

**„Mechanismen und funktionelle Konsequenzen  
der Chlorid-Homöostase in unreifen Neuronen des  
Neocortex“**

**Dissertation zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften**

**am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

vorgelegt von

**Katharina Achilles  
geb. am 13.01.1979 in Wuppertal**

**Mainz, 2008**

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2008

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 GABA und die Entwicklung des zentralen Nervensystems	1
1.2 GABA: Inhibition oder Exzitation?	2
1.3 Chloridhomöostase	5
1.4 Cajal-Retzius-Zellen	8
2 Zielsetzung der Arbeit	12
3 Material und Methoden	13
3.1 Präparation der Hirnschnitte	13
3.2 Elektrophysiologische Messungen	14
3.2.1 <i>Patch-Clamp</i> Technik	14
3.2.2 Gramicidin <i>perforated patch</i> Messungen	17
3.2.3 Das <i>liquid junction</i> Potential	18
3.2.4 Zellcharakterisierung	18
3.2.5 Berechnung des Ruhemembranpotentials	19
3.2.6 Bestimmung der intrazellulären Chloridkonzentration	20
3.3 Histologie	21
3.3.1 Biocytinfärbungen	22
3.3.2 Immunohistochemische Färbungen	23
3.4 Statistische Auswertung	24
3.5 Zusammensetzung der Lösungen	25
4 Ergebnisse	28
4.1 Identifikation von Cajal-Retzius Zellen	28
4.2 Validierung der Methode zur Bestimmung von $[Cl^-]_i$	30
4.3 $Cl^-$ Homöostase in CR Zellen	33
4.3.1 Bestimmung der nativen $[Cl^-]_i$ in CR Zellen	33
4.3.2 NKCC1-Expression in CR Zellen	35

4.3.3	Der Cl <sup>-</sup> -Akkumulationsprozess _____	36
	4.3.3.1 Kinetik der Cl <sup>-</sup> -Akkumulation _____	37
	4.3.3.2 Pharmakologie der Cl <sup>-</sup> -Akkumulation _____	39
4.3.4	Cl <sup>-</sup> -Leitfähigkeiten in CR Zellen _____	42
4.4	Effekte von GABA in CR Zellen _____	45
4.4.1	GABAerge Exzitation _____	45
4.4.2	Unterschwellige GABAerge Membrandepolarisationen _____	49
	4.4.2.1 Effekte GABAerger Depolarisationen in Abhängigkeit von [Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub> _____	49
	4.4.2.2 Zeitliche Auflösung der Effekte GABAerger Depolarisationen _____	53
4.4.3	Mechanismen inhibitorischer GABAerger Membrandepolarisationen _____	55
	4.4.3.2 Beitrag spannungsaktivierter Na <sup>+</sup> -Kanäle an der inhibitorischen Wirkung depolarisierender GABAerger Membranantworten _____	55
5	Diskussion _____	60
5.1	Die native [Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub> in CR Zellen _____	60
5.2	Der Cl <sup>-</sup> -Akkumulationsprozess in CR Zellen _____	61
5.3	Cl <sup>-</sup> -Auswärtstransport in CR Zellen _____	65
5.4	Effekte von GABA in CR Zellen _____	66
5.5	Cl <sup>-</sup> -Akkumulation und die Regulation von Netzwerkaktivität _____	69
5.6	Die Bedeutung elektrischer Aktivität in CR Zellen _____	71
6	Zusammenfassung _____	73
7	Literaturverzeichnis _____	75
	Danke _____	89

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
9-AC	9-Anthracencarbonsäure
ACSF	Artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium-Ion
$\text{Cl}^-$	Chlorid
$[\text{Cl}^-]$	Chloirdkonzentration
$[\text{Cl}^-]_i$	intrazelluläre Chloirdkonzentration
CR Zellen	Cajal-Retzius Zellen
$C_m$	Membrankapazität
DIDS	4,4'-Diisothiocynato-2,2'-Stilbendisulfonsäure
$E_{\text{GABA}}$	Umkehrpotential GABAerger Ströme
$E_m$	Membranpotential
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GBZ	Gabazin
$\text{HCO}_3^-$	Bicarbonat
$I_{\text{GABA}}$	durch GABA induzierter Strom
LJP	<i>liquid junctionpotential</i>
$\text{K}^+$	$\text{K}^+$ -Ion
KCC2	Kalium-Chlorid-Cotransporter, Isoform 2
$\text{Na}^+$	Natrium-Ion
NKCC2	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter, Isoform 1
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
$R_{in}$	Eingangswiderstand
$R_m$	Membranwiderstand
RMP	Ruhemembranpotential
SEM	Standardfehler des Stichproben-Mittelwertes

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin

# 1 Einleitung

## 1.1 GABA und die Entwicklung des zentralen Nervensystems

Die Entwicklung des Nervensystems ist ein komplexer und exakt regulierter Prozess. Die ersten Entwicklungsschritte - Induktion, Neurulation und Bläschenformation - sind genetisch reguliert. Die weitere Reifung des zentralen Nervensystems, einhergehend mit neuronaler Differenzierung, Schichtbildung des Kortex und neuronaler Netzbildung, ist über die genetische Determination hinaus abhängig von der elektrischen Aktivität unreifer Nervenzellen (Khazipov & Luhmann, 2006).

Dem Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) kommt dabei eine besondere Rolle zu. Schon vor der Bildung funktioneller Synapsen exprimieren Vorläuferzellen und reifende Neurone funktionelle GABA-Rezeptoren ((Demarque et al., 2002; Nguyen et al., 2001). Diese Rezeptoren werden durch extrazelluläres GABA aktiviert, das von Pionier-Neuronen, migrierenden Neuronen und Wachstumskegeln sezerniert wird (Represa & Ben Ari, 2005). In unreifen Neuronen bewirkt GABA eine Depolarisation der Zellmembran (Owens & Kriegstein, 2002; Ben-Ari *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 2004; Luhmann & Prince, 1991). Diese ist ausreichend, um spannungsaktivierte Calciumkanäle zu öffnen und so die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) zu erhöhen (Owens et al., 1996). Durch die Aufhebung der Magnesium-Blockade des NMDA-Rezeptors kann die GABAerge Membrandepolarisation zudem einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch NMDA-Rezeptoren erleichtern (Leinekugel et al., 1997). Über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige *second messenger* Signalwege nimmt GABA indirekt Einfluss auf die Genexpression (Cherubini et al., 1991). Sowohl die Proliferation von Vorläuferzellen, als auch die Migration unreifer Nervenzellen und deren Differenzierung werden so durch GABA beeinflusst

(Owens & Kriegstein, 2002; Represa & Ben Ari, 2005). GABAerge Depolarisationen der Zellmembran sind zudem essentiell für die morphologische Reifung neonataler kortikaler Neurone (Cancedda et al., 2007).

Darüber hinaus bilden GABAerge Neurone früh Synapsen aus und generieren Netzwerkaktivität zu einem Zeitpunkt, an dem Pyramidenzellen noch keine funktionellen Synapsen aufweisen (Ben Ari et al., 2004; Tyzio et al., 1999). Dies legt nahe, dass während einer begrenzten Periode in der Entwicklung des Nervensystems elektrische Impulse und Netzwerkaktivität, beides entscheidende Faktoren für die Ausbildung und Festigung bzw. Elimination synaptischer Verbindungen (Katz & Shatz, 1996), durch GABA vermittelt werden.

## **1.2 GABA: Inhibition oder Exzitation?**

Die Wirkung von GABA wird über zwei Klassen von GABA-Rezeptoren vermittelt: metabotrope (GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren) und ionotrope Rezeptoren (GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren). Während in Nagern funktionelle GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren schon in neuronalen Vorläuferzellen beschrieben wurden (LoTurco et al., 1995; Owens et al., 1996), konnten funktionelle GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren erst ab der zweiten postnatalen Woche nachgewiesen werden (Luhmann & Prince, 1991).

GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren aktivieren G-Protein gekoppelte Signaltransduktionswege, die präsynaptisch zu einer Reduktion des Calciumeinstroms führen und postsynaptisch durch die Öffnung von Kalium-Kanälen die Nervenzelle hyperpolarisieren (Bormann, 1988). Durch die Aktivierung von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren werden Neurone somit inhibiert.

Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor gehört zur Familie der liganden-aktivierten Ionenkanäle. Er ist permeabel für Anionen und leitet bevorzugt Chlorid (Cl<sup>-</sup>). Unter physiologischen Bedingungen ist die Leitfähigkeit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors für Bicarbonat-Ionen (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) mit einer relativen Ionenpermeabilität ( $\alpha$ ) von  $\sim 0,2$  nicht zu vernachlässigen (Bormann et al., 1987; Kaila, 1994). Ein Ausstrom negativ geladener Ionen depolarisiert die Nervenzelle, während ein Einstrom sie hyperpolarisiert. In welche Richtung Ionen fließen, wird durch die elektromotorische Kraft bestimmt. Diese resultiert aus dem Konzentrationsgradienten des jeweiligen Ions und dem auf die Ionen wirkenden elektrischen Feld, welches durch das Membranpotential bestimmt wird. Das Umkehrpotential eines Ions gibt an, bei welchem Potential der Ionenstrom seine Richtung ändert. Das Umkehrpotential kann mit Hilfe der Goldman-Gleichung berechnet werden (Goldman, 1943; Hodgkin & Katz, 1949). Für GABAerger Ströme ergibt sich das Umkehrpotential ( $E_{GABA}$ ) entsprechend der Formel (s. auch 3.2.7):

$$E_{GABA} = 60mV \cdot \lg \left( \frac{[Cl^-]_i + \alpha [HCO_3^-]_i}{[Cl^-]_o + \alpha [HCO_3^-]_o} \right).$$

Ist  $E_{GABA}$  positiver als das Ruhemembranpotential (RMP) des Neurons, so strömt Cl<sup>-</sup> aus der Zelle hinaus und bewirkt dadurch eine Membrandepolarisation. Ist  $E_{GABA}$  negativer, fließt Cl<sup>-</sup> in die Zelle herein und bewirkt dadurch eine Membranhyperpolarisation.

$E_{GABA}$  ist während der Entwicklung des Nervensystems nicht konstant. In unreifen Nervenzellen ist  $E_{GABA}$  positiver als das RMP, während es in adulten Nervenzellen negativer ist. Embryonal liegt  $E_{GABA}$  bei Werte um -40 mV.

Zwischen dem postnatalen Tag 0 - 4 reduziert sich  $E_{GABA}$  auf etwa -45 - -50 mV. Nach der zweiten bis dritten postnatalen Woche erreicht  $E_{GABA}$  mit  $\sim -70$  mV die Werte adulter Nervenzellen (Owens et al., 1996). Diese entwicklungsbedingte Verschiebung von  $E_{GABA}$  hin zu hyperpolarisierten Werten kann in einer Vielzahl von Nervenzellen (unter anderem im Hippocampus, Neocortex, Cerebellum und Rückenmark) in verschiedenen Spezies beobachtet werden und stellt ein konserviertes Konzept in der Entwicklung des Nervensystems dar (Ben-Ari, 2002).

Die Veränderung von  $E_{GABA}$  erklärt, warum GABA in adulten Nervenzellen eine Hyperpolarisation und in unreifen eine Depolarisation der Zellmembran bewirkt. GABAerge Hyperpolarisationen der Zellmembran inhibieren Nervenzellen, da die Potentialdifferenz zur Aktionspotentialschwelle größer wird. GABAerge Depolarisationen der Zellmembran sind in vielen Zelltypen exzitatorisch und lösen Aktionspotentiale aus (Owens et al., 1996; Ben-Ari et al., 1989; Chen et al., 1996; Wang et al., 2001). Sie führen aber nicht zwangsläufig zu einer Erregung der Nervenzelle. GABAerge Membrandepolarisationen können Ionenkanäle, die an der Auslösung von Aktionspotentialen beteiligt sind, inaktivieren, wodurch die Aktionspotentialschwelle erhöht wird (Edwards, 1990). Zudem erhöht die Öffnung von  $GABA_A$ -Rezeptoren die Membranleitfähigkeit. Dies vermindert die Effizienz von Reizen, die zeitgleich mit der GABAergen Depolarisation das Neuron erreichen (*shunting inhibition*) (Edwards, 1990). Reize, die stark genug sind, um Aktionspotentiale auszulösen, können also durch GABAerge Membrandepolarisationen abgeschwächt werden (Gao et al., 1998; Jean-Xavier et al., 2007). Während GABAerge Hyperpolarisationen der Membran also immer inhibitorisch wirken, können GABAerge Membrandepolarisationen sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch sein.

### 1.3 Chloridhomöostase

Der Abnahme von  $E_{GABA}$  liegt zugrunde, dass die intrazelluläre Chloridkonzentration ( $[Cl^-]_i$ ) in Nervenzellen während der Entwicklung nicht konstant ist. In unreifen Nervenzellen beträgt sie zwischen 20 - 40 mM, während sie in adulten Neuronen mit  $\sim 7$  mM deutlich niedriger ist (Ben-Ari, 2002). Die  $[Cl^-]_i$  entspricht weder in unreifen noch in adulten Nervenzellen den Werten, die sich bei passiver Verteilung der  $Cl^-$ -Ionen entlang der elektromotorischen Kraft einstellen würden (unter Standardbedingungen  $\sim 13$  mM, Berechnung s. 3.2.6).

In Nervenzellen, wie auch in den meisten anderen Zellen, wird die  $[Cl^-]_i$  durch Transportprozesse reguliert. Dazu stehen der Zelle zwei Klassen von Molekülen zur Verfügung:  $Cl^-$ -Kanäle und  $Cl^-$ -Transporter. Sie werden ubiquitär exprimiert und dienen, neben der Regulation der Erregbarkeit von Nervenzellen, der Aufrechterhaltung des Zellvolumens und des pH-Werts. Sie vermitteln transepithelialen Transport und kontrollieren den Wasserfluss über der Zellmembran (Nilius & Droogmans, 2003).

$Cl^-$ -Kanäle werden aufgrund ihres Öffnungsmechanismus klassifiziert. Man unterscheidet spannungsabhängige (ClC-Familie),  $Ca^{2+}$ -abhängige (CaCC), durch Phosphorylierung aktivierbare (cAMP-activated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) und durch Zellschwellung aktivierbare (volume regulated anion channels, VRAC)  $Cl^-$ -Kanäle. GABA- und Glycin-Rezeptoren bilden die Gruppe der Liganden-aktivierten  $Cl^-$ -Kanäle (Nilius & Droogmans, 2003). Der Teilchenfluss durch diese Kanäle wird über die elektromotorische Kraft der fließenden Ionen angetrieben (Nilius & Droogmans, 2003). Deshalb können  $Cl^-$ -Kanäle keinen Transport gegen den elektrochemischen Gradienten von  $Cl^-$  leisten, sondern lediglich passive Verteilung gewährleisten.

Cl<sup>-</sup>-Transporter hingegen können Cl<sup>-</sup> aktiv, also gegen die elektromotorische Kraft gerichtet, transportieren. Dazu nutzen sie den elektrochemischen Gradienten eines anderen Ions, das sie zusammen mit Cl<sup>-</sup> transportieren. Zwei Gruppen von Cl<sup>-</sup>-Transportern werden unterschieden: Anionenaustauscher (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> gegen Cl<sup>-</sup>) und Kationen-Cl<sup>-</sup>-Transporter. Die [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> wird überwiegend von Kationen-Cl<sup>-</sup>-Transportern kontrolliert (Rivera et al., 2005). Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe, die im zentralen Nervensystem exprimiert werden, sind der K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-Cotransporter in der Isoform 2 (KCC2) und der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-Cotransporters in der Isoform 1 (NKCC1). Sie nutzen für den Cl<sup>-</sup>-Transport den Ionengradienten für K<sup>+</sup> bzw. Na<sup>+</sup>, der durch die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase aufrechterhalten wird (Mercado et al., 2004). Beide Transporter sind elektroneutral und nur aktiv, wenn alle zu transportierenden Ionen auf der *cis*-Seite vorhanden sein. Berechnungen des thermodynamischen Gleichgewichts der Transportprozesse zeigen, dass KCC2 unter physiologischen Bedingungen Cl<sup>-</sup> aus der Zelle hinaus transportiert, während NKCC1 Cl<sup>-</sup> im Zytosol akkumuliert (Russell, 2000). Diese Eigenschaften legen die Vermutung nahe, dass KCC2 und NKCC1 den Verlauf der neuronalen [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> während der Entwicklung des Nervensystems regulieren.

Zahlreiche Untersuchungen bestätigen die Annahme, dass KCC2 die Abnahme der [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> in Neuronen vermittelt und in adulten Nervenzellen die niedrige [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> aufrecht erhält. So zeigen Untersuchungen des KCC2-Expressionsmusters in Gehirnen von Nagern, dass KCC2 zum Zeitpunkt der Geburt nicht, oder nur wenig, exprimiert wird, die Expression aber parallel zur Reifung des Nervensystems und der Abnahme der [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> in den ersten beiden postnatalen Wochen drastisch zunimmt und auch in adulten Nervenzellen hoch ist (Clayton et al., 1998; Li et al., 2002). Darüber hinaus bewirkt eine Reduktion der KCC2-Expression durch *anti-sense* RNA eine Verzögerung der entwicklungstypischen Abnahme der [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> (Rivera et al., 1999). In KCC2 *knock-out* Mäusen bleibt die Abnahme der [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> aus (Balakrishnan et al., 2003; Hubner et al.,

2001). Eine Überexpression von KCC2 mit Hilfe eines *gain of function assays* zu einem Zeitpunkt, an dem der Transporter unter physiologischen Bedingungen noch nicht aktiv ist, führt zu einer vorzeitigen Abnahme der  $[Cl^-]_i$  (Lee et al., 2005). Aus diesen Untersuchungen geht eindeutig hervor, dass der neuronale Auswärtstransport von  $Cl^-$  durch KCC2 vermittelt wird.

