K (2020): Elektrophysiologische Charakterisierung von GABA-Rezeptor-vermittelter Inhibition an Martinotti-Zellen der Schicht 5 im Barrel-Kortex. *Med. Diss. Göttingen 2020*
- Grosser S, Queenan BN, Lalchandani RR, Vicini S (2014): Hilar somatostatin interneurons contribute to synchronized GABA activity in an in vitro epilepsy model. *PLoS One* **9**, e86250
- Halabisky B, Parada I, Buckmaster PS, Prince DA (2010): Excitatory input onto hilar somatostatin interneurons is increased in a chronic model of epilepsy. *J Neurophysiol* **104**, 2214–2223
- Hebb, D. O. (1949). Temperament in chimpanzees: I. Method of analysis. *J Comp Physiol Psychol*, **42**, 192-206.
- Hestrin S, Galarreta M (2005): Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons. *Trends Neurosci* **28**, 304–309
- Hevers W, Lüddens H (1998): The diversity of GABA_A receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes. *Mol Neurobiol* **18**, 35–86
- Hille B: Ionic channels of excitable membranes. 3. Aufl.; Sinauer, Sunderland, Mass 2001
- Hu H, Agmon A (2015): Properties of precise firing synchrony between synaptically coupled cortical interneurons depend on their mode of coupling. *J Neurophysiol* **114**, 624–637
- Huang D, Huang S, Peers C, Du X, Zhang H, Gamper N (2015): GABAB receptors inhibit low-voltage activated and high-voltage activated Ca²⁺ channels in sensory neurons via distinct mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* **465**, 188–193
- 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
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY et al. (1998): GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* **396**, 674–679

- Joshi S, Hawken MJ (2006): Loose-patch–juxtacellular recording in vivo—A method for functional characterization and labeling of neurons in macaque V1. *J Neurosci Methods* 156, 37–49
- Kandel E, Schwartz J, Jessell T: *Neurowissenschaften: Eine Einführung*. Pädiatrische Praxis. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2012
- Kandel ER (2001): The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030–1038
- Karnani MM, Jackson J, Ayzenshtat I, Tucciarone J, Manoocheri K, Snider WG, Yuste R (2016): Cooperative subnetworks of molecularly similar interneurons in mouse neocortex. *Neuron* 90, 86–100
- Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R et al. (1998): GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396, 683–687
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1997): GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7, 476–486
- King MA, Louis PM, Hunter BE, Walker DW (1989): Biocytin: a versatile anterograde neuroanatomical tract-tracing alternative. *Brain Res* 497, 361–367
- Kulik A, Vida I, Luján R, Haas CA, López-Bendito G, Shigemoto R, Frotscher M (2003): Subcellular localization of metabotropic GABA(B) receptor subunits GABA(B1a/b) and GABA(B2) in the rat hippocampus. *J Neurosci* 23, 11026–11035
- Kvitsiani D, Ranade S, Hangya B, Taniguchi H, Huang JZ, Kepecs A (2013): Distinct behavioural and network correlates of two interneuron types in prefrontal cortex. *Nature* 498, 363–366
- Lee S, Hjerling-Leffler J, Zaghera E, Fishell G, Rudy B (2010): The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *J Neurosci* 30, 16796–16808
- 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
- Lovett-Barron M, Kaifosh P, Kheirbek MA, Danielson N, Zaremba JD, Reardon TR, Turi GF, Hen R, Zeman BV, Losonczy A (2014): Dendritic inhibition in the hippocampus supports fear learning. *Science* 343, 857–863
- Lübke J, Feldmeyer D (2007): Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex. *Brain Struct Funct* 212, 3–17
- 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
- Ma Y, Hioki H, Konno M, Pan S, Nakamura H, Nakamura KC, Furuta T, Li J, Kaneko T (2011): Expression of gap junction protein connexin36 in multiple subtypes of GABAergic neurons in adult rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 21, 2639–2649
- Ma Y, Hu H, Agmon A (2012): Short-term plasticity of unitary inhibitory-to-inhibitory synapses depends on the presynaptic interneuron subtype. *J Neurosci* 32, 983–988