Die Rolle von NKCC1 bei der Aufrechterhaltung der  $Cl^-$ -Homöostase ist nicht eindeutig geklärt. Prä- und perinatal ist eine starke Expression von NKCC1 auf RNA- und Proteinebene im Gehirn von Nagern nachweisbar (Plotkin et al., 1997; Clayton et al., 1998; Yamada et al., 2004; Rivera et al., 1999). Untersuchungen über den weiteren Verlauf der NKCC1-Expression während der Reifung des Nervensystems zeigen jedoch heterogene Ergebnisse, die von einer Abnahme der NKCC1-Expression (Plotkin et al., 1997; Yamada et al., 2004), über eine Umverteilung des Proteins innerhalb des Neurons (Marty et al., 2002), bis hin zur Zunahme der Expression (Clayton et al., 1998) reichen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Einwirkung von Bumetanid und die Verwendung  $Na^+$ -freier extrazellulärer Lösungen die  $[Cl^-]_i$  gesenkt wird (Rohrbough & Spitzer, 1996; Kakazu et al., 1999; Ikeda et al., 2003; Yamada et al., 2004). Da NKCC1 unter diesen Bedingungen blockiert ist (Russell, 2000), liegt der Schluss nahe, dass NKCC1 bei der Aufrechterhaltung der hohen  $[Cl^-]_i$  in unreifen Neuronen eine wichtige Funktion übernimmt. Es wurde jedoch gezeigt, dass in Neuronen des auditiven Hirnstamms eine  $Cl^-$ -Akkumulation ohne Beteiligung des NKCC1 stattfindet (Balakrishnan et al., 2003). In Neuronen des Mittelhirns war trotz hoher  $[Cl^-]_i$  keine effektive  $Cl^-$ -Akkumulation nachzuweisen (Titz et al., 2003). Auch Arbeiten, die an NKCC1 *knock-out* Mäusen durchgeführt wurden, zeigten widersprüchliche Ergebnisse. In Neuronen aus Rückenmarksganglien von NKCC1 *knock-out* Mäusen war die  $[Cl^-]_i$  drastisch reduziert (Sung et al., 2000), während sie im olfaktorischen Epithelium kaum beeinträchtigt war (Nickell et al., 2006). Deshalb werden neben der NKCC1 vermittelten  $Cl^-$ -Akkumulation weitere Mechanismen

diskutiert. Ein Modell beschreibt die NKCC1-unabhängige Cl<sup>-</sup>-Akkumulation durch den Anionenaustauscher AE3 (Balakrishnan et al., 2003). Alternativ dazu ist auch ein Cl<sup>-</sup>-Einstrom durch Cl<sup>-</sup>-Kanäle, getrieben durch die elektromotorische Kraft in Phasen einer Depolarisation der Zellmembran, denkbar (Titz et al., 2003).

#### 1.4 Cajal-Retzius-Zellen

Cajal-Retzius (CR) Zellen, benannt nach ihren Erstbeschreibern Ramón y Cajal (1891) und Gustav Retzius (1893), sind unter den ersten Neuronen, die während der Entwicklung des zerebralen Kortex gebildet werden (Valverde et al., 1995). Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Ausbildung der kortikalen Zellschichtung des Neokortex (Frotscher, 1998; Luhmann et al., 1999). CR Zellen werden in Mäusen am Embryonaltag (E) 10,5 an den Rändern des Palliums gebildet und gelangen durch tangentielle Migration in den sich entwickelnden zerebralen Kortex (Bielle et al., 2005; Hevner et al., 2003). Sie sind in der Präplatte lokalisiert, der ersten Schicht postmitotischer Zellen des zerebralen Kortex. Die Präplatte besteht aus überwiegend transienten Zellpopulationen, die neben CR Zellen viele andere Zelltypen, darunter Subplattenzellen, umfassen (Bystron et al., 2008). Die Präplatte wird durch die kortikale Platte (s. u.) in zwei Zellschichten geteilt: die Marginalzone und die Subplatte. CR Zellen sind der wichtigste Zelltyp der Marginalzone, die später die zellarme erste Schicht des Neokortex, die *lamina molecularis*, bildet. Ab der zweiten postnatalen Woche sind CR Zellen in Nagern nicht mehr nachweisbar. Es wird diskutiert, dass CR Zellen in andere Zelltypen differenzieren (Parnavelas & Edmunds, 1983) oder die CR Zelldichte durch das rasche Wachstum des Kortex so stark verringert wird, dass sie unter der Nachweisgrenze liegt (Marin-Padilla, 1998). Durchgesetzt hat sich die

Meinung, dass die meisten CR Zellen durch Apoptose eliminiert werden (Soriano & Del Rio, 2005). Es wird geschätzt, dass etwa 95 % aller CR Zellen in Nagern schon nach der ersten postnatalen Woche absterben (Del Rio *et al.*, 1995; Derer & Derer, 1990). Auch in Primaten und Menschen wird die Zelltodrate von CR Zellen ähnlich hoch geschätzt. CR Zellen sind aber in Primaten und Menschen während des gesamten Lebens in der *lamina molecularis* nachweisbar (Zecevic & Rakic, 2001; Martin *et al.*, 1999).

CR Zellen zeigen je nach Spezies eine stark variierende Morphologie. In Nagern zeichnen sie sich durch ein ovoides Soma, einen dicken kegelförmigen Dendriten und ein weit verzweigtes Axon aus (Zhou & Hablitz, 1996; Hestrin & Armstrong, 1996). CR Zellen sind horizontal orientiert und die Axonkollateralen erstrecken sich mit bis zu 2 mm Länge über ein großes Areal, vorwiegend innerhalb der Marginalzone, aber auch in tieferen Zellschichten (Radnikow *et al.*, 2002).

CR Zellen sezernieren das extrazelluläre Matrixprotein Reelin, das die Schichtbildung im Neokortex reguliert. Während der kortikalen Entwicklung stellen CR Zellen die größte Quelle für Reelin dar (D'Arcangelo *et al.*, 1995; D'Arcangelo *et al.*, 1997; Soriano & Del Rio, 2005). Die charakteristische Zellschichtung des Neocortex entsteht durch Neurone, die sukzessive vom Ort ihrer Genese, der Ventrikularzone, radial in die Präplatte migrieren und dort die kortikale Platte bilden. Die Migration der Neurone endet erst, sobald sie die Reelin-haltige Marginalzone erreichen. Jüngere Zellen migrieren durch bereits bestehende Schichten und bilden die äußeren Zellschichten, während die tieferen Zellschichten aus älteren Zellen bestehen. Dadurch entsteht die charakteristische *inside first, outside last* Strukturierung des Neokortex (Frotscher, 1998; Marin-Padilla, 1998). Die genaue Funktion von Reelin bei der Regulation der kortikalen Schichtbildung ist unklar. Das Fehlen von Reelin führt zu abnormer Migration und Positionierung der Zellen, so dass sich die

*inside first, outside last* Strukturierung des Neokortex nicht ausbildet (Soriano & Del Rio, 2005; Caviness, Jr., 1982; Super *et al.*, 2000). Es wurde postuliert, dass Reelin als Stop-Signal der Migration fungiert (Frotscher, 1997), da migrierende Neurone sich von der radialen Glia, dem Leitstrang der Migration (Angevine & Sidman, 1961), ablösen und die Migration beenden, sobald sie die Reelin-haltige Marginalzone erreichen (Hartfuss *et al.*, 2003). Zudem treten migrierende Neurone unter physiologischen Bedingungen nicht in die Marginalzone ein, wohl aber nach Verletzung der Marginalzone oder Entfernung von CR Zellen (Gressens, 2000; Herms *et al.*, 2004). Die Hypothese, dass Reelin die Migration stoppt, erklärt aber nicht den Phänotyp von *reeler*-Mäusen, einer natürlich vorkommenden Mutante (Falconer, 1951), die eine Deletion des Reelin-Gens trägt (D'Arcangelo *et al.*, 1995; D'Arcangelo *et al.*, 1997; Hirotsune *et al.*, 1995). In *reeler*-Mäusen verlassen migrierende Neurone zwar die Ventrikularzone, erreichen aber nicht die Marginalzone, sondern akkumulieren in tieferen Zellschichten (Caviness, Jr., 1982). Die Präplatte wird nicht korrekt in Marginalzone und Subplatte gespalten (Rakic & Caviness, Jr., 1995; Caviness, Jr. & Rakic, 1978). Dies deutet darauf hin, dass Reelin als permissives Signal der Migration notwendig ist, damit migrierende Neurone die Marginalzone erreichen können (Soriano & Del Rio, 2005). Dementsprechend wurde gezeigt, dass die Überexpression von Reelin Migration nicht verhindert, sondern Neurone weiterhin die Ventrikularzone verlassen (Magdaleno *et al.*, 2002). Deshalb wird postuliert, dass Reelin konzentrations- und substratabhängig agiert und sowohl die Migration fördern als auch als Stop-Signal der Migration fungieren kann (Soriano & Del Rio, 2005).

Neben CR Zellen enthält die Marginalzone viele GABAerge Neurone, die zusammen mit CR Zellen ein spontan aktives neuronales Netzwerk bilden (Radnikow *et al.*, 2002; Soda *et al.*, 2003; Aguiló *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 1998). CR Zellen erhalten überwiegend GABAerge synaptische Eingänge in

niedriger Frequenz (0,005-1,02 Hz) (Kilb & Luhmann, 2001; Soda *et al.*, 2003). Es konnten aber auch NMDA- und AMPA-Rezeptor vermittelte glutamaterge postsynaptische Potentiale sowie serotonerge Afferenzen nachgewiesen werden (Radnikow *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 1995; Janusonis *et al.*, 2004). CR Zellen exprimieren eine Vielzahl von Neurotransmitterrezeptoren, darunter GABA<sub>A</sub>- und Glyzin-Rezeptoren, sowie NMDA-Rezeptoren (Kilb *et al.*, 2002; Mienville & Pesold, 1999; Radnikow *et al.*, 2002). Synaptische Antworten konnten in CR Zellen durch elektrische Stimulation der Marginalzone und tiefer gelegener Zellschichten ausgelöst werden (Radnikow *et al.*, 2002; Soda *et al.*, 2003; Kirmse & Kirischuk, 2006). Die Zellpopulationen, die auf CR Zellen projizieren sind jedoch nicht bekannt (Radnikow *et al.*, 2002). Beruhend auf immunohistochemischen Untersuchungen wird davon ausgegangen, dass CR Zellen glutamaterg sind (Soriano & Del Rio, 2005; Del Rio *et al.*, 1992; Del Rio *et al.*, 1995; Fonseca *et al.*, 1995; Hevner *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 1998). Die Zielzellen der Projektionen von CR Zellen sind nicht bekannt. Diskutiert werden synaptische Kontakte innerhalb der Marginalzone mit Dendriten von Pyramidenzellen (Derer & Derer, 1990; Marin-Padilla, 1998; Radnikow *et al.*, 2002). Stand der Diskussion ist, dass von CR Zellen ausgehende synaptische Aktivität dazu beiträgt, Dendriten von Pyramidenzellen in der Marginalzone zu verankern, bis letztere ihre endgültigen synaptischen Kontakte mit Ausläufern später ankommender Neurone geknüpft haben (Marin-Padilla, 1998; Radnikow *et al.*, 2002). Aussagen über die Funktion von CR Zellen, die darüber hinausgehen, dass CR Zellen Reelin sezernieren und dadurch die kortikale Schichtbildung kontrollieren, bleiben spekulativ.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit soll mit Hilfe elektrophysiologischer und immunohistochemischer Methoden die Regulation der  $\text{Cl}^-$ -Homöostase in unreifen Neuronen des Neokortex untersucht werden.

Die intrazelluläre  $\text{Cl}^-$  Konzentration ( $[\text{Cl}^-]_i$ ) in unreifen Neuronen differiert je nach Schicht und Alter der Zellen stark (Shimizu-Okabe et al., 2002; Yamada et al., 2004). Für Cajal-Retzius (CR) Zellen konnte gezeigt werden, dass sie bis zum Zeitpunkt ihres Verschwindens eine konstant hohe  $[\text{Cl}^-]_i$  aufweisen und wahrscheinlich die entwicklungsbedingte Reduktion der  $[\text{Cl}^-]_i$  nicht durchlaufen (Mienville, 1998). Bezüglich der  $[\text{Cl}^-]_i$  stellen CR Zellen also eine homogene Zellpopulation dar, die sich besonders zur Untersuchung von  $\text{Cl}^-$ -Akkumulationsprozessen eignet. Die Experimente dieser Arbeit werden deshalb an CR Zellen durchgeführt. Im Mittelpunkt der Untersuchungen steht die Funktion des  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$ -Cotransporters NKCC1 bei der Regulation der  $[\text{Cl}^-]_i$ . Es soll geklärt werden, ob NKCC1-abhängige  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation die Aufrechterhaltung einer hohen  $[\text{Cl}^-]_i$  in unreifen Neuronen bewirken kann. Des Weiteren soll untersucht werden, welche physiologischen Auswirkungen eine hohe  $[\text{Cl}^-]_i$  in unreifen Neuronen hat. Es soll geklärt werden, ob GABAerge Membrandepolarisationen in CR Zellen unter physiologischen Bedingungen exzitatorisch sind und unter welchen Bedingungen sie inhibitorisch wirken können.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Mechanismen der Regulation der  $[\text{Cl}^-]_i$  in unreifen Nervenzellen besser zu verstehen. Da die  $[\text{Cl}^-]_i$  determiniert, ob frühe GABAerge Aktivität exzitatorisch oder inhibitorisch ist, werden die Ergebnisse dieser Arbeit wichtig sein für das Verständnis neuronaler Erregbarkeit während der Entwicklung des zentralen Nervensystems.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Präparation der Hirnschnitte

Für die Präparation der kortikalen Schnittpräparate wurden die Gehirne neugeborener Wistar-Ratten zwischen dem Tag der Geburt und dem dritten postnatalen Tag (P0 bis P3) entnommen. Dazu wurden die Tiere kälteanästhesiert und anschließend dekapitiert. Die Kalotte wurde ausgehend vom *foramen magnum* mit einer Schere sagittal von caudal nach rostral eröffnet. Mit einem Skalpell wurden die Hemisphären entlang der *fissura longitudinalis cerebri* getrennt, mit einem Spatel entnommen und in eiskalte, oxigenierte (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (ACSF, Zusammensetzung s. 3.5) überführt. Das Gewebe wurde während der gesamten Präparation gekühlt, um hypoxische Zellschädigungen zu minimieren. Die Hemisphären wurden mit Hilfe eines Gewebeklebers (Permabond 102, Permabond, Summerset, USA) in einer Petrischale festgeklebt und mit eiskaltem ACSF umspült. Unter dem Binokular wurden die Meningen mit einer Pinzette entfernt. Mit einer Rasierklinge wurden etwa 400 µm dicke, tangentiale Gewebeschnitte verschiedener neokortikaler Regionen manuell gewonnen. Die tangentialen Schnittpräparate wurden mit der Schnittfläche nach unten auf feines Filterpapier (Kodak Lens Paper) aufgezogen und vor Beginn der elektrophysiologischen Experimente für mindestens 1 h in 30°C warmem, oxigenierten ACSF ruhen gelassen.

Die Präparation wurden gemäß des nationalen Gesetzes für den Gebrauch von Tieren in der Forschung und in Übereinstimmung mit der EU-Bestimmung 86/609/EEC durchgeführt und vom Regierungspräsidium als Organentnahme genehmigt. Die Versuchstiere entstammten einer lokalen Zucht.

### 3.2 Elektrophysiologische Messungen

Die *Patch-Clamp*-Technik ist eine Methode, mit deren Hilfe Ströme über der Zellmembran oder Einzelkanalströme gemessen werden können. Im *voltage clamp* Modus (Spannungsklemme) wird ein Potential über der Membran eingestellt (Kommandospannung), und mit Hilfe eines *Patch-clamp*-Verstärkers konstant gehalten. Um das Potential auf einen konstanten Wert "klemmen" zu können, muss jeder Ionenstrom, der durch die Membran fließt, durch einen Gegenstrom kompensiert werden. Der zur Kompensation zugeführte Strom entspricht damit dem Ionenstrom über der Membran mit umgekehrtem Vorzeichen.

Im *current clamp* Modus wird die Spannung gemessen, die aus einer definierten Strominjektion resultiert. So können Ereignisse an der Zellmembran, wie z.B. Aktionspotentiale, untersucht werden, die im *voltage clamp* Modus nicht beobachtet werden können.

#### 3.2.1 *Patch-Clamp* Technik

Der zentrale Bestandteil eines elektrophysiologischen Messstandes ist der *Patch-Clamp*-Verstärker, in diesem Fall ein diskontinuierlicher *voltage/current clamp*-Verstärker (SEC05L, NPI, Tamm, Deutschland), bestehend aus Verstärkerkopf und Verstärker. Der Verstärkerkopf wandelte die Messsignale in Spannung um und verstärkte sie um den Faktor 10. Diese Signale wurden über den Verstärker gefiltert (3 kHz Tiefpassfilter) und nach Verstärkung an ein Oszilloskop (TDS210, Tectronics, Beaverton, USA) und einen AD/DA-Wandler (ITC-16, Heka, Lamprecht, Deutschland) weitergeleitet. Die Steuerung des Verstärkers sowie die Erfassung und Bearbeitung der digitalisierten Messsignale erfolgte über die Software TIDA 4.11 (HEKA). Der

Kontakt zur Zellmembran wurde über die *Patch*-Elektrode hergestellt. Als Elektrode diente eine unter Hitze (Puller: PP830, Narishige, Tokyo, Japan) ausgezogene Glaskapillare (GB 200 – 8P, Science Products, Hofheim, Deutschland) mit einem Öffnungsdurchmesser von etwa 1  $\mu\text{m}$ . Sie wurde mit einer Elektrolytlösung (Zusammensetzung s. 3.5) gefüllt. Die *Patch*-Elektrode wurde in einen Elektrodenhalter eingespannt, dessen chlorierter Silberdraht in die Elektrolytlösung der *Patch*-Elektrode eintauchte und so die elektrische Kontaktierung herstellte. Der Elektrodenhalter wurde am Verstärkerkopf befestigt, der über ferngesteuerte Mikromanipulatoren (SM I, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) an das Hirnschnittpräparat herangeführt werden konnte. Das Hirnschnittpräparat befand sich in einer Messkammer (Volumen  $\sim 2$  ml) und wurde über eine gravitationsbetriebene Perfusion konstant mit 30°C warmer extrazellulärer Flüssigkeit (Durchflussgeschwindigkeit  $\sim 4$  ml/min) umspült. Überschüssige Flüssigkeit wurde über eine Vakuumpumpe abgesaugt. Der Hirnschnitt wurde durch einen U-förmigen Platindraht beschwert, damit er durch den Flüssigkeitsstrom nicht bewegt wurde. Als Gegenelektrode (Badelektrode) diente ein chlorierter Silberdraht, der in das ACSF eintauchte. Die *Patch*-Elektroden wurden so ausgezogen, dass der Widerstand beim Eintauchen der elektrolytgefüllten Elektrode in die extrazelluläre Lösung  $\sim 10$  M $\Omega$  betrug. Nach dem Eintauchen wurde das *Offset*-Potential auf 0 mV gesetzt.

Die Zellidentifikation und die anschließende Annäherung der *Patch*-Elektrode an die zu messende Zelle erfolgten unter optischer Kontrolle. Mittels differentieller Interferenzkontrast (DIC)-Optik im infraroten Spektrum konnte das Schnittpräparat mikroskopisch untersucht werden. Es wurde ein aufrechtes Mikroskop (Axioskop II, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit 40 x Wasserimmersionsobjektiv und einer numerischen Apertur von 0.75 benutzt. Das Mikroskop konnte über ferngesteuerte Schrittmotoren in allen drei Raumachsen bewegt werden (SM I, Luigs & Neumann, Ratingen,

Deutschland). Als Lichtquelle diente eine Xenon Dampflampe (Zeiss). Das so entstandene DIC-Bild des Schnittpräparates wurde über eine infrarot-sensitive Videokamera (C5405, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) und eine Steuereinheit zur Kontrastverstärkung (C2401, Hamamatsu Photonics) auf einen schwarz-weiß Monitor (WV-BM 1410, Hamamatsu Photonics) übertragen. Über eine *frame-grabber* Karte (SM II, Fast, München) konnten DIC-Bilder gespeichert werden.

Um erschütterungsfrei messen zu können, waren Messkammer, Mikroskop und Verstärkerkopf auf einem pneumatisch gedämpften Schwingungstisch (Science Products, Hofheim, Deutschland) montiert, der sich in einem Faraday-Käfig befand, um externe Störsignale abzuschirmen.

Beim Annähern der *Patch*-Elektrode an die zu messende Zelle wurde über eine Vorrichtung am Elektrodenhalter Überdruck angelegt, um zu verhindern, dass die Elektrode beim Eindringen in den Hirnschnitt verstopft und um die Oberfläche der zu messenden Zelle zu reinigen. Während der Annäherung wurde ein repetitiver 10 mV-Spannungspuls angelegt, um den Widerstand zwischen Bad- und *Patch*-Elektrode verfolgen zu können. Die *Patch*-Elektrode wurde nicht auf die Membran aufgesetzt sondern bis auf einen minimalen Abstand (abschätzbar dadurch, dass der Widerstand zwischen Bad- und *Patch*-Elektrode größer und die Zellmembran durch den Überdruck eingedellt wurde) angenähert. Der Kontakt zwischen Elektrode und Membran (*Seal*) wurde durch Anlegen eines konstanten Unterdrucks hergestellt. Nach Ausbildung des Seals betrug der Widerstand zwischen Bad- und *Patch*-Elektrode mehrere Gigaohm (*cell-attached* Konfiguration).

Ein Großteil der Arbeiten wurde in der *whole cell* Konfiguration gemessen. Diese ermöglicht die Messung der Summe aller Ströme, die über die Zellmembran fließen. Die *whole cell* Konfiguration wurde ausgehend von der *cell-attached* Konfiguration erreicht, indem das unter der Elektrodenöffnung

liegende Membranstück durch Unterdruck geöffnet wurde. Beim Öffnen der Zelle wurde eine Kommandospannung von -60 mV angelegt, so dass die Zelle direkt auf ein Potential nahe dem Ruhemembranpotential (RMP) geklemmt wurde. Durch den Kontakt zwischen Elektrodenlösung und Zellinnerem wurde die Zusammensetzung der intrazellulären Flüssigkeit verändert. Die elektrophysiologischen Messungen wurden 2 – 5 min nach Erreichen der *whole cell* Konfiguration gestartet, um sicherzustellen, dass die intrazelluläre Flüssigkeit durch die Elektrodenlösung ersetzt worden war.

### 3.2.2 Gramicidin *perforated patch* Messungen

Die Fragestellungen dieser Arbeit erfordern die Messung der intrazellulären Chloridkonzentration  $[Cl^-]_i$ . Da die intrazelluläre Flüssigkeit in konventionellen *whole cell* Messungen durch die Zusammensetzung der Pipettenlösung bestimmt wird, ist diese Methode zur Bestimmung der  $[Cl^-]_i$  nicht geeignet. Ein Teil der elektrophysiologischen Experimente wurde deshalb in der *perforated patch* Konfiguration durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Zelle nicht mechanisch geöffnet. Die elektrische Verbindung zwischen Intrazellulärraum und *Patch*-Elektrode wird über Ionenkanäle hergestellt. Dazu wird der Pipettenlösung ein Protein zugesetzt, das sich in die Plasmamembran einbaut und Kanäle bildet, die für bestimmte Ionen permeabel sind. In dieser Arbeit wurde das Protein Gramicidin verwendet, ein Antibiotikum mit selektiver Permeabilität für Kationen. Da der Ionenfluss demnach nur über Kationen erfolgt, wird die  $[Cl^-]_i$  durch diese Messmethode nicht direkt beeinflusst (Kyrozis & Reichling, 1995).

Kurz vor Beginn des Experiments wurden der Pipettenlösung 10 -13  $\mu\text{g} / \text{ml}$  Gramicidin (Sigma) zugesetzt (Stocklösung: 1 mg / ml DMSO). Nach Erreichen der *cell-attached* Konfiguration wurde der Perforationsvorgang über

die Abnahme des Serienwiderstandes verfolgt. Der eigentliche Messvorgang wurde gestartet, nachdem die Ableitbedingungen stabil waren (Eingangswiderstand, Membranpotential und Aktionspotentialschwelle konstant). Dies dauerte 20 – 40 min.

### 3.2.3 Das *liquid junction Potential*

Aufgrund der unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten verschiedener Ionen (in diesem Fall Cl<sup>-</sup> und Glukonat) bildet sich beim Eintauchen der *Patch*-Elektrode in die Badlösung eine Potentialdifferenz, das *liquid junction Potential* (LJP) (Neher, 1992; Barry & Lynch, 1991). Da nach dem Eintauchen der Elektrode das *Offset*-Potential auf 0 mV gesetzt wurde, entstand bei allen Messungen ein Fehler in Größe des LJP. Deshalb wurde das LJP für alle verwendeten Pipettenlösungen mit Hilfe einer Agar-Brücke gemessen (LJP-Daten: s. 3.8). In *voltage clamp* Messungen wurde die Kommandospannung um das LJP erhöht (Haltepotential + LJP), so dass eine nachträgliche Korrektur der Messdaten nicht nötig war. Im *current clamp* Modus gemessene Potentiale wurden nachträglich um das LJP korrigiert (Messwert - LJP).

### 3.2.4 Zellcharakterisierung

Die Zellen wurden anhand ihrer passiven und aktiven Membraneigenschaften charakterisiert. Direkt nach Erreichen der *whole cell* Konfiguration bzw. nach der Erreichen stabiler Ableitbedingungen in der *perforated patch* Konfiguration wurde das RMP gemessen. Danach wurde im *current clamp* Modus das Membranpotential auf -60 mV eingestellt und die Zelle durch kleine Ströme hyperpolarisiert (-20 pA, 300 ms), ohne dass eine Kanalöffnung

erfolgte. Aus der resultierenden *steady state* Spannung wurde mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes der Eingangswiderstand ( $R_{in}$ ) der Zelle berechnet. Die initiale Spannungsänderung wurde durch eine monoexponentielle Funktion angenähert, um die Membranzeitkonstante  $\tau$  zu bestimmen. Über  $\tau$  wurde die Zellkapazität ( $C$ ) berechnet ( $\tau = R_{in} \cdot C$ ), die als Maß für die Oberfläche der Zelle (Barrett & Crill, 1974) als Normierungsgröße diente.

Die aktiven Membraneigenschaften wurden ebenfalls im *current clamp* Modus untersucht. Depolarisierende Ströme aufsteigender Stärke wurden injiziert, um Aktionspotentiale auszulösen und ihre charakteristischen Merkmale wie Aktionspotentialschwelle, Amplitude, Dauer (Abstand zwischen den Halbmaximalwerten) und Frequenz zu bestimmen. Durch hyperpolarisierende Strominjektion wurde getestet, ob ein  $I_H$ -Strom auszulösen war.

### 3.2.5 Berechnung des Ruhemembranpotentials

Das gemessene RMP wurde um das jeweilige LJP korrigiert. Dieser Wert unterschätzt das tatsächliche RMP, da durch Leckströme ein Teil der Spannung zwischen Zellmembran und Pipette abfällt und durch den Verstärker nicht registriert wird (Tyzio et al., 2003; Fricker et al., 1999). Deshalb wurden das RMP zusätzlich zur LJP-Korrektur nach der von Tyzio et al. (Tyzio et al., 2003) vorgeschlagenen Formel berechnet:

$$E_m' = E_m^0 \frac{R_{seal} - R_{in}}{R_{seal}} + LJP \frac{R_{in}}{R_{seal}}$$

Dabei ist  $E'_m$  das gemessene und ums LJP korrigierte RMP.  $E_m^0$  entspricht dem tatsächlichen RMP.  $R_{seal}$  steht für den Sealwiderstand und  $R_{in}$  für den Eingangswiderstand der Zelle.  $R_{seal}$  konnte in *perforated patch* Messungen durch die beginnende Perforation nicht zuverlässig gemessen werden. Deshalb wurde der *Seal*-Vorgang in 5 Zellen ohne Gramacidin durchgeführt und nach 20 - 30 min ein durchschnittlicher Wert für  $R_{seal}$  ( $8,7 \pm 2,9 \text{ G}\Omega$ ) bestimmt, der zur Berechnung des RMP in *perforated patch* Messungen benutzt wurde.

### 3.2.6 Bestimmung der intrazellulären Chloridkonzentration

Die  $[Cl^-]_i$  wurde aus dem Umkehrpotential GABAerger Ströme berechnet. Um diese auszulösen, wurde GABA (1 mM in ACSF) mittels eines Druckapplikationssystem (PDES 02T, NPI) fokal appliziert. Über ferngesteuerte Mikromanipulatoren wurde die Applikationspipette (Öffnungsdurchmesser  $\sim 1-1,5 \mu\text{m}$ ) etwa  $25 \mu\text{m}$  oberhalb der zu messenden Zelle positioniert. GABA wurde bei unterschiedlichen Haltepotentialen ( $V_{hold}$ ) für 1 – 3 ms appliziert und der resultierende Maximalstrom ( $I_{GABA}$ ) gemessen. Ein initialer GABA-Puls, der nicht in die Bestimmung von  $E_{GABA}$  einging, wurde bei -60 mV appliziert und diente dazu, eine konstante GABA-Konzentration in der Spitze der Applikationspipette sicherzustellen und eine Beeinflussung der Messung durch Rezeptordesensitivierung zu minimieren.  $E_{GABA}$  wurde schließlich aus der Auftragung von  $I_{GABA}$  gegen  $V_{hold}$  als Nullstelle der Regressionsgeraden bestimmt. Die  $[Cl^-]_i$  wurde anschließend aus der Goldman-Gleichung berechnet:

$$E_{GABA} = -\frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[Cl^-]_i + \alpha [HCO_3^-]_i}{[Cl^-]_o + \alpha [HCO_3^-]_o} \right)$$

In dieser Gleichung ist R die ideale Gaskonstante, F die Faraday-Konstante und z die Ladungszahl der Ionen (hier -1). Die Temperatur (T) betrug 303 K. Es wurde eine relative Bicarbonat-Leitfähigkeit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors ( $\alpha$ ) von 0,2 angenommen (Bormann et al., 1987). Die  $[Cl^-]_o$  betrug 134,5 mM und die  $[HCO_3^-]$  wurde sowohl innerhalb der Zelle als auch in der Badlösung mit 26 mM angenommen.

Mit Hilfe der Nernst-Gleichung wurde die  $[Cl^-]_i$  berechnet, die sich bei passiver  $Cl^-$ -Verteilung ergibt.

$$E_{Cl^-} = E_{hold} = -\frac{RT}{zF} \ln\left(\frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_o}\right) \approx -60mV \cdot \lg\left(\frac{[Cl^-]_o}{[Cl^-]_i}\right)$$

Unter den gegebenen Bedingungen ( $E_{Cl^-}=E_{hold}=-60$  mV,  $[Cl^-]_o=134$  mM) beträgt die passive  $[Cl^-]_i$  13,4 mM. Nach der Goldman-Gleichung ergibt sich demnach bei passiver  $Cl^-$ -Verteilung ein  $E_{GABA}$  von -52,4 mV.

### 3.3 Histologie

Die Färbung von CR Zellen erfolgte in tangentialen Schnittpräparaten des Neokortex. Die Schnitte wurden nach abgeschlossener elektrophysiologischer Messung oder direkt nach der Präparation fixiert. Dazu wurden sie für ~ 24 h in Paraformaldehyd-haltigen (4 %) 0,1 M Phosphat Puffer (PBS, pH = 7.4) überführt. Danach wurden die Schnitte in 0,01 M PBS mindestens 3 x gewaschen und bis zur weiteren Färbung bei 8°C in PBS gelagert.

Alle folgenden Schritte wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Waschschrirte erfolgten mit 0,01 M PBS.

### 3.3.1 Biocytinfärbungen

Um nach der Durchführung der elektrophysiologischen Messungen eine morphologische Zellidentifizierung zu ermöglichen, enthielt die Pipettenlösung Biocytin (0,3 - 0,5 %; Sigma, Taufkirchen, Deutschland). In der *Whole-Cell*-Konfiguration diffundierte Biocytin in das Zytoplasma der Zelle und gelangte durch aktiven Transport in Dendriten und Axone. Nach Fixierung wurden die Schnitte in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-haltigem (0,5 %) PBS inkubiert, um endogene Peroxidasen zu sättigen. Anschließend erfolgte über Nacht die Reaktion mit einem Peroxidase-konjugierten Avidin-Komplex (ABC kit, Vectorlabs, Burlingame, CA). Nach mehrmaligem (3 – 5 Mal) Waschen mit PBS und TRIS wurden die Schnitte für 30 min in 20 %iger 3,3-Diaminobenzidin-Lösung (DAB, Sigma) und 10 min in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-haltiger DAB (0,03 %) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TRIS wurde die Färbung durch 0,5 % CuSO<sub>4</sub>\*5 H<sub>2</sub>O (in TRIS für 5 min) intensiviert. Abschließend wurden die Schnitte nochmals mit TRIS gewaschen, durch eine Ethanolreihe dehydratisiert und auf Objektträger gezogen.

Alternativ wurden die fixierten Schnitte mit einem Cy3 oder Alexa 488 gekoppelten Streptavidin gefärbt. Dazu wurden die Schnitte mit 0,8 % Triton, 5 % Rindernormalserum (Dianova) und 0,05 % Azid in 0,01 M PBS für 90 min geblockt und permeabilisiert. Anschließend erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit Streptavidin-Cy3 (1:400, Dianova) oder Streptavidin Alexa Fluor 488 (1:800, Invitrogen) in 3 % Rinderserumalbumin (mit 0,05 % Azid) im Dunkeln. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Schnitte in Fluoromount eingebettet.

### 3.3.2 Immunohistochemische Färbungen

An einigen Schnitten wurde eine Doppelfärbung mit Streptavidin Alexa 488 und einem Antikörper gegen Reelin durchgeführt, um zu zeigen, dass die gemessenen Zellen tatsächlich CR-Zellen sind. Dazu wurden die Schnitte mit 0,08 % Triton, 3 % Rindernormalserum (Dianova), 4 % Ziegennormalserum (Dianova) in 0,01 M PBS für 90 min permeabilisiert und geblockt. Anschließend wurden sie über Nacht mit dem Reelin-Antikörper (Maus, Anti-Reelin SP 142, Chemikon, Verdünnung: 1:400 mit 2 % RSA und 0,1 % Triton) inkubiert. Nach dem Waschen wurde der Zweitantikörper (Ziege, Anti-mouse Alexa rot 568, Molecular Probes, Verdünnung 1: 400) für 2 h im Dunkeln aufgebracht. Nach Waschen wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 1 h mit Streptavidin-Alexa 488 (Molecular Probes, Verdünnung 1:800) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Schnitte in Fluoromount eingebettet.

Um zu zeigen, dass NKCC1 in CR Zellen exprimiert wird, wurden in tangentialen Schnittpräparaten Doppelfärbungen mit Reelin- und NKCC1-Antikörpern durchgeführt. Die fixierten Schnitte wurden für 2 h mit 4 % Ziegennormalserum, 3 % Rindernormalserum, 0,3 % Triton und 0,05 % Azid in PBS 0,01 M geblockt und permeabilisiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Reelin-Antikörper (s.o.). Nach Waschen wurden für 2 h Anti-Maus Fab-Fragmente (Ziege, Anti-Mouse Cy<sup>TM</sup>2-conjugated AffiniPure Fab Fragment, Dianova, Verdünnung 1:100) im Dunkeln aufgebracht und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd für 3,5 min fixiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die NKCC1-Färbung durch eine Inkubation mit dem NKCC1-Antikörper (Maus, Anti-NKCC1-T4, Hybridoma-Bank) für 48 h bei 4°C. Nach Waschen wurde der Zweitantikörper (Ziege, Anti-Maus Alexa rot 568, Molecular Probes, Verdünnung: 1:400) für 2 h aufgebracht. Nach Waschen erfolgte das Einbetten mit Fluoromount.

Die Fluoreszenz-gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops untersucht. Es bestand aus einem konfokalen *Nipkow spinning disk* System (Visitech, Sunderland, UK), das an einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX51 WI; Olympus Optical, Tokyo, Japan) angebracht war. Das Mikroskop war ausgestattet mit Wasserimmersionsobjektiven und einer gekühlten CCD Kamera (CoolSnap HQ; Roper Scientific, Ottobrunn, Germany), die über MetaMorph Software (Universal Imaging, West Chester, PA) gesteuert wurde. Grüne und rote Fluoreszenz wurde mit Hilfe der 488 und 568 nm Linie eines Kr/Ar Lasers (Laser Physics, Malpas, UK) angeregt.

### **3.4 Statistische Auswertung**

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe nicht-parametrischer Tests. Für gepaarte Daten wurde der sign-test und für ungepaarte Daten der Kolgomorov-Smirnov Test durchgeführt (Systat11, Systat, Point Richmond, USA). Das Signifikanzniveau betrug 5 % ( $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)).

### 3.5 Zusammensetzung der Lösungen

In fast allen Experimenten wurde ACSF (artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit) als extrazelluläre Lösung benutzt. Auch die Präparation der tangentialen Hirschnitte erfolgte in dieser Lösung. ACSF enthielt:

NaCl	126 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>5</sub>	1,25 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
KCl	2,5 mM
NaHCO <sub>3</sub>	26 mM

Der Lösung wurde 20 mM Glucose zugesetzt. Nach Oxigenierung mit 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> betrug der pH-Wert 7,4. Die Osmolarität der extrazellulären Lösung lag bei 336 mOsm.

Für Experimente, die in Na<sup>+</sup>-freier extrazellulärer Flüssigkeit durchgeführt wurden, wurde 0 Na<sup>+</sup>-ACSF verwendet. Es enthielt:

Tris-HCl	127,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>5</sub>	1,25 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
KCl	1,25 mM
Choline-HCO <sub>3</sub>	26 mM

Dieser Lösung wurden ebenfalls 20 mM Glucose zugesetzt. Nach Oxigenierung betrug der pH-Wert 7,4. Die Osmolarität wurde mit Sucrose auf 336 mOsm eingestellt.

Für *perforated patch* Messungen wurden zwei unterschiedliche Pipettenlösungen verwendet:

<i>niedrig Cl<sup>-</sup></i> :	K-Gluconat	130 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1 mM
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
	EGTA	11 mM
	HEPES	10 mM

Das LJP dieser Lösung betrug 9 mV.

<i>hoch Cl<sup>-</sup></i> :	KCl	130 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1 mM
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
	EGTA	11 mM
	HEPES	10 mM

Das LJP dieser Lösung war 3 mV. Der pH-Wert beider Pipettenlösungen wurde mit KOH auf 7,4 und die Osmolarität mit Sucrose auf 306 mOsm eingestellt.

*Whole cell* Messungen wurden mit folgenden intrazellulären Lösungen durchgeführt:

CaCl <sub>2</sub>	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
EGTA	11 mM
HEPES	10 mM
Na <sub>2</sub> -ATP	2 mM
Na-GTP	0,5 mM

Die Pipettenlösung enthielt außerdem je nach benötigter  $[\text{Cl}^-]$  unterschiedliche Mengen an KCl und K-Gluconat. Dabei galt:  $[\text{KCl}] + [\text{K-Gluconat}] = 130 \text{ mM}$ .