- Markram et al. (2016): „Overview - Human Brain Project“. Zugegriffen 23. August 2016. <https://www.humanbrainproject.eu/2016-overview>. „SP1 Mouse Brain Organisation - Human Brain Project“. Zugegriffen 23. August 2016. <https://www.humanbrainproject.eu/sp1>. „SP2 Human Brain Organisation - Human Brain Project“. Zugegriffen 23. August 2016. <https://www.humanbrainproject.eu/sp2>.
- Martinotti C (1889): De la réaction des fibres élastiques avec l'emploi du nitrate d'argent. Rapports entre le tissu musculaire et le tissu élastique. *Arch Ital Biol* 11, 253–271
- Molleman A: Patch clamping: an introductory guide to patch clamp electrophysiology. J. Wiley, New York 2003
- Morris HM, Hashimoto T, Lewis DA (2008): Alterations in somatostatin mRNA expression in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Cereb Cortex* 18, 1575–1587
- Morris RG (1999): D.O. Hebb: the organization of behavior, Wiley: New York; 1949. *Brain Res Bull* 50, 437
- Mountcastle VB (1997): The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 (Pt 4), 701–722
- Nernst W (1889): Die elektromotorische Wirksamkeit der Ionen. *Z Phys Chem (N F)* 4, 129–181
- Nernst W (1888): Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper. *Z Phys Chem (N F)* 2, 613–637
- Obata K, Oide M, Tanaka H (1978): Excitatory and inhibitory actions of GABA and glycine on embryonic chick spinal neurons in culture. *Brain Res* 144, 179–184
- Oláh S, Füle M, Komlósi G, Varga C, Báldi R, Barzó P, Tamás G (2009): Regulation of cortical microcircuits by unitary GABA-mediated volume transmission. *Nature* 461, 1278–1281
- Oldfield CS, Marty A, Stell BM (2010): Interneurons of the cerebellar cortex toggle Purkinje cells between up and down states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13153–13158
- 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
- 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
- Pauling L, Yost DM (1932): The additivity of the energies of normal covalent bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 18, 414–416
- Peng Z, Zhang N, Wei W, Huang CS, Cetina Y, Otis TS, Houser CR (2013): A reorganized GABAergic circuit in a model of epilepsy: evidence from optogenetic labeling and stimulation of somatostatin interneurons. *J Neurosci* 33, 14392–14405
- Petersen CC (2014): Cell-type specific function of GABAergic neurons in layers 2 and 3 of mouse barrel cortex. *Curr Opin Neurobiol* 26, 1–6
- Petersen CC, Sakmann B (2000): The excitatory neuronal network of rat layer 4 barrel cortex. *J Neurosci* 20, 7579–7586

- Petersen CCH, Sakmann B (2001): Functionally independent columns of rat somatosensory barrel cortex revealed with voltage-sensitive dye imaging. *J Neurosci* 21, 8435–8446
- 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 (1890a): Ueber die Erregung von Electricität und Wärme in Electrolyten. *Ann Phys* 275, 161–186
- Planck M (1890b): Ueber die Potentialdifferenz zwischen zwei verdünnten Lösungen binärer Electrolyte. *Ann Phys* 276, 561–576
- 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
- Prönneke A, Scheuer B, Wagener RJ, Möck M, Witte M, Staiger JF (2015): Characterizing VIP neurons in the barrel cortex of VIPcre/tdtomato mice reveals layer-specific differences. *Cereb Cortex* 25, 4854–4868
- Puthenkalam R, Hieckel M, Simeone X, Suwattanasophon C, Feldbauer RV, Ecker GF, Ernst M (2016): Structural studies of GABAA receptor binding sites: which experimental structure tells us what? *Front Mol Neurosci* 9, 44
- Rall W, Segev I: Space-clamp problems when voltage clamping branched neurons with intracellular microelectrodes. In: Smith TG, Lecar H, Redman SJ, Gage PW (Hrsg.): Voltage and patch clamping with microelectrodes. Springer, New York, NY 1985, 191–215
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, del Rio JC, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D et al. (2006): Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27, 1658–1672
- Romeis - Mikroskopische Technik. Hrsg. v. Mulisch M, Welsch U, 19. Aufl.; Springer Spektrum, Heidelberg 2015
- Rossi DJ, Hamann M (1998): Spillover-mediated transmission at inhibitory synapses promoted by high affinity $\alpha 6$ subunit GABAA receptors and glomerular geometry. *Neuron* 20, 783–795
- Roux L, Buzsáki G (2015): Tasks for inhibitory interneurons in intact brain circuits. *Neuropharmacology* 88, 10–23
- Rózsa M, Baka J, Bordé S, Rózsa B, Katona G, Tamás G (2015): Unitary GABAergic volume transmission from individual interneurons to astrocytes in the cerebral cortex. *Brain Struct Funct* 222(1), 651–659
- 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
- Sakmann B, Neher E: Single-channel recording. 2. Auflage; Springer, New York 2009