Der pH-Wert aller Pipettenlösungen wurde mit KOH auf 7,4 und die Osmolarität mit Sucrose auf 306 mOsm eingestellt. Je nach  $[\text{Cl}^-]$  ergaben sich verschieden LJP:

10 mM $\text{Cl}^-$	9 mV
15 mM $\text{Cl}^-$	8,5 mV
20 mM $\text{Cl}^-$	8 mV
30 mM $\text{Cl}^-$	6 mV
50 mM $\text{Cl}^-$	6 mV

Folgende Stammlösungen wurden für die Experimente eingesetzt:

- 1 mg/ml Gramicidin in DMSO
- 1 M GABA in aqua dest
- 50 mM Bumetanid in DMSO
- 125 mM 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbendisulfonsäure in DMSO
- 1 mM 9-Anthracencarbonsäure in DMSO
- 30 mM Strychnine in DMSO
- 10 mM Gabazin in DMSO
- 1 mM TTX in Citrat-Puffer

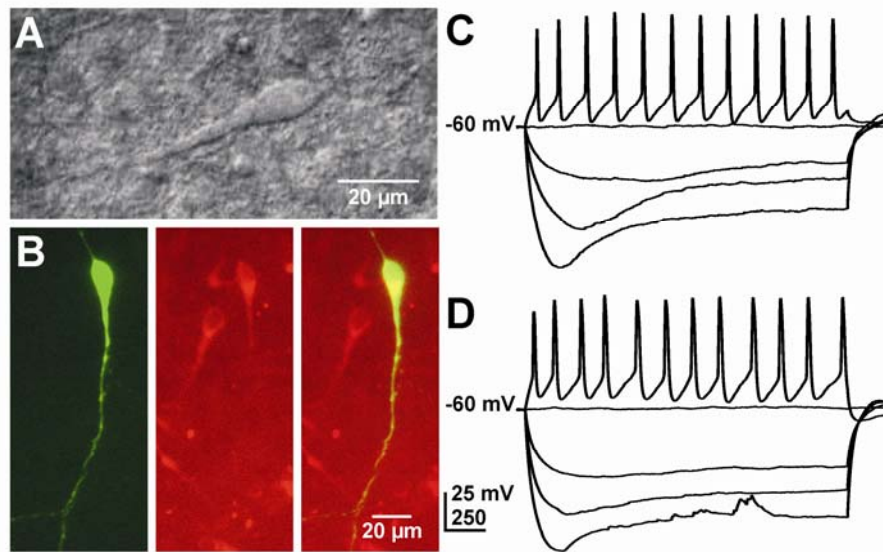
Die Applikation von Pharmaka erfolgte über die Perfusionsanlage. Die endgültige DMSO-Konzentration in der Badlösung war dabei immer kleiner als 0,3 %, so dass eine Beeinflussung der Messungen durch dieses Lösungsmittel auszuschließen ist.

Alle Substanzen außer TTX (Tocris Cookson, Ballwin, MO) wurden von Sigma bezogen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Identifikation von Cajal-Retzius Zellen

Die vorliegenden Arbeiten wurden an Cajal-Retzius (CR) Zellen in  $\sim 400 \mu\text{m}$  dicken tangentialen Schnittpräparaten des Neocortex postnataler (P0 bis P3) Ratten durchgeführt. CR Zellen wurden anhand ihrer typischen Morphologie (Hestrin & Armstrong, 1996; Zhou & Hablitz, 1996) mittels DIC-Videomikroskopie identifiziert. Messungen wurden ausschließlich an Zellen durchgeführt, die ein ovoides Soma und einen dicken, kegelförmigen Dendriten aufwiesen. Axon und Dendrit mussten an gegenüberliegenden Polen des Somas entspringen (Abb. 4.1 A). Die intrazelluläre Pipettenlösung enthielt Biocytin, so dass nach dem Experiment die Morphologie der abgeleiteten Zelle durch eine spezifische Färbung im Detail analysiert werden konnte. Alle biocytinmarkierten Zellen zeigten die typischen morphologischen Charakteristika von CR Zellen. Zudem konnte in diesen Präparaten gezeigt werden, dass alle gefärbten Zellen ein horizontal verlaufendes, weit verzweigtes Axon aufwiesen. Dies ist ebenfalls typisch für CR Zellen (Zhou & Hablitz, 1996; Kilb & Luhmann, 2001). An 16 Zellen wurde zusätzlich eine Doppelfärbung mit Biocytin und einem Antikörper gegen Reelin, einem Markerprotein von CR Zellen (D'Arcangelo et al., 1995), durchgeführt. Alle untersuchten Zellen waren Reelin-positiv und somit eindeutig CR Zellen (Abb. 4.1 B). Neben der typischen Morphologie wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften von CR Zellen als zusätzliches Auswahlkriterium herangezogen. CR Zellen zeigten nach Depolarisation lang andauernde Aktionspotentiale (Luhmann et al., 2000) und nach Hyperpolarisation einen ausgeprägten  $I_H$ -Strom (Kilb & Luhmann, 2000).



**Abb. 4.1: Identifikation von CR Zellen.**

**A** DIC-Videomikroskopische Aufnahme einer CR Zelle in einem kortikalen Tangentialschnitt (P1). **B** Biocytin- (links) und Reelin- (mitte) Doppelfärbung eines kortikalen Tangentialschnittes (P0). Während der Messung diffundierte Biocytin aus der *Patch*-Pipette in die abgeleitete Zelle. Die immunohistochemische Doppelfärbung wurde im Anschluss an das Experiment durchgeführt. Die Überlagerung der Aufnahmen zeigte, dass die gemessene Zelle Reelin-positiv und somit eine CR Zelle war (rechts). **C** Elektrophysiologische Eigenschaften einer unter *perforated patch* Bedingungen abgeleiteten CR Zelle: Depolarisierende Strominjektion löste breite, repetitive Aktionspotentiale aus, während Hyperpolarisation einen deutlichen Spannungsabfall induzierte. **D** Elektrophysiologische Eigenschaften der in **B** gezeigten CR Zelle, gemessen in der *whole cell* Konfiguration. *Perforated patch* und *whole cell* Messungen unterschieden sich kaum.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit Experimente an 163 CR-Zellen in der *perforated patch* oder *whole cell* Konfiguration durchgeführt. In *perforated patch* Messungen zeigten CR Zellen ein Ruhemembranpotential (RMP) von  $-80,3 \pm 2,1$  mV ( $n=69$ ) (Berechnung s. 3.2.6) gemessen. Der Eingangswiderstand ( $R_{input}$ ) betrug  $1,6 \pm 0,1$  G $\Omega$ . Die meisten CR Zellen (55 von 69 Zellen) zeigten nach Depolarisation repetitive Aktionspotentiale, die eine durchschnittliche Amplitude von  $35,1 \pm 1,2$  mV und eine Dauer von  $8 \pm 0,4$  ms aufwiesen. Die Aktionspotentialschwelle lag bei  $-38,0 \pm 0,5$  mV (Abb. 4.1 C). Messungen in der *whole cell* Konfiguration ergaben ein RMP von  $-76,5 \pm 2,0$  mV und einen  $R_{input}$  von  $1,2 \pm 0,06$  G $\Omega$  ( $n=94$ ). Strominjektion

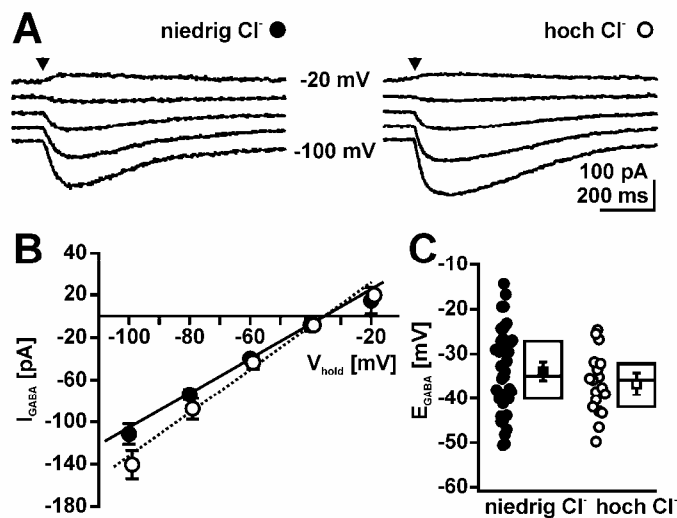
fürte auch hier zu repetitiven Aktionspotentialen (in 91 von 94 Zellen) mit einer durchschnittlichen Amplitude von  $46,0 \pm 0,9$  mV und einer Dauer von  $9,0 \pm 0,4$  ms. Die Aktionspotentialschwelle betrug  $-38,1 \pm 0,4$  mV (Abb. 4.1 D). Eine Hyperpolarisation der Zelle führte sowohl in der *perforated patch* als auch in der *whole cell* Konfiguration zu einem deutlichen Spannungsabfall (Abb. 4.1 C, D), der auf die Aktivierung eines H-Stroms hinweist. Die elektrophysiologischen Charakteristika von CR Zellen waren relativ unabhängig von der Ableitmethode. Dies zeigt, dass es keine offensichtlichen Qualitätsunterschiede zwischen den Ableitungen unter *perforated patch* und *whole cell* Bedingungen gibt.

#### 4.2 Validierung der Methode zur Bestimmung von $[Cl^-]_i$

Die Experimente dieser Arbeit beruhen überwiegend auf der Bestimmung der  $[Cl^-]_i$  aus dem Umkehrpotential GABAerger Ströme ( $E_{GABA}$ ).  $E_{GABA}$  wurde bestimmt, indem in *perforated patch* Messung kurze GABA Pulse bei verschiedenen Haltepotentialen appliziert wurden und der Maximalstrom in Abhängigkeit vom Haltepotential ermittelt wurde. Mit Hilfe der Nernst-Gleichung wurde über  $E_{GABA}$  die  $[Cl^-]_i$  berechnet (s. 3.2.6).

Da nicht auszuschließen ist, dass bei dieser Messmethode die  $[Cl^-]_i$  durch langsam in die Zelle diffundierendes  $Cl^-$  beeinflusst wird, wurde  $E_{GABA}$  sowohl mit einer 6 mM  $Cl^-$  (*niedrig  $Cl^-$* ) als auch mit einer 134 mM  $Cl^-$  (*hoch  $Cl^-$* ) enthaltenden Pipettenlösung bestimmt (Abb. 4.2 A). Mit *niedrig  $Cl^-$*  Lösung betrug  $E_{GABA}$   $-32,8 \pm 1,3$  mV ( $n=43$ ) und mit *hoch  $Cl^-$*  Lösung  $-36,0 \pm 1,6$  mV ( $n=18$ ) (Abb. 4.2 B, C). Die Umkehrpotentiale unterschieden sich nicht signifikant ( $p=0,097$ ) und waren somit unabhängig von der  $[Cl^-]$  der Pipettenlösung.

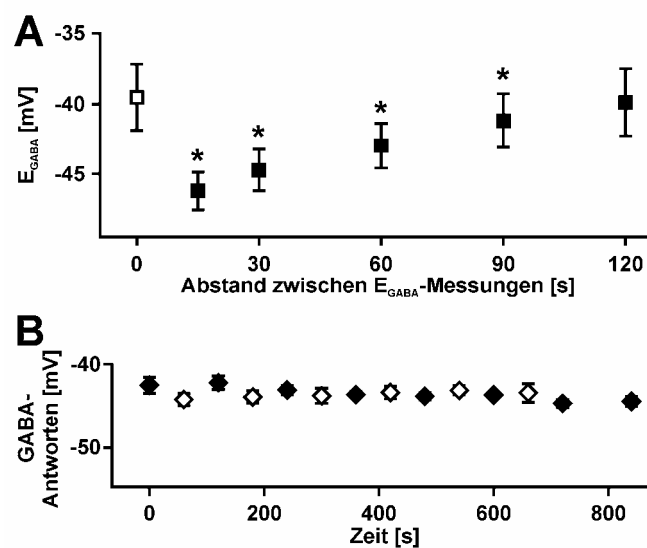
Die Genauigkeit der Messung von  $E_{\text{GABA}}$  wurde in *whole cell* Experimenten, also bei einer bekannten  $[\text{Cl}^-]_i$  abgeschätzt. Hierzu wurde  $E_{\text{GABA}}$  in derselben Zelle 3 - 4 Mal bestimmt. Die Ergebnisse waren auf  $\pm 1,7$  mV ( $n=39$ ) reproduzierbar. Dies ermöglicht bei Umkehrpotentialen zwischen -35 und -40 mV eine Berechnung der  $[\text{Cl}^-]_i$  mit einem Fehler von  $\sim \pm 2,5$  mM.



**Abb. 4.2: Validierung der Bestimmung von  $E_{\text{GABA}}$**

**A** Typische GABA-induzierte Ströme einer CR Zelle (P1), gemessen in der *perforated patch* Konfiguration zur Bestimmung der Strom-Spannungs-Kennlinie (IV) GABAerger Ströme. Unterschiedliche Pipettenlösungen wurden verwendet, die entweder 6 mM Cl (*niedrig Cl*, links) oder 136 mM Cl (*hoch Cl*, rechts) enthielten. GABAerge Ströme wurden bei verschiedenen Haltepotentialen ( $V_{\text{hold}}$ , -100 bis -20 mV, 20 mV Schritten) durch fokale GABA-Applikation (1 mM, Pfeil) ausgelöst. **B** IV GABAerger Ströme ( $I_{\text{GABA}}$ ), gemessen mit *niedrig Cl* (gefüllte Kreise) und *hoch Cl* (offene Kreise) unter *perforated patch* Bedingungen.  $E_{\text{GABA}}$  wurde als Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse ermittelt. **C** Darstellung aller mit *niedrig Cl* (gefüllte Kreise) bzw. *hoch Cl* (offene Kreise) bestimmten Werte von  $E_{\text{GABA}}$ . Statistische Tests zeigten, dass  $E_{\text{GABA}}$  nicht von der verwendeten Pipettenlösung abhängt. Der Box-Plot stellt den Median sowie das untere und obere Quartil dar. Alle Datenpunkte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.

In den vorliegenden Studien wurde  $E_{\text{GABA}}$  über längere Zeit verfolgt. Jede Applikation von GABA induziert  $\text{Cl}^-$ -Ströme und beeinflusst somit die  $[\text{Cl}^-]_i$ . Deshalb wurde untersucht, mit welcher Frequenz  $E_{\text{GABA}}$  gemessen werden kann, ohne dass das Umkehrpotential durch den Messvorgang verändert wird.  $E_{\text{GABA}}$  wurde in Zeitintervallen von 15, 30, 60, 90 und 120 s bestimmt. Bei Zeitintervallen kleiner als 120 s, wurde  $E_{\text{GABA}}$  durch den Messvorgang signifikant verringert ( $p=0,04$ ,  $n=6$ , Abb. 4.3 A). In Langzeitmessungen wurde  $E_{\text{GABA}}$  deshalb alle 120 s bestimmt. Darüber hinaus wurde der Einfluss einzelner GABA-Pulse auf das Umkehrpotential getestet, indem vor der Messung von  $E_{\text{GABA}}$  eine aufsteigende Anzahl von GABA Pulsen bei -100 mV appliziert wurde. Schon zwei zusätzliche Pulse veränderten das Umkehrpotential um  $-2,4 \pm 0,3$  mV ( $n=6$ ). Deshalb wurde die Anzahl der applizierten GABA Pulse und deren Dauer minimiert: 1 mM GABA wurde bei



#### Abb.4.3 Langzeitmessungen GABAerger Antworten

**A** Einfluss wiederholter  $E_{\text{GABA}}$ -Messungen auf  $E_{\text{GABA}}$ .  $E_{\text{GABA}}$  wurde repetitiv nach dem in Abb. 4.2A gezeigten Protokoll in Abständen von 15 bis 120 s bestimmt.  $E_{\text{GABA}}$  wurde signifikant reduziert (Ausgangswert: offenes Quadrat), wenn das Zeitintervall zwischen zwei Messungen 120 s unterschritt (gefüllte Quadrate). **B** Repetitive Messung von  $E_{\text{GABA}}$  (gefüllte Rauten) und dem Maximalpotential der GABAergen Membrandepolarisation (offene Rauten). GABA-Antworten waren über den gesamten Beobachtungszeitraum stabil. Alle Datenpunkte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.

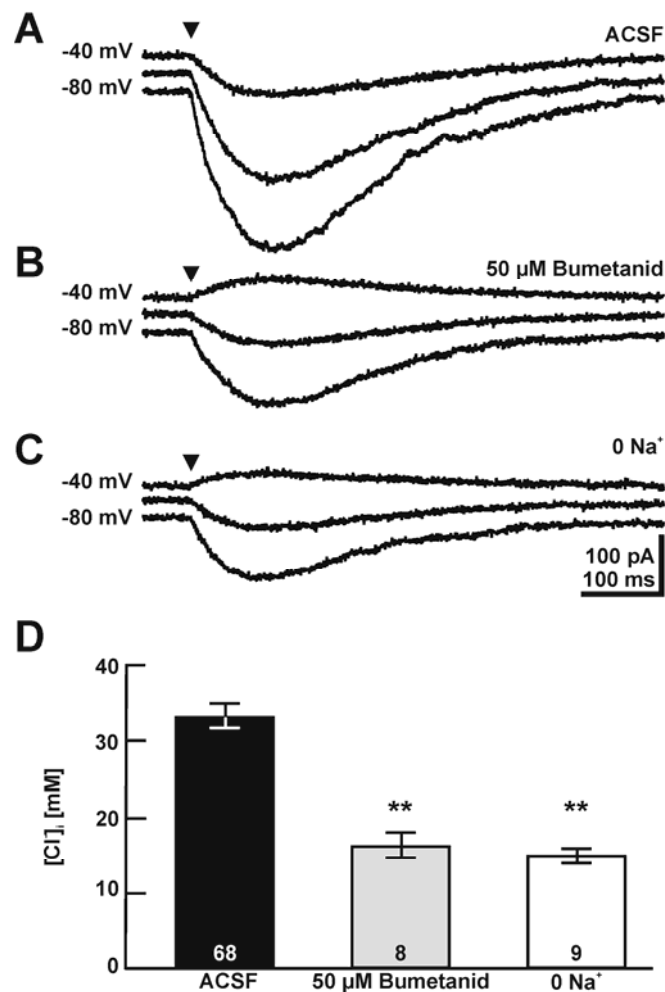
Haltepotentialen von -60, -80, -60 und -40 mV für ~ 1 ms appliziert. Der initiale GABA-Puls wurde nicht in die Berechnung des Umkehrpotentials einbezogen, sondern diente der Minimierung des Einflusses von Rezeptor-Desensitivierung und sicherte zudem, dass die GABA-Konzentration des zweiten GABA Pulses immer konstant und nicht durch Diffusionsprozesse während des 120s Intervalls reduziert war. Mit Hilfe dieses Protokolls konnte  $E_{GABA}$  über lange Zeit verfolgt werden (Abb. 4.3 B).

### 4.3 Cl<sup>-</sup> Homöostase in CR Zellen

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um den Cl<sup>-</sup> Haushalt in CR Zellen im Detail zu charakterisieren. Dazu sollte die  $[Cl^-]_i$  im Ruhezustand der Zellen bestimmt und die Cl<sup>-</sup>-Transporter und Ionenkanäle, durch die Cl<sup>-</sup> in die Zelle ein- bzw. ausströmen kann, identifiziert werden.

#### 4.3.1 Bestimmung der nativen $[Cl^-]_i$ in CR Zellen

Um die  $[Cl^-]_i$  im Ruhezustand der Zelle zu bestimmen, wurde  $E_{GABA}$  gemessen, sobald die Zugangsbedingungen in *perforated patch* Ableitungen stabil waren. In allen Zellen war  $E_{GABA}$  deutlich positiver als das Haltepotential ( $E_m$ ) von -60 mV. Das Umkehrpotential GABAerger Ströme betrug  $-33,5 \pm 1,0$  mV (n=68, Abb. 4.4 A). Anhand der Nernst-Gleichung wurde daraus eine  $[Cl^-]_i$  von ~ 33 mM errechnet. Die native  $[Cl^-]_i$  in CR Zellen ist somit deutlich höher als die durch passive Verteilung zu erwartende  $[Cl^-]_i$  von 13,4 mM. Dies legt nahe, dass Cl<sup>-</sup> aktiv in die Zellen hinein transportiert wird. Verantwortlich dafür könnte der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-Cotransporter NKCC1 sein (Delpire, 2000; Payne et al., 2003), der durch geringe Konzentrationen des Schleifendiuretikums Bumetanid



**Abb. 4.4: Einfluss von Bumetanid und Na<sup>+</sup>-freiem ACSF auf [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>.**

**A, B, C** Typische GABAerge Ströme in CR Zellen, ausgelöst bei Haltepotentialen von -80, -60 und -40 mV, vor (**A**) und nach der Inkubation mit 50 μM Bumetanid (**B**), sowie nach der Entfernung von Na<sup>+</sup> aus dem extrazellulären Medium (0 Na<sup>+</sup>, **C**). Die Messungen erfolgten in der *perforated patch* Konfiguration.  $E_{GABA}$  wurde durch Bumetanid und 0 Na<sup>+</sup> deutlich gesenkt. **D** Darstellung der [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, berechnet aus Messungen von  $E_{GABA}$  vor und nach der Inkubation mit Bumetanid, sowie in 0 Na<sup>+</sup>. Die [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> wurde durch die Inkubation mit Bumetanid oder 0 Na<sup>+</sup> signifikant reduziert.

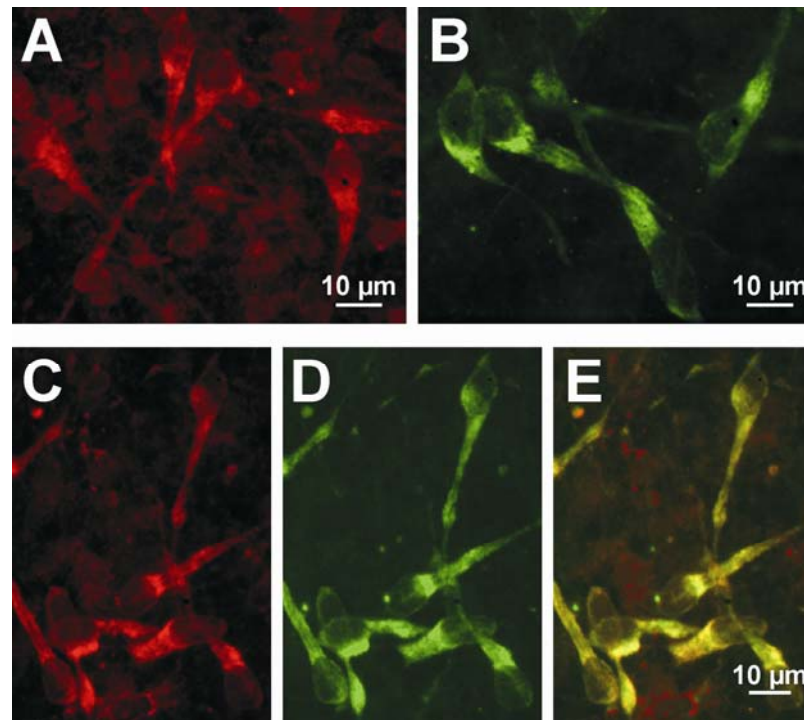
blockiert werden kann (Russell, 2000). Um zu testen, ob NKCC1 zur Cl<sup>-</sup>-Akkumulation in CR Zellen beiträgt, wurde  $E_{GABA}$  deshalb nach Inkubation mit 50 μM Bumetanid bestimmt.  $E_{GABA}$  war nach 20 - 30 minütiger Inkubation signifikant reduziert auf  $-48,9 \pm 2,0$  mV ( $n=8$ ,  $p<0,01$ , Abb.4 B). Dies

entspricht einer  $[Cl^-]_i$  von  $\sim 16,2$  mM. Der gleiche Effekt wurde erzielt, indem  $Na^+$  aus der extrazellulären Lösung entfernt und somit die Treibkraft des NKCC1-vermittelten  $Cl^-$ -Transportes eliminiert wurde. Nach 16 - 30 Minuten Inkubation in  $Na^+$ -freiem ACSF wurde eine Reduktion von  $E_{GABA}$  auf  $-50,5 \pm 1,3$  mV ( $n=9$ ,  $p<0,01$ , Abb. 4.4 C) beobachtet, was einer  $[Cl^-]_i$  von nur noch 14,9 mM entspricht.

Dass sowohl Bumetanid als auch die Entfernung von  $Na^+$  aus dem extrazellulären Medium die  $[Cl^-]_i$  signifikant gesenkt haben (Abb. 4.4 D), deutet auf eine wichtige Rolle des NKCC1-vermittelten  $Cl^-$ -Transportes bei der aktiven  $Cl^-$ -Akkumulation in CR Zellen hin.

#### 4.3.2 NKCC1-Expression in CR Zellen

In vorangegangenen Experimenten konnte NKCC1-mRNA mittels *in-situ* Hybridisierung und *single-cell* RT-PCR in CR Zellen nachgewiesen werden (Achilles et al., 2007). Um zu untersuchen, ob dieser Transporter auch auf Proteinebene exprimiert wird, wurden immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen NKCC1 (Lytle et al., 1995) an tangentialen Schnittpräparaten des Neocortex durchgeführt. Zur Identifikation von CR Zellen diente eine Cofärbung mit einem Reelin-spezifischen Antikörper (De Bergeyck et al., 1998). Das Fluoreszenzsignal der NKCC1-Färbung konnte in der gesamten Marginalzone detektiert werden. Ein Teil der NKCC1 positiven Zellen wies eindeutige morphologische Charakteristika von CR Zellen auf. Die Reelin-Färbung zeigte, dass alle Reelin positiven Zellen auch NKCC1-positiv waren (Abb. 4.5). NKCC1 wird demnach auf Proteinebene in wahrscheinlich allen CR Zellen exprimiert.



**Abb. 4.5: Immunohistochemischer Nachweis der NKCC1-Expression in CR Zellen.**

**A** Konfokale Aufnahme einer NKCC1-Färbung (T4-Antikörper) in einem tangentialen Schnittpräparat. Zellen, die die typische Morphologie von CR Zellen zeigten, waren NKCC1 positiv. **B** Konfokale Aufnahme einer Reelin-Färbung (SP142-Antikörper) in einem tangentialen Schnittpräparat. Diese Färbung verdeutlichte die morphologische Übereinstimmung von CR Zellen und NKCC1 positiven Zellen. **C-E** Doppelfärbung eines Tangentialschnittes mit Antikörpern gegen NKCC1 und Reelin. Die Überlagerung der Aufnahmen der NKCC1- (**C**) und Reelin-Färbung (**D**) zeigte, dass alle Reelin-positiven Zellen ebenfalls NKCC1-positiv waren.

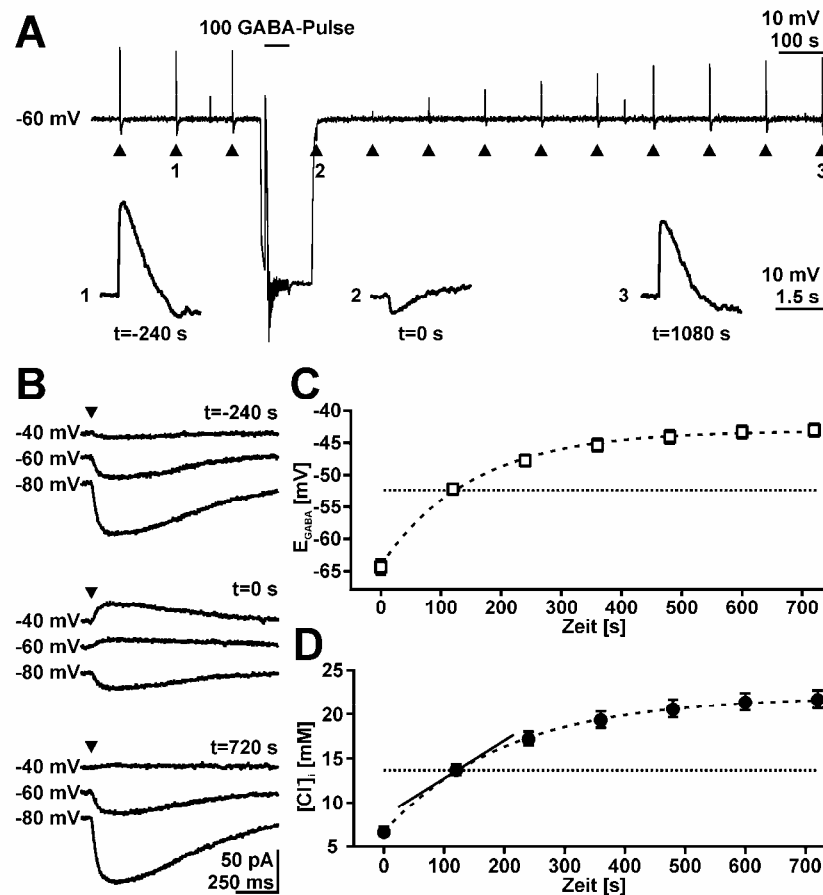
### 4.3.3 Der $\text{Cl}^-$ -Akkumulationsprozess

Die Abhängigkeit der  $[\text{Cl}^-]_i$  von Bumetanid und extrazellulärem  $\text{Na}^+$  sowie die Expression von NKCC1 in CR Zellen legen nahe, dass NKCC1 zur Regulation der  $\text{Cl}^-$ -Homöostase beiträgt. Die Messung von  $\text{Cl}^-$ -Gleichgewichtskonzentrationen gibt jedoch keinen Aufschluss darüber, in welchem Maße NKCC1 an der  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme beteiligt ist. Deshalb wurde der Prozess der aktiven  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation untersucht.

Hierzu wurde ein Entladungsprotokoll entwickelt, das die  $[Cl^-]_i$  der untersuchten Zelle massiv senkt: 100 GABA Pulse (1 mM GABA, 1 ms) wurden mit einer Frequenz von 2 Hz bei einem Haltepotential von -100 mV in der *perforated patch* Konfiguration fokal appliziert. Die Triebkraft für  $Cl^-$  ist unter diesen Bedingungen zellauswärts gerichtet, so dass  $Cl^-$  durch geöffnete  $GABA_A$ -Rezeptoren aus der Zelle herausströmt. Mit Hilfe dieses Protokolls konnte die  $[Cl^-]_i$  so effizient gesenkt werden, dass GABA-Antworten, die unter nativen Bedingungen die Membran depolarisierten (Amplitude:  $+12 \pm 2,3$  mV,  $n=8$ , *slow voltage clamp* Messungen), nach der Zellentladung hyperpolarisierend ( $-4,2 \pm 0,9$  mV) waren. Etwa 15 min nach der Entladung erreichten die GABA-Antworten in allen untersuchten Zellen wieder das Ausgangsniveau (Abb. 4.6 A). Dies zeigt, dass  $Cl^-$  durch einen langsamen Prozess in die Zelle hineintransportiert und so die ursprüngliche  $[Cl^-]_i$  wieder hergestellt wird.

#### 4.3.3.1 Kinetik der $Cl^-$ -Akkumulation

Die Bestimmung der Amplitude GABAerger Antworten als Maß für die  $[Cl^-]_i$  ist zu ungenau, um die kinetischen Eigenschaften der  $Cl^-$ -Akkumulation zu untersuchen. Deshalb wurde  $E_{GABA}$  unter *voltage clamp* Bedingungen nach der  $Cl^-$ -Entladung über einen Zeitraum von 15 - 20 min in einem Abstand von 120 s bestimmt und daraus die  $[Cl^-]_i$  berechnet.  $E_{GABA}$  wurde durch die  $Cl^-$ -Entladung signifikant ( $p < 0,001$ ,  $n=26$ ) von  $-38,5 \pm 1,3$  mV auf  $-64,3 \pm 1,2$  mV gesenkt. Dies entspricht einer Reduktion der  $[Cl^-]_i$  auf  $\sim 6,6$  mM. Nach  $\sim 15$  min erreichte  $E_{GABA}$  mit  $-43,0 \pm 1,0$  mV (entspricht einer  $[Cl^-]_i$  von  $\sim 21,5$  mM) wieder annähernd das Ausgangsniveau (Abb. 4.6 B, C). Der Akkumulationsprozess konnte durch eine monoexponentielle Funktion mit einer Zeitkonstante von  $158 \pm 7$  s beschrieben werden.



**Abb. 4.6:  $Cl^-$ -Akkumulation in CR Zellen.**

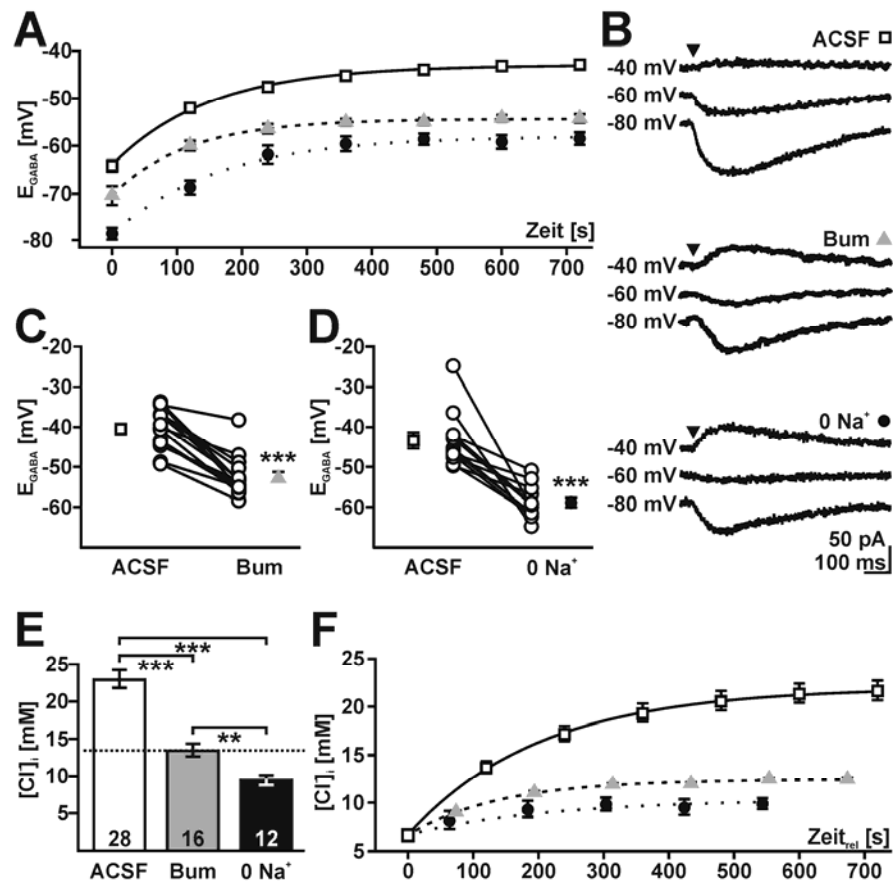
**A** Entladungsprotokoll, aufgenommen im *slow voltage clamp* Modus (Haltepotential: -60 mV). GABA (1 mM) wurde alle 120 s für 1-2 ms fokale appliziert (Pfeile), um die  $[Cl^-]_i$  abzuschätzen. Die Entladung erfolgte durch die Applikation von 100 GABA-Pulsen bei einem Haltepotential von -100 mV. Die Richtung der ursprünglich depolarisierenden GABA-Antworten wurde durch die Entladung umgekehrt (vergl. GABA-Pulse 1 und 2, vergrößert dargestellt unter der Messspur). 14-18 min nach der Entladung erreichten die GABA-Antworten wieder das Ausgangsniveau (GABA-Puls 3). Die Membranhyperpolarisation am Ende der GABA-Antworten ist ein Artefakt des *slow voltage clamp* Systems. **B** Typische Stromspuren zur Bestimmung von  $E_{GABA}$  vor ( $t=-240$  s) und direkt nach der Entladung ( $t=0$  s) sowie nach Erreichen des Ausgangsniveaus ( $t=720$  s) im *voltage-clamp* Modus. **C** Verlauf von  $E_{GABA}$  nach Anwendung des Entladungsprotokolls.  $E_{GABA}$  wurde nach der Entladung alle 120 s im *voltage-clamp* Modus bestimmt.  $E_{GABA}$  erreichte nach ~10-14 min annähernd das Ausgangsniveau. Die waagerechte Linie verdeutlicht  $E_{GABA}$ , das sich bei passiver  $Cl^-$ -Verteilung einstellen würde (-52,4 mV, bei einem Haltepotential von -60 mV und einer relativen Bicarbonatleitfähigkeit von 0,2). **D** Verlauf der  $[Cl^-]_i$  nach Anwendung des Entladungsprotokolls.  $[Cl^-]_i$  wurde aus den in **C** gezeigten Werten berechnet. Die waagerechte Linie kennzeichnet die passive  $Cl^-$ -Verteilung (13,4 mM). Die Geschwindigkeit des  $Cl^-$ -Transportes wurde aus der Steigung der Kurve (Tangente) bei dieser Konzentration bestimmt, da hier die  $Cl^-$ -Akkumulation unabhängig ist von passiven  $Cl^-$ -Verteilungsprozessen. Alle Messungen wurden in der *perforated patch* Konfiguration durchgeführt. Datenpunkte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.

Die erste Ableitung dieser Funktion beschreibt die Geschwindigkeit der  $[\text{Cl}^-]_i$ -Änderung. Diese wird durch zwei parallel ablaufende Prozesse bewirkt: zum einen durch aktiven  $\text{Cl}^-$ -Transport unter Verbrauch von Energie und zum anderen durch passive  $\text{Cl}^-$ -Ströme, die aufgrund des elektrochemischen  $\text{Cl}^-$ -Gradienten fließen. Bei passiver  $\text{Cl}^-$ -Verteilung sind Konzentrationsgradient und elektromotorische Kraft für  $\text{Cl}^-$  im Gleichgewicht und es existiert keine Triebkraft für passive  $\text{Cl}^-$ -Ströme. An diesem Punkt, unter den gegebenen Bedingungen bei einer  $[\text{Cl}^-]_i$  von 13,4 mM, ist die Änderung der  $[\text{Cl}^-]_i$  nur von aktivem  $\text{Cl}^-$ -Transport abhängig. Die Geschwindigkeit des aktiven  $\text{Cl}^-$ -Transportes bei passiver  $\text{Cl}^-$ -Verteilung betrug  $47,2 \pm 5,0 \mu\text{M/s}$  ( $n=26$ , Abb. 4.6 D).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass der NKCC1-vermittelte  $\text{Cl}^-$ -Transport eine aktive  $\text{Cl}^-$  Aufnahme mit einer geringen Transportkapazität vermittelt.