- Sarto-Jackson I, Sieghart W (2008): Assembly of GABA(A) receptors (Review). *Mol Membr Biol* 25, 302–310
- Scanziani M (2000): GABA spillover activates postsynaptic GABAB receptors to control rhythmic hippocampal activity. *Neuron* 25, 673–681
- Sieghart W (2015): Allosteric modulation of GABAA receptors via multiple drug-binding sites. *Adv Pharmacol* 72, 53–96
- Silberberg G, Markram H (2007): Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron* 53, 735–746
- Simons DJ, Woolsey TA (1984): Morphology of golgi-cox-impregnated barrel neurons in rat SmI cortex. *J Comp Neurol* 230, 119–132
- Sobotta Lehrbuch Anatomie. Hrsg. v. Waschke J, Böckers TM, Paulsen F; Elsevier Health Sciences, München 2019
- Staiger JF, Möck M, Proenneke A, Witte M (2015): What types of neocortical GABAergic neurons do really exist? *eNeuroforum* 6, 49–56
- Stein V, Nicoll RA (2003): GABA generates excitement. *Neuron* 37, 375–378
- 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 U S A* 111, E3139-3148
- Takahashi T, Kajikawa Y, Tsujimoto T (1998): G-Protein-coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABAB receptor. *J Neurosci* 18, 3138–3146
- Tamás G, Lőrincz A, Simon A, Szabadics J (2003): Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science* 299, 1902–1905
- Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016): GABAergic interneurons in the neocortex: from cellular properties to circuits. *Neuron* 91, 260–292
- Trepel M: Neuroanatomie: Struktur und Funktion. 7. Auflage; Elsevier, Urban&FischerVerlag, München 2015
- Ulrich D, Bettler B (2007): GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Curr Opin Neurobiol* 17, 298–303
- Urban-Ciecko J, Barth AL (2016): Somatostatin-expressing neurons in cortical networks. *Nat Rev Neurosci* 17, 401–409
- Urban-Ciecko J, Fanselow EE, Barth AL (2015): Neocortical somatostatin neurons reversibly silence excitatory transmission via GABA_B receptors. *Curr Biol* 25, 722–731
- Walker F (2016): Functional connectivity of layer II/III and V GABAergic Martinotti cells in the primary somatosensory (barrel) cortex of mice. *Med. 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

- Welsch U, Kummer W: Lehrbuch Histologie. 4. Auflage; Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München 2014
- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH (1998): Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396, 679–682
- Wong-Riley MT, Welt C (1980): Histochemical changes in cytochrome oxidase of cortical barrels after vibrissal removal in neonatal and adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2333–2337
- Woolsey TA, Van der Loos H (1970): The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* 17, 205–242
- Xu Q, Cobos I, Cruz EDL, Rubenstein JL, Anderson SA (2004): Origins of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* 24, 2612–2622
- Xu X, Roby KD, Callaway EM (2010): Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J Comp Neurol* 518, 389–404
- Yamada A, Mohri S, Nakamura M, Naruse K (2015): A simple method for decreasing the liquid junction potential in a flow-through-type differential pH sensor probe consisting of pH-FETs by exerting spatiotemporal control of the liquid junction. *Sensors (Basel)* 15, 7898–7912
- Zhang W, Zhang L, Liang B, Schroeder D, Zhang Z, Cox GA, Li Y, Lin D-T (2016): Hyperactive somatostatin interneurons contribute to excitotoxicity in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci* 19, 557–559
- Zhang S, Xu M, Kamigaki T, Hoang Do JP, Chang W-C, Jenvay S, Miyamichi K, Luo L, Dan Y (2014): Selective attention. Long-range and local circuits for top-down modulation of visual cortex processing. *Science* 345, 660–665
- Zhang W, Yamawaki R, Wen X, Uhl J, Diaz J, Prince DA, Buckmaster PS (2009): Surviving hilar somatostatin interneurons enlarge, sprout axons, and form new synapses with granule cells in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 29, 14247–14256
- Zhou Y, Danbolt NC (2013): GABA and glutamate transporters in brain. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 165

8 Danksagung

Für die Entstehung einer Doktorarbeit sind eine Vielzahl an Personen notwendig, bei denen ich mich hier bedanken möchte.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jochen Staiger bedanken, der es mir ermöglicht hat meine Arbeit im Institut für Neuroanatomie der Universitätsmedizin Göttingen anzufertigen. Für die Einführung in die wissenschaftlichen Arbeitsweisen, seine Betreuung während des gesamten Zeitraums und hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen möchte ich mich besonders bedanken.

Ich danke Herrn Dr. Mirko Witte für die ausgezeichnete Betreuung und Einführung in die Grundlagen der Elektrophysiologie. Seine produktiven Vorschläge, große Sachkenntnis und sein permanentes Interesse an der Weiterentwicklung der Experimente waren eine große Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Auch Herrn Dr. Martin Möck möchte ich an dieser Stelle danken. Seine Unterstützung bei der Verarbeitung der erhobenen Daten und seine konstruktive Kritik habe ich sehr geschätzt.

Natürlich möchte ich auch der gesamten Arbeitsgruppe Elektrophysiologie für ihr stetiges Engagement, die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Hilfsbereitschaft bei Fragen oder Problemen danken. Ohne diese Unterstützung hätte diese Arbeit nicht zustande kommen können.

Auch die Unterstützung durch die erfahrene technische Assistentin Frau Patricia Sprysch des Institutes für Neuroanatomie der Universitätsmedizin Göttingen habe ich besonders zu schätzen gelernt.

Neben den genannten Personen bedanke ich mich herzlich auch bei allen anderen, die mich bei der Durchführung dieses Projekts unterstützt haben. Ich blicke mit Freude auf die Zeit während des Anfertigens dieser Arbeit zurück und bin froh um die vielen Erfahrungen, die ich im Rahmen dieser Dissertation sammeln konnte.