#### 4.3.3.2 Pharmakologie der $\text{Cl}^-$ -Akkumulation

Um zu untersuchen, inwieweit NKCC1 zur  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation beiträgt, wurde in *perforated patch* Messungen das Entladungsprotokoll unter Zusatz von 50  $\mu\text{M}$  Bumetanid (Inkubationszeit 4 oder 20 min) durchgeführt. In Gegenwart von Bumetanid erholte sich  $E_{\text{GABA}}$  nach der  $\text{Cl}^-$ -Entladung signifikant weniger als in ACSF ( $p < 0,001$ ; Abb. 4.7 A) und erreichte lediglich  $-52,5 \pm 1,2 \text{ mV}$  ( $n=16$ , Abb. 4.7 B, C). Das entspricht einer  $[\text{Cl}^-]_i$  von  $\sim 13,4 \text{ mM}$  und somit einer passiven  $\text{Cl}^-$ -Verteilung (Abb. 4.7 E). Dies zeigt, dass aktiver  $\text{Cl}^-$ -Transport in CR Zellen durch Bumetanid komplett blockierbar ist.



#### Abb. 4.7: Pharmakologie der Cl<sup>-</sup>-Akkumulation

**A** Verlauf von  $E_{GABA}$  nach Anwendung des Entladungsprotokolls unter Kontrollbedingungen (offene Quadrate  $n=26$ ), in der Gegenwart von  $50 \mu\text{M}$  Bumetanid (graue Dreiecke,  $n=10$ ) und in  $\text{Na}^+$ -freiem ACSF (gefüllte Kreise,  $n=7$ ).  $E_{GABA}$  erholte sich in Bumetanid und  $\text{Na}^+$ -freiem ACSF langsamer und erreichte geringere Endwerte als unter Kontrollbedingungen. **B** Typische Stromspuren zur Bestimmung von  $E_{GABA}$  nach Erholung in ACSF,  $50 \mu\text{M}$  Bumetanid (Bum) und in  $\text{Na}^+$ -freiem ACSF ( $0 \text{Na}^+$ ). **C, D** Darstellung von  $E_{GABA}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM), bestimmt nach Erholung in ACSF (offene Quadrate) und anschließender Entladung und Erholung in  $50 \mu\text{M}$  Bumetanid (**C**, graues Dreieck,  $n=16$ ) bzw. in  $\text{Na}^+$ -freiem ACSF (**D**, geschlossener Kreis,  $n=12$ ). Alle Einzelexperimente sind durch mit Linien verbundene, offene Kreise dargestellt.  $E_{GABA}$  wurde durch Bumetanid und  $\text{Na}^+$ -freies ACSF signifikant ( $p < 0,001$ ) reduziert. **E** Einfluss von Bumetanid und  $\text{Na}^+$ -freiem ACSF auf  $[\text{Cl}^-]_i$ .  $[\text{Cl}^-]_i$  (Mittelwert  $\pm$  SEM) wurde aus den Werten von  $E_{GABA}$ , dargestellt in **C** und **D**, berechnet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet passive Cl<sup>-</sup>-Verteilung ( $13,4 \text{ mM}$ ). **F** Verlauf der  $[\text{Cl}^-]_i$  nach Anwendung des Entladungsprotokolls, berechnet aus den  $E_{GABA}$ -Werten, dargestellt in **A**. Da die Geschwindigkeit der  $[\text{Cl}^-]_i$ -Änderung von der  $[\text{Cl}^-]_i$  selbst abhängig ist, wurden alle Kurven bei identischer  $[\text{Cl}^-]_i$  gestartet ( $t=0$ :  $[\text{Cl}^-]_i=6,6 \text{ mM}$ ).

Bumetanid blockt NKCC1 nicht selektiv, sondern hemmt auch andere Cl<sup>-</sup>-Transporter, wie z.B. KCC2. Da der NKCC1 vermittelte Cl<sup>-</sup>-Transport Na<sup>+</sup>-abhängig ist, wurde in weiteren *perforated patch* Messungen die Cl<sup>-</sup>-Entladung in Na<sup>+</sup>-freiem ACSF durchgeführt. E<sub>GABA</sub> erholte sich in Na<sup>+</sup>-freier extrazellulärer Lösung ebenfalls signifikant (p<0,001) weniger als in ACSF (Abb. 4.7 A). E<sub>GABA</sub> erreichte  $-58,9 \pm 1,2$  mV (n=12, Abb. 4.7 B, D), entsprechend einer [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> von  $\sim 9,4$  mM (Abb. 4.7 E). Anders als der weitgehend irreversible Effekt durch Bumetanid war der Effekt durch Na<sup>+</sup>-freies ACSF komplett reversibel: Nachdem der extrazellulären Lösung Na<sup>+</sup> wieder zugesetzt wurde, erreichte E<sub>GABA</sub> innerhalb von 15 min mit  $-43,2 \pm 2,5$  mV (n=10) das Ausgangsniveau.

In Na<sup>+</sup>-freier Lösung erreichte E<sub>GABA</sub> nach Cl<sup>-</sup>-Entladung signifikant niedrigere Werte als in der Gegenwart von Bumetanid (p<0,01). Durch die Na<sup>+</sup>-freie extrazelluläre Lösung kann der Transportprozess nicht nur blockiert, sondern auch umgekehrt werden (Kakazu et al., 2000). Um zu untersuchen, ob der geringeren Erholung von E<sub>GABA</sub> eine Umkehr der Transportrichtung zugrunde liegt, wurde das Entladungsprotokoll in Na<sup>+</sup>-freiem ACSF unter Zusatz von 50 μM Bumetanid durchgeführt. Die unter diesen Bedingungen erreichten Werte für E<sub>GABA</sub> ( $-60,7 \pm 2,5$  mV, n=5) unterschieden sich nicht signifikant (p=0,89) von denen, die in Na<sup>+</sup>-freiem ACSF erreichte wurden. Durch den Zusatz von Na<sup>+</sup> in die Bumetanid-haltige extrazelluläre Lösung stieg E<sub>GABA</sub> auf  $-53,6 \pm 1,8$  mV, was passiver Cl<sup>-</sup>-Verteilung entspricht. Dies zeigt, dass die geringere Erholung von E<sub>GABA</sub> in Na<sup>+</sup> freier Lösung nicht durch NKCC1 vermittelt wird.

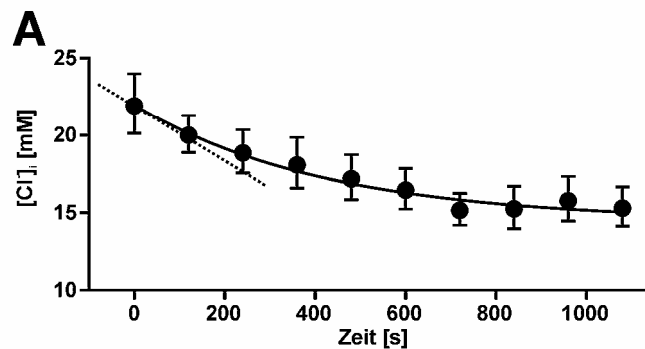
Die Geschwindigkeit von passiven Cl<sup>-</sup>-Strömen und aktivem Cl<sup>-</sup>-Transport ist abhängig von der [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>. Um die Transportraten unter den verschiedenen Versuchsbedingungen vergleichen zu können, wurde die Zeitachse so normiert, dass zum Zeitpunkt t=0, die [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> 6,6 mM beträgt (entspricht der niedrigsten

$[\text{Cl}^-]_i$ , die unter allen drei Versuchsbedingungen erreicht wurde). Abbildung 4.7 E zeigt deutlich die drastische Reduktion der  $\text{Cl}^-$ -Transportgeschwindigkeit durch Bumetanid und  $\text{Na}^+$  freies ACSF.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation in CR Zellen Bumetanid-sensitiv und  $\text{Na}^+$ -abhängig ist. Da in Gegenwart von Bumetanid die  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation in CR Zellen vollständig unterdrückt ist, spielt der NKCC1 eine zentrale Rolle beim aktiven  $\text{Cl}^-$ -Transport.

#### 4.3.4 $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeiten in CR Zellen

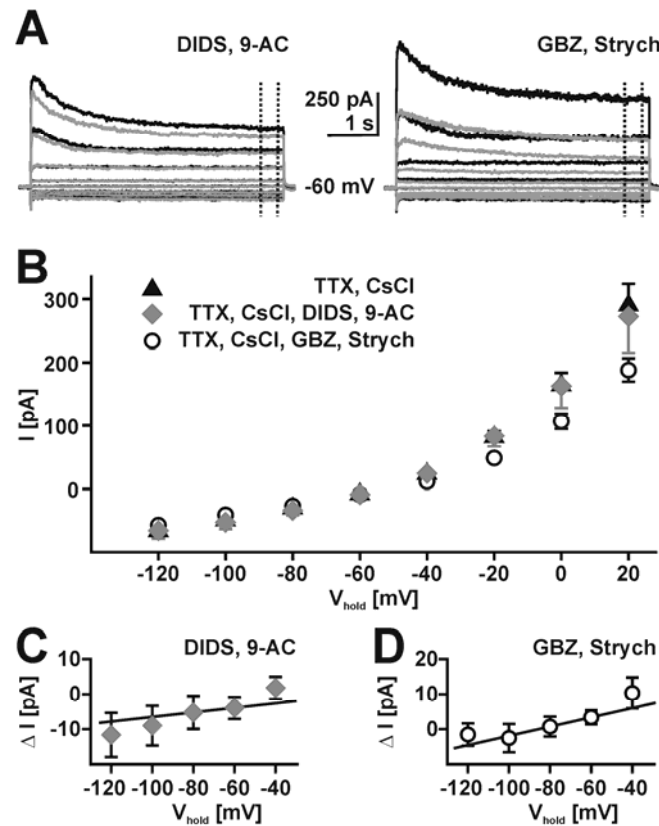
Unsere bisherigen Ergebnisse weisen auf eine geringe Kapazität des aktiven  $\text{Cl}^-$ -Transportes in CR Zellen hin. Damit auch bei geringer Transportkapazität eine hohe  $[\text{Cl}^-]_i$  aufrechterhalten werden kann, sollte der  $\text{Cl}^-$ -Verlust über passive  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeiten gering sein. Deshalb wurde untersucht, wie groß der permanent auszugleichende  $\text{Cl}^-$ -Verlust durch Membranleitfähigkeiten in CR Zellen ist. Hierzu wurde die Veränderung der  $[\text{Cl}^-]_i$  nach Blockade der  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation durch 50  $\mu\text{M}$  Bumetanid verfolgt, indem alle 120 s  $E_{\text{GABA}}$  bestimmt wurde. Nach 20 min war  $E_{\text{GABA}}$  von  $-42,8 \pm 1,4$  mV auf  $-50,5 \pm 1,6$  mV ( $n=6$ ) gesunken. Dies entspricht einer Reduktion der  $[\text{Cl}^-]_i$  von  $\sim 22$  mM auf  $\sim 15$  mM. Die Abnahme der  $[\text{Cl}^-]_i$  konnte durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden (Abb. 4.8 A). Die Geschwindigkeit des  $\text{Cl}^-$ -Verlustes wurde aus der Ableitung dieser Funktion bestimmt und betrug bei nativer  $[\text{Cl}^-]_i$   $18,4 \pm 2,4$   $\mu\text{M/s}$  ( $n=6$ ). Dies legt nahe, dass der NKCC1 vermittelte  $\text{Cl}^-$ -Transport in CR Zellen den  $\text{Cl}^-$ -Verlust ausgleichen und die hohe  $[\text{Cl}^-]_i$  aufrechterhalten kann.



**Abb. 4.8: Cl<sup>-</sup>-Verlust in CR Zellen**

**A** Abnahme der  $[Cl^-]_i$  nach Blockade von NKCC1 durch 50  $\mu$ M Bumetanid, gemessen unter *perforated patch* Bedingungen. Die Geschwindigkeit des maximalen Cl<sup>-</sup>-Verlustes wurde aus der Steigung der Tangenten im ersten Datenpunkt (n=6, gestrichelte Linie) berechnet.

Um zu untersuchen, welche Cl<sup>-</sup>-Kanäle zu dem Cl<sup>-</sup>-Verlust beitragen, wurde in *voltage clamp* Experimenten in der *whole cell* Konfiguration ( $[Cl^-]$  in der Pipettenlösung: 50 mM) die Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit von CR Zellen anhand der Strom-Spannungskurve (IV) untersucht. Dazu wurde der Strom gemessen, der in Abhängigkeit verschiedener Haltepotentiale fließt (Abb.4.9 A). Die Experimente erfolgten in der Gegenwart von 0,2 – 1  $\mu$ M TTX und 1 mM CsCl, um zu verhindern, dass Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeiten von spannungsabhängigen Na<sup>+</sup>-Strömen oder I<sub>H</sub>-Strömen überlagert werden. Durch 9-Anthracencarbonsäure (9-AC) und 4,4'-Diisothiocynato-2,2'-Stilbendisulfonsäure (DIDS) kann eine Vielzahl von Cl<sup>-</sup>-Kanälen blockiert werden, darunter spannungsabhängige und Ca<sup>2+</sup>-aktivierte Cl<sup>-</sup>-Kanäle sowie volumenregulierte Anionenkanäle (Nilius & Droogmans, 2003). Die Anwendung von 9-AC (1 mM) und DIDS (375  $\mu$ M) beeinflusste die IV kaum (Abb. 4.9 A, B). Die Leitfähigkeit der Cl<sup>-</sup>-Kanäle, die durch 9-AC und DIDS blockierbar sind, wurde aus der Differenz der Membranströme unter Kontroll- und 9-AC / DIDS-Bedingungen abgeschätzt. Bei Haltepotentialen im Bereich des RMP wurde eine Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit von ~ 64 pS (n=6) bestimmt (Abb. 4.9 C). Um zu untersuchen, ob GABA<sub>A</sub>- und / oder Glyzin-Rezeptoren zur Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit beitragen, wurde die IV unter Zu-



#### Abb. 4.9: Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit in CR Zellen

**A** Typische Stromspuren zur Bestimmung der Strom-Spannungskennlinie (IV) von CR Zellen, gemessen in der *whole cell* Konfiguration mit einer  $[Cl^-]_p$  von 50 mM. Die Messungen erfolgten in der Gegenwart von 1 mM CsCl und 0,2 mM TTX vor (schwarze Spur) und nach der Inkubation mit 375  $\mu$ M DIDS und 1 mM 9-AC (graue Spur, links) bzw. 3  $\mu$ M GBZ und 30  $\mu$ M Strychnin (graue Spur, rechts). Die Zelle wurde ausgehend von -60 mV für 4 s auf Potentiale zwischen -120 und 20 mV geklemmt. Die gestrichelten Linien umfassen das zur Auswertung herangezogene Zeitintervall. **B** Strom-Spannungskurve, gemessen in der Gegenwart von TTX und CsCl vor (Dreiecke) und nach der Inkubation mit DIDS und 9-AC (graue Rauten) bzw. GBZ und Strychnin (offene Kreise). Die Inkubation mit Cl<sup>-</sup>-Kanalblockern hatte kaum Einfluss auf die Membranströme, während GBZ und Strychnin die Membranströme bei depolarisierten Haltepotentialen reduzierten. **C, D** Strom-Spannungs-Beziehung der Differenzströme ( $\Delta I$ ) zwischen Kontroll- und 9-AC/DIDS-Bedingungen ( $n=6$ , **C**) bzw. zwischen Kontroll- und GBZ/Strychnin-Bedingungen ( $n=8$ , **D**). Die Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit wurde aus der Steigung der Regressionsgeraden zwischen -80 und -60 mV abgeschätzt.

satz von GABA- und Glycin-Antagonisten gemessen. In der Gegenwart von Gabazin (GBZ, 3  $\mu$ M) und Strychnin (30  $\mu$ M) waren die Membranströme bei Spannungen unter -20 mV nur geringfügig kleiner als unter Kontroll-

bedingungen. Bei Spannungen über  $-20$  mV wurden die Ströme durch GBZ und Strychnin aber deutlich reduziert (Abb. 4.9 A, B). Aus den Differenzströmen wurde die  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit abgeschätzt. Sie betrug in der Nähe des RMP  $\sim 132$  pS ( $n=8$ , Abb. 4.9 D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit in CR Zellen sehr gering ist und sowohl über ligandenaktivierte als auch über ligandenunabhängige  $\text{Cl}^-$ -Kanäle erfolgt.

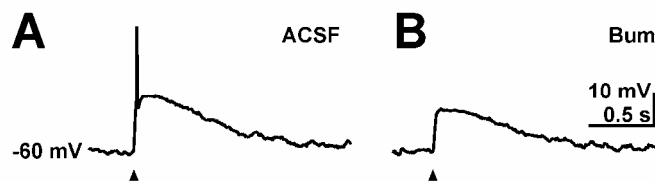
#### 4.4 Effekte von GABA in CR Zellen

Die  $[\text{Cl}^-]_i$  determiniert, ob GABA depolarisierende oder hyperpolarisierende Membranantworten hervorruft. Im vorangegangenen Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die  $[\text{Cl}^-]_i$  in CR Zellen sehr hoch, der NKCC1-abhängige Transportprozess aber langsam ist. Im nun folgenden Teil werden die funktionellen Konsequenzen der durch einen langsamen  $\text{Cl}^-$ -Transport aufrechterhaltenen hohen  $[\text{Cl}^-]_i$  untersucht.

##### 4.4.1 GABAerge Exzitation

Um die funktionellen Konsequenzen der hohen  $[\text{Cl}^-]_i$  zu untersuchen, wurde in der *perforated patch* Konfiguration GABA fokal appliziert und die resultierende Membranantwort in *current clamp* Messungen bestimmt. In allen untersuchten Zellen wurde die Membran durch GABA um durchschnittlich  $20,9 \pm 0,7$  mV ( $n=68$ ) depolarisiert. In 79,1 % der Zellen erreichte die GABAerge Depolarisation die Reizschwelle und löste Aktionspotentiale aus (Abb. 4.10 A). Nach Inkubation der Schnitte in  $50$   $\mu\text{M}$  Bumetanid für  $7,5 - 30$  min depolarisierte GABA die Membran nur noch auf  $-50,9 \pm 1,5$  mV ( $n=7$ ).

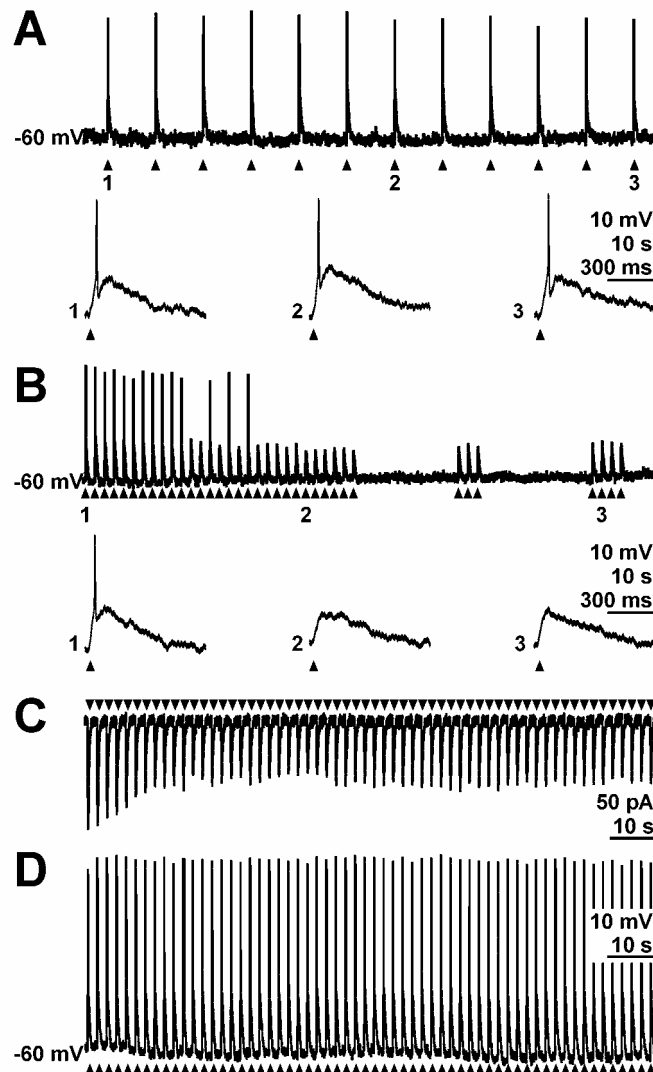
In Gegenwart von Bumetanid löste GABA in keiner der untersuchten Zellen Aktionspotentiale aus (Abb. 4.10 B). Dies zeigt, dass GABA in CR Zellen die Membran depolarisiert und dass Bumetanid-sensitive  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation entscheidend für die Aufrechterhaltung GABAerge Exzitation ist.



**Abb. 4.10: GABAerge Exzitation CR Zellen**

**A** Typische *current clamp* Messung einer CR Zelle in der *perforated patch* Konfiguration. Die fokale Applikation von GABA (1 mM, 1 ms, Pfeil) löste ein Aktionspotential aus. **B** In der gleichen Zelle wurde durch GABA nach der Inkubation mit 50 μM Bumetanid kein Aktionspotential mehr ausgelöst.

Durch die Öffnung von  $\text{Cl}^-$ -Kanälen und dem daraus resultierenden Ausstrom von  $\text{Cl}^-$  kann GABA die  $[\text{Cl}^-]_i$  reduzieren. Um abzuschätzen, unter welchen Bedingungen ein durch GABA induzierter  $\text{Cl}^-$ -Ausstrom die Kapazität des langsamen  $\text{Cl}^-$ -Einwärtstransports übersteigt und es durch eine Verringerung des  $\text{Cl}^-$ -Gradienten zu Veränderungen der GABAergen Antworten kommt, wurden repetitive fokale GABA-Pulse mit steigender Frequenz appliziert. Bei einer Applikationsfrequenz von 0,1 Hz löste jeder GABA-Puls Aktionspotentiale aus ( $n=4$ , Abb. 4.11 A). Die Amplitude der GABAergen Membrandepolarisation wurde durch die repetitive GABA-Applikation nicht signifikant verändert. Eine Erhöhung der Applikationsfrequenz auf 0,2 Hz führte innerhalb von 120 s zu einer Reduktion der GABAerge Depolarisation von  $-45 \pm 2$  auf  $-48 \pm 2$  mV ( $n=4$ ). Dennoch lösten 96 % aller GABA-Pulse Aktionspotentiale aus. Die GABAerge Membranantwort wurde bei einer Applikationsfrequenz von 0,5 Hz deutlicher stärker reduziert und sank innerhalb von 48 s von  $-46 \pm 1$



**Abb. 4.11: Veränderung GABAerger Antworten durch repetitive GABA-Applikation**

**A, B** Repetitive fokale GABA Applikation (1 mM, 1 ms, Pfeile) unter *perforated patch* Bedingungen. Mit Nummern gekennzeichnete GABA-Antworten sind vergrößert unter der Messspur dargestellt. Bei einer Applikationsfrequenz von 0,1 Hz (**A**) löste jede Applikation ein Aktionspotential aus. Eine Erhöhung der Applikationsfrequenz auf 0,5 Hz (**B**) reduzierte die Amplitude GABAerger Antworten (1) und verhinderte die Auslösung von Aktionspotentialen (2). Die Amplitude der GABA-Antworten erhöhte sich zwar nach Aussetzen der repetitiven GABA-Applikation wieder, war aber nicht ausreichend, um Aktionspotentiale auszulösen (3). **C** *Voltage-clamp* Messung GABAerger Ströme, durchgeführt in der *whole cell* Konfiguration mit einer  $[Cl^-]_p$  von 30 mM. Repetitive GABA-Applikation mit einer Frequenz von 0,5 Hz führte zu einer partiellen Desensitivierung der GABAergen Antworten. **D** *Current clamp* Messung GABAerger Antworten, durchgeführt in der *whole cell* Konfiguration mit einer  $[Cl^-]_p$  von 30 mM. Repetitive fokale GABA-Applikation mit einer Frequenz von 0,5 Hz (1 mM, 1 ms, Pfeile) löste unter diesen Bedingungen bei jeder Applikation Aktionspotentiale aus.

auf  $-54 \pm 1$  mV ( $n=6$ , Abb. 4.11 B). Nach  $20 \pm 5$  GABA-Pulsen wurden keine Aktionspotentiale mehr ausgelöst. Erst nach 15 – 20 min erreichte die GABAerge Depolarisation wieder ihren Ausgangswert und löste Aktionspotentiale aus. Um auszuschließen, dass der Reduktion GABAerger Depolarisationen eine Desensitivierung von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren zugrunde liegt, wurden 14 bis 74 s nach der repetitiven GABA-Applikation zusätzliche GABA-Pulse ausgelöst. Diese lösten ebenfalls Depolarisationen mit reduzierter Amplitude aus, die in keinem Fall die Aktionspotentialschwelle erreichten (Abb. 4.11 B). Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion der GABAergen Membranantwort nicht durch eine mögliche Rezeptordesensitivierung zu erklären ist. Zusätzlich wurden Kontrollexperimente in der *whole cell* Konfiguration mit einer 30 mM Cl<sup>-</sup>-haltigen Pipettenlösung durchgeführt. Unter diesen Bedingungen zeigten *voltage clamp* Messungen bei einer Applikationsfrequenz von 0,2 Hz eine deutliche Rezeptordesensitivierung um  $44,3 \pm 3,3$  % ( $n=9$ ) innerhalb der ersten 10 GABA-Pulse (Abb. 4.11 C). Dennoch löste jeder GABA-Puls Aktionspotentiale aus (Abb. 4.11 D). Der Eingangswiderstand der Zellen wurde durch die repetitive GABA-Applikation nicht verändert:  $R_{input}$  betrug zu Beginn der Applikation  $0,67 \pm 0,11$  GΩ und nach 10 Pulsen  $0,65 \pm 0,07$  GΩ. Die Aktionspotentialschwelle blieb ebenfalls konstant ( $-37,2 \pm 0,6$  bzw.  $-38,8 \pm 0,5$  mV). Demnach tritt Rezeptordesensitivierung zwar auf, beeinflusst die Auslösung von Aktionspotentialen unter *whole cell* Bedingungen aber nicht. Außerdem kann die Reduktion der GABAergen Depolarisation nicht auf eine Verringerung des Eingangswiderstandes durch extrazelluläre GABA-Akkumulation oder auf eine Inaktivierung spannungsgesteuerter Na<sup>+</sup>-Kanäle zurückgeführt werden. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die durch repetitive GABA-Applikation bewirkte Reduktion der GABAergen Antworten überwiegend auf einer Abnahme der [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> beruht. Diese Abnahme ist auf einen, die NKCC1-vermittelte Cl<sup>-</sup>-Akkumulation übersteigenden, GABAergen Cl<sup>-</sup>-Austrom

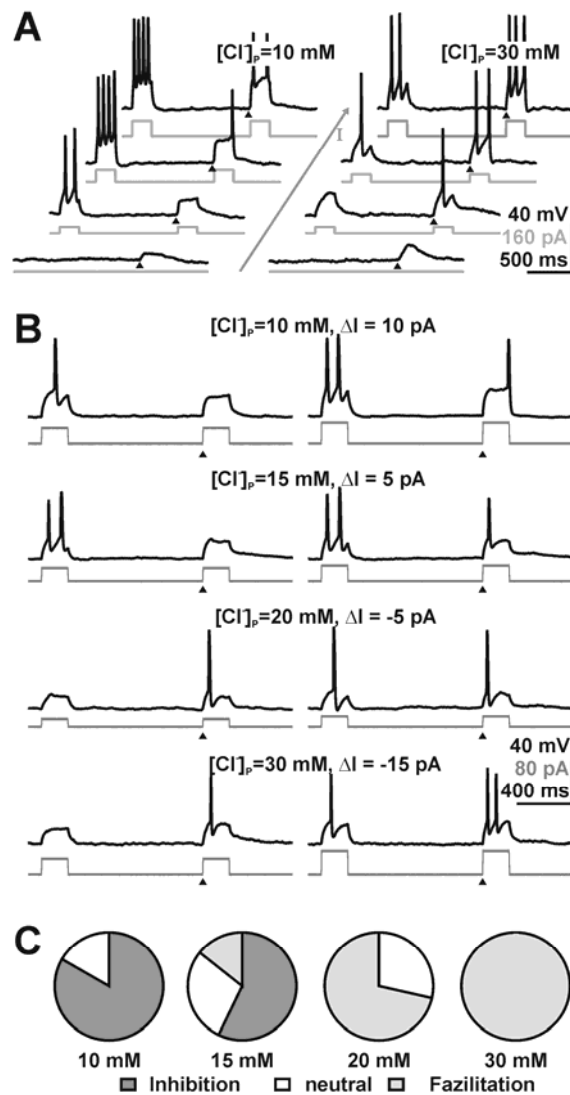
zurückzuführen. Durch massive GABAerge Stimulation kann also die  $[Cl^-]_i$  so weit gesenkt werden, dass GABAerge Exzitation unterdrückt wird.

#### 4.4.2 Unterschwellige GABAerge Membrandepolarisationen

GABAerge Membrandepolarisationen können sowohl unterschwellige Reize verstärken, so dass sie überschwellig werden (Fazilitation), oder überschwellige Reize hemmen, so dass sie nicht mehr exzitatorisch sind (Inhibition). Im folgenden Teil der Arbeit wird untersucht, unter welchen Bedingungen erregende Reize in CR Zellen durch GABAerge Membrandepolarisationen faszilitiert oder inhibiert werden.

##### 4.4.2.1 Effekte GABAerger Depolarisationen in Abhängigkeit von $[Cl^-]_i$

Um zu untersuchen, inwiefern die  $[Cl^-]_i$  die Wirkung GABAerger Depolarisationen auf erregende Reize beeinflusst, wurden *current clamp* Messungen in der *whole cell* Konfiguration mit Pipettenlösungen unterschiedlicher  $[Cl^-]$  ( $[Cl^-]_p$ ) durchgeführt. Um den erregenden Reiz zu simulieren, wurden Strompulse steigender Intensität (0 – 60 pA, in 5 pA Schritten) injiziert. Simultan zur Strominjektion wurde ein kurzer GABA-Puls (1 ms) fokal appliziert und die Membranantwort, die durch die kombinierte Strom- und GABA-Applikation hervorgerufen wurde, aufgezeichnet. Die Wirkung des erregenden Reizes alleine wurde bestimmt, indem ein Strompuls gleicher Stärke ohne GABA-Applikation injiziert und die entsprechende Membranantwort aufgezeichnet wurde (Abb. 4.12 A, B). Zur Abschätzung der GABAergen Wirkung wurde die Differenz ( $\Delta I_{\text{threshold}}$ ) der zur Auslösung von



**Abb. 4.12: Effekte unterschwelliger GABAerger Membrandepolarisationen in Abhängigkeit von  $[Cl]_i$**

**A** Membranantworten (schwarze Spuren) von CR Zellen, hervorgerufen durch Strominjektion steigender Intensität (I, graue Spuren) in der *whole cell* Konfiguration. Der Strom wurde isoliert und gepaart mit simultaner fokaler GABA-Applikation (1 mM, 1 ms, Pfeil) injiziert. Bei  $[Cl]_p$  von 10 mM (links) wurde der zur Auslösung von Aktionspotentialen (APs) nötige Injektionsstrom durch GABA erhöht, während er bei  $[Cl]_p$  von 30 mM verringert wurde. **B** Typische Messspuren zur Bestimmung der Differenz der Injektionsströme ( $\Delta I$ ), die mit und ohne GABA zur Auslösung von APs notwendig waren. Verglichen wurden die Stromstärken, die nötig war, um mit oder ohne GABA ein AP auszulösen (links) und die Stromstärken, bei denen unter beiden Bedingungen APs ausgelöst wurden (rechts). Durch GABA wurde die Auslösung von APs erschwert ( $\Delta I > 0$ ;  $[Cl]_p = 10, 15 \text{ mM}$ ) oder erleichtert ( $\Delta I < 0$ ;  $[Cl]_p = 20, 30 \text{ mM}$ ). **C** Anteil der CR Zellen, bei denen GABA in Abhängigkeit von  $[Cl]_p$  (10, 30 mM: n=6; 15, 20 mM: n=7), den Injektionsstrom erhöhte (Inhibition, dunkelgrau), verringerte (Fazilitation, hellgrau) oder nicht beeinflusste (neutral, weiß).

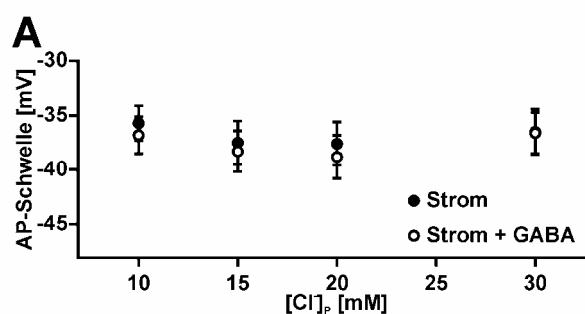
Aktionspotentialen notwendigen Stromstärken mit und ohne GABA-Applikation berechnet.

Bei einer  $[Cl^-]_p$  von 10 mM unterdrückte die simultane Applikation von GABA in 5 von 6 Zellen die Aktionspotentialauslösung bei Stromstärken, die ohne GABA-Applikation exzitatorisch waren. Der zur Auslösung von Aktionspotentialen benötigte Injektionsstrom wurde durch die GABA-Applikation signifikant ( $p=0,042$ ;  $n=6$ ) um  $0,3 \pm 0,08$  pA/pF erhöht (Abb. 4.12 B, C). Bei einer  $[Cl^-]_p$  von 30 mM, die ungefähr der physiologischen  $[Cl^-]_i$  entspricht, wurde die Auslösung von Aktionspotentialen durch die simultane GABA-Applikation in allen untersuchten Zellen ( $n=6$ ) erleichtert (Abb. 4.12 A). Der Injektionsstrom, der zur Auslösung von Aktionspotentialen nötig war, wurde durch die GABA-Applikation signifikant ( $p=0,026$ ) um  $-0,27 \pm 0,1$  pA/pF reduziert (Abb. 4.12 B, C).

Um zu testen, bei welcher  $[Cl^-]_i$  die Wirkung GABAerger Membrandepolarisationen von inhibitorisch auf faszilitierend übergeht, wurden die Experimente mit Pipettenlösungen, die 20 mM und 15 mM  $Cl^-$  enthielten, wiederholt. Bei einer  $[Cl^-]_p$  von 20 mM wurde der zur Auslösung von Aktionspotentialen nötige Injektionsstrom durch simultane GABA-Applikation signifikant ( $p=0,025$ ) um  $-0,08 \pm 0,02$  pA/pF reduziert (Abb. 4.12 B). In 2 von 7 Zellen veränderte die GABA-Applikation den zur Auslösung von Aktionspotentialen nötigen Injektionsstrom nicht, während sie in den anderen Zellen faszilitierend wirkte (Abb. 4.12 C). Bei einer  $[Cl^-]_p$  von 15 mM waren die Ergebnisse sehr heterogen: Die simultane GABA-Applikation erhöhte den zur Auslösung von Aktionspotentialen nötigen Injektionsstrom in 4 von 7 Zellen, und verringerte ihn in einer Zelle. In 2 Zellen zeigte sie keine Wirkung (Abb. 4.12 C). Im Mittel wurde der zur Auslösung von Aktionspotentialen nötige Injektionsstrom um  $0,12 \pm 0,02$  pA/pF erhöht (Abb. 4.12 B). Die Änderung war nicht signifikant ( $p=0,131$ ). Dies deutet darauf hin, dass die

GABAerge Wirkung bei einer bestimmten  $[Cl^-]_i$  ( $[Cl^-]_{i0}$ ), die in der Größenordnung von 15 mM liegt, von inhibitorisch auf faszilitierend übergeht ( $\Delta I_{\text{threshold}}=0$ ) ist. Da die GABAerge Potentialänderung, die  $\Delta I_{\text{threshold}}$  zugrunde liegt, vom  $\log([Cl^-]_i)$  abhängig ist, wurde  $[Cl^-]_{i0}$  als Nullstelle der Auftragung von  $\Delta I$  gegen  $\log([Cl^-]_p)$  bestimmt (Abb. 4.14 B).  $[Cl^-]_{i0}$  betrug  $\sim 17$  mM.

Um auszuschließen, dass  $\Delta I_{\text{threshold}}$  eine Verschiebung der Aktionspotentialschwelle zugrunde liegt, wurde die Aktionspotentialschwelle für jede Messung ohne und mit GABA-Applikation bestimmt (Abb. 4.13 A). Bei  $[Cl^-]_p$  von 10, 15 und 30 mM wurde die Aktionspotentialschwelle durch die GABA-Applikation nicht signifikant verändert. (10 mM:  $-35,7 \pm 1,6$  mV (ohne GABA) vs.  $-36,8 \pm 1,7$  mV (mit GABA),  $p=0,116$ ; 15 mM:  $-37,5 \pm 2,0$  mV vs.  $-38,3 \pm 1,9$  mV,  $p=0,5$ ; 30 mM:  $-36,5 \pm 2,1$  mV vs.  $-36,6 \pm 1,9$  mV,  $p=0,345$ ). Bei einer  $[Cl^-]_p$  von 20 mM war die Aktionspotentialschwelle bei simultaner GABA-Applikation niedriger als unter Kontrollbedingungen ( $-37,6 \pm 2,0$  mV vs.  $-38,8 \pm 2,0$  mV,  $p=0,028$ ). Diese Änderung der Aktionspotentialschwelle erreichte zwar statistische Signifikanz, liegt aber im Bereich der Messgenauigkeit, so dass der Reduktion vermutlich keine GABAerge Wirkung zu Grunde liegt.



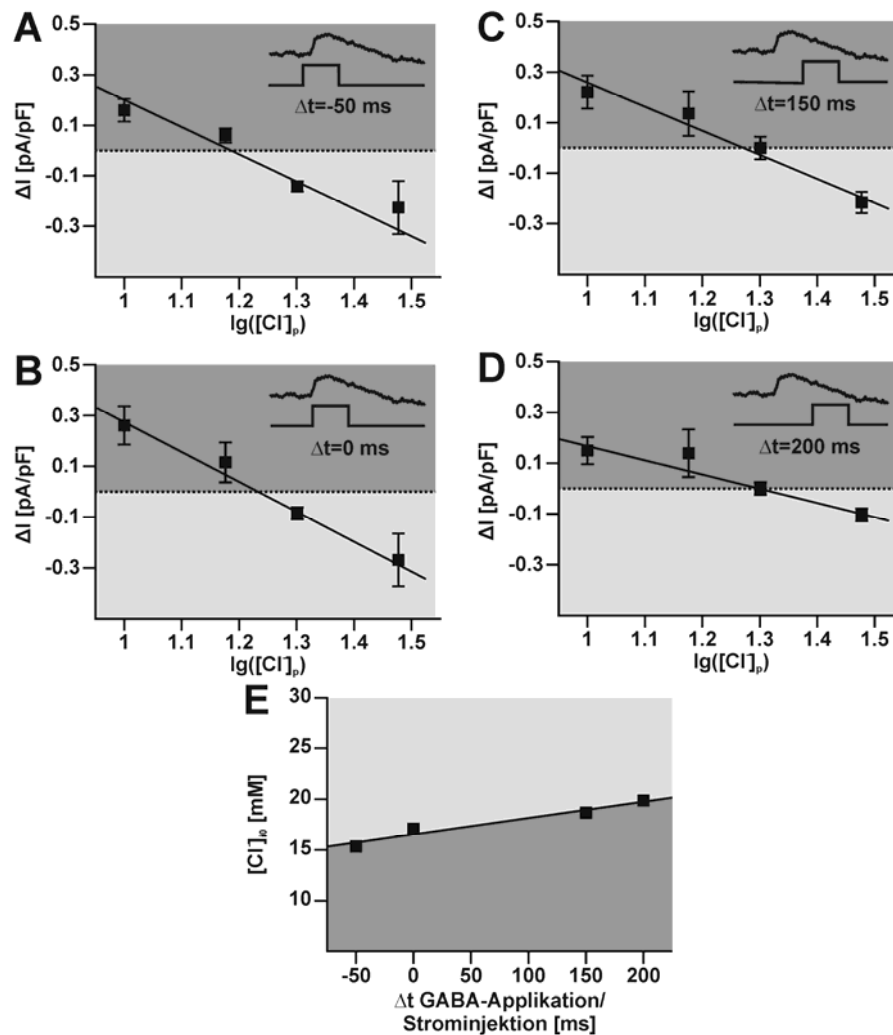
**Abb. 4.13: Einfluss von GABA auf die Aktionspotential-Schwelle**

**A** Bestimmung der Aktionspotential (AP) -Schwelle mit (geschlossene Kreise) und ohne (offene Kreise) GABA-Applikation. Der Einfluss von GABA auf die AP-Schwelle lag im Bereich der Messgenauigkeit. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SEM. Weder die Applikation von GABA noch die  $[Cl^-]_p$  hatte einen Einfluss auf die AP-Schwelle.

Die Ergebnisse zeigen, dass die GABAerge Wirkung auf erregende Eingänge in Abhängigkeit von der  $[Cl^-]_i$  entweder faszilitierend, inhibitorisch oder neutral sein kann. Die Änderung der GABAergen Wirkung vollzieht sich dabei in einem Konzentrationsbereich, der auch unter physiologischen Bedingungen erreicht werden kann. Die Aktionspotentialschwelle ist nicht abhängig von der  $[Cl^-]_i$  und wird durch GABA höchstwahrscheinlich nicht verändert.

#### 4.4.2.2 Zeitliche Auflösung der Effekte GABAerger Depolarisationen

In vorangegangene Publikationen (Gao et al., 1998; Jean-Xavier et al., 2007) wurde gezeigt, dass die GABAerge Wirkung abhängig davon ist, in welchem Zeitfenster der erregende Eingang und GABA zusammentreffen. Um zu untersuchen, ob dies auch in CR Zellen der Fall ist, wurde das oben beschriebene Protokoll so variiert, dass die Strominjektion 50 ms vor dem GABA Puls ( $\Delta_{GABA/Strom} = -50$  ms) oder in der absteigenden Flanke ( $\Delta_{GABA/Strom} = 150$  ms bzw. 200 ms) der GABAergen Depolarisation erfolgte. Die  $[Cl^-]_p$  betrug in diesen Experimenten 10, 15, 20 oder 30 mM. Die Auswertung erfolgte analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise:  $\Delta I$  wurde gegen  $[Cl^-]_p$  aufgetragen und  $[Cl^-]_{i0}$  als Abszissenabschnitt bestimmt (Abb. 4.14 A-D). Wenn der Strom 50 ms vor der GABA-Applikation injiziert wurde, betrug  $[Cl^-]_{i0} \sim 15$  mM.  $[Cl^-]_{i0}$  nahm zu, je größer  $\Delta_{GABA/Strom}$  wurde: Für  $\Delta_{GABA/Strom} = 150$  ms betrug  $[Cl^-]_{i0} \sim 19$  mM und 200 ms nach der Applikation  $\sim 20$  mM. Diese Ergebnisse ermöglichen eine Beschreibung der GABAergen Wirkung, in Abhängigkeit von der  $[Cl^-]_i$  und dem Zeitfenster, in dem der erregendem Eingang und die GABA-Applikation zusammentreffen (Abb. 4.14 E). Im Bereich der in CR Zellen physiologischen  $[Cl^-]_i$  wirkt GABA dabei immer faszilitierend. Damit sind sowohl überschwellige als auch unterschwellige GABAerge Membrandepolarisationen in CR Zellen unter phy-



**Abb. 4.14: Zeitliche Auflösung der Effekte GABAerger Depolarisationen**

**A-D** Bestimmung von  $[Cl]_{i0}$ . Die Differenz der Injektionsströme ( $\Delta I$ , normiert auf die Zellkapazität), die mit und ohne GABA zur Auslösung von Aktionspotentialen notwendig waren, wurde, wie in Abb. 4.9 gezeigt, ermittelt und gegen den  $\lg([Cl]_p)$  aufgetragen. Wird der Injektionsstrom durch GABA erhöht ( $\Delta I > 0$ ), so wirkt GABA inhibitorisch (dunkelgrau). Wird er reduziert ( $\Delta I < 0$ ), so ist GABA faszilitierend (hellgrau). Bei  $[Cl]_{i0}$  zeigt GABA keine Wirkung auf den Injektionsstrom. Hier gilt:  $\Delta I = 0$ . Die Strominjektion erfolgte in verschiedenen Phasen der GABAergen Antwort (s. Messspuren): vor der Membrandepolarisation ( $\Delta t = -50$  ms, **A**), im Peak ( $\Delta t = 0$  ms, **B**) und in der absteigenden Flanke ( $\Delta t = 150$  und  $200$  ms, **C** und **D**). Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n \geq 6$ . **E** Die Auftragung von  $[Cl]_{i0}$  gegen  $\Delta t$  verdeutlicht: Je später die Strominjektion in Bezug auf die GABAerge Antwort erfolgt, desto höher muss die  $[Cl]_p$  sein, damit GABA faszilitierend wirkt.

siologischen Bedingungen exzitatorisch. Im Bereich 15 – 20 mM kann GABA erregende Eingänge sowohl schwächen als auch stärken, abhängig vom Zeitfenster: Je später der erregende Reiz im Bezug zum GABAergen Eingang erfolgt, desto höher muss die  $[Cl^-]_i$  sein, um eine faszilitierende Wirkung zu erreichen.

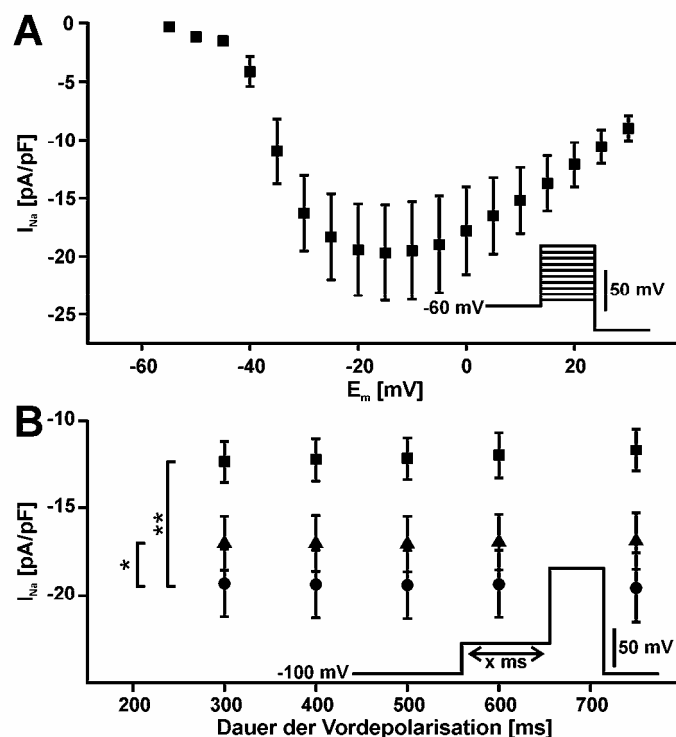
#### **4.4.3 Mechanismen inhibitorischer GABAerger Membrandepolarisationen**

Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente zeigen, dass depolarisierende GABAerge Membranantworten in CR Zellen eine inhibitorische Wirkung haben können. Eine derartige Inhibition kann über zwei Mechanismen erfolgen: Zum einen kann die GABAerge Depolarisation spannungsabhängige Ionenkanäle, die zur Auslösung von Aktionspotentialen beitragen, inaktivieren oder ihre Öffnungskinetik beeinflussen. Zum anderen wird die postsynaptische Membranleitfähigkeit durch die Öffnung von GABA-Rezeptoren erhöht und damit die Membranantwort auf synaptische Eingänge oder Strominjektion erheblich reduziert (*shunting inhibition*) (Edwards, 1990). Ob der inhibitorischen Wirkung depolarisierender GABAerger Membranantworten in CR Zellen eine Beeinflussung spannungsabhängiger Ionenkanäle zu Grunde liegt, wird im Folgenden untersucht.

##### **4.4.3.2 Beitrag spannungsaktivierter $Na^+$ -Kanäle an der inhibitorischen Wirkung depolarisierender GABAerger Membranantworten**

Da die GABAerge Depolarisation spannungsabhängige Ionen-Kanäle inaktivieren könnte, wurden die Eigenschaften spannungsaktivierter  $Na^+$ -Kanäle in CR Zellen untersucht. Alle Experimente wurden in *whole cell* Messungen mit einer  $[Cl^-]_p$  von 30 mM durchgeführt. Um das

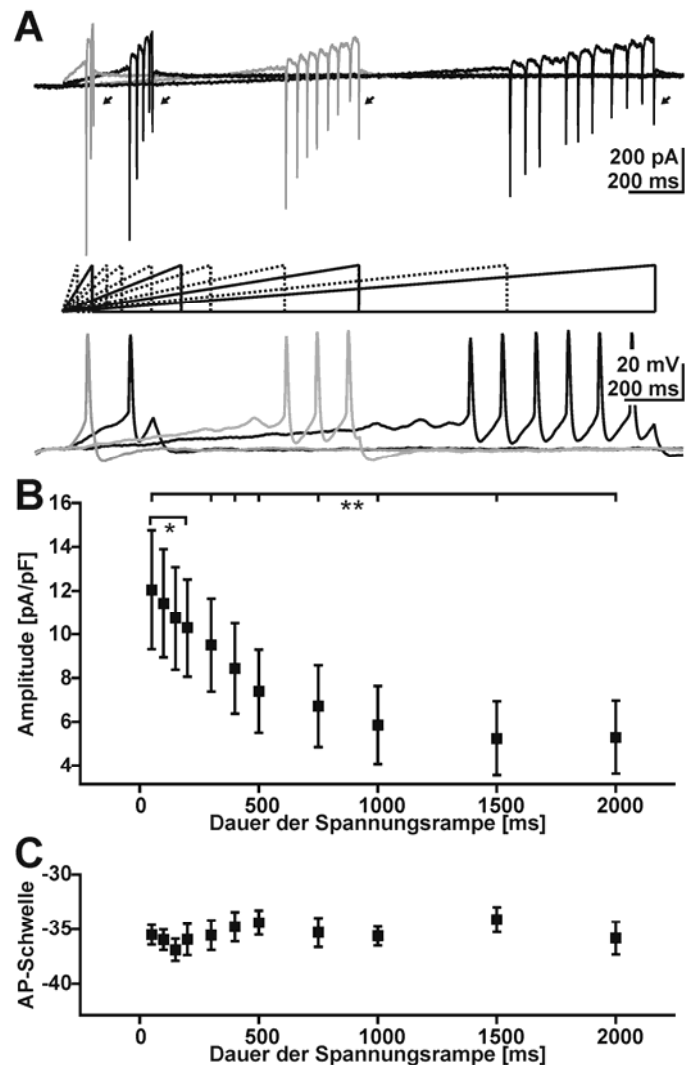
Öffnungsverhalten im Ruhezustand der Zelle zu untersuchen, wurde die Aktivierungskurve ausgehend vom RMP (-60 mV) ermittelt. Maximale Aktivierung wurde durch einen Spannungssprung auf -15 mV erzielt. Die Stromdichte betrug  $19,7 \pm 4,1$  pA/pF ( $n=12$ ; Abb. 4.15 A). Aufgrund der hohen Zeitkonstante unreifer Neuronenmembranen, konnte schnelles Inaktivierungs-



**Abb. 4.15: Eigenschaften von spannungsabhängigen Na<sup>+</sup>-Kanälen in CR Zellen**

**A** Aktivierungskurve spannungsabhängiger Na<sup>+</sup>-Kanäle in CR Zellen. Ausgehend von einem Haltepotential von -60 mV wurden in *whole cell* Messungen mit  $[Cl^-]_p$  von 30 mM die Zellen auf verschiedene Potentiale depolarisiert (-55 bis +30 mV, 5 mV Schritte) und der resultierende Einstrom gemessen. Im Anschluss an die Depolarisation wurde die Zelle auf -100 mV geklemmt, um die Na<sup>+</sup>-Kanäle wieder zu aktivieren. Na<sup>+</sup>-Kanäle wurden durch einen Spannungssprung auf -15 mV maximal aktiviert (Stromdichte:  $19,7 \pm 4,1$  pA/pF,  $n=12$ ). **B** Inaktivierungsverhalten spannungsabhängiger Na<sup>+</sup>-Kanäle. Gemessen wurde der Einstrom, der nach einer Depolarisation der Zellen auf Potentiale von -60 mV (Kreise), -50 mV (Dreiecke) oder -40 mV (Quadrate) für 300 bis 750 ms, durch einen Spannungssprung auf -15 mV hervorgerufen wurde. Die Stromdichte wurde durch die Depolarisation auf -50 bzw. -40 mV signifikant um 22 % ( $I_{50}=17,0 \pm 1,5$  pA/pF;  $p=0,04$ ;  $n=7$ ) bzw. 36 % ( $I_{40}=12,4 \pm 1,2$  pA/pF;  $p=0,02$ ;  $n=7$ ) reduziert, verglichen mit der Stromdichte, die ausgehend von -60 mV ausgelöst wurde ( $I_{60}=19,3 \pm 1,9$  pA/pF;  $n=7$ ). Nach 300 ms hatte die Inaktivierung bereits *steady state* Niveau erreicht, so dass eine Verlängerung der Depolarisation die Stromdichte nicht mehr beeinflusste.

verhalten (schneller als  $\sim 200$  ms) mit unseren Methoden nicht untersucht werden. Deshalb wurde die Inaktivierung nach langer Vordepolarisation bestimmt. Dazu wurden die Zellen für 300 bis 750 ms auf Potentiale von -60, -50 oder -40 mV geklemmt und der nach einem Spannungssprung auf -15 mV resultierende Einstrom gemessen. Eine Vordepolarisation der Zelle auf -50 bzw. -40 mV für 300 ms reduzierte die Stromdichte signifikant auf 88 % ( $I_{50}=17,0 \pm 1,5$  pA/pF;  $p=0,04$ ;  $n=7$ ) bzw. 64 % ( $I_{40}=12,4 \pm 1,2$  pA/pF;  $p=0,02$ ;  $n=7$ ) verglichen mit der Stromdichte, die ausgehend vom RMP (-60 mV) ausgelöst wurde ( $I_{60}=19,3 \pm 1,9$  pA/pF;  $n=7$ ). Nach 300 ms hatte die Inaktivierung bereits *steady state* Niveau erreicht, so dass eine Verlängerung der Vordepolarisation die Stromdichte nicht mehr beeinflusste (Abb. 4.15 B). Um detaillierte Informationen über das Inaktivierungsverhalten spannungsaktivierter  $\text{Na}^+$ -Kanäle zu bekommen, wurden die Zellen durch Spannungsrampen unterschiedlicher Steigung innerhalb von 50 bis 2000 ms ausgehend vom RMP auf -20 mV depolarisiert (Abb. 4.16 A). Ob  $\text{Na}^+$ -Kanäle durch diese Art der Depolarisation inaktiviert werden und ob die Geschwindigkeit der Depolarisation das Ausmaß der Inaktivierung beeinflusst, wurde durch die Messung der Amplitude des ersten durch die Rampe ausgelösten Einwärtsstroms untersucht. Die Amplitude wurde kleiner, je langsamer die Spannungsänderung war: Wurde innerhalb von 50 ms auf -20 mV depolarisiert, so betrug die Amplitude  $12,0 \pm 2,7$  pA/pF; erfolgte die Depolarisation innerhalb von 2000 ms, so war die Amplitude signifikant auf  $5,3 \pm 1,7$  pA/pF reduziert ( $p=0,003$ ;  $n=11$ ; Abb. 4.16 B). Dies zeigt, dass die Anzahl der zum Einwärtsstrom beitragenden Kanäle aufgrund von Inaktivierung reduziert ist. Eine verringerte Anzahl aktivierbarer  $\text{Na}^+$ -Kanälen könnte zu einer Verschiebung der Aktionspotentialschwelle führen. Deshalb wurden die Rampenexperimente ebenfalls im *current clamp* Modus durchgeführt. Ausgehend vom RMP wurde die maximal injizierte Stromstärke so justiert, dass durch die 50 ms lange Rampe ein Aktionspotential ausgelöst wurde (Abb. 4.16 A). Für jede Rampe wurde die Aktionspotentialschwelle des



**Abb. 4.16 Einfluss der Inaktivierung von Na<sup>+</sup>-Kanälen auf die Auslösung von Aktionspotentialen**

**A** Messungen zur Bestimmung des Inaktivierungsverhaltens spannungsabhängiger Na<sup>+</sup>-Kanäle in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Membrandepolarisation. Die Zellen wurden durch die Injektion von Stromrampen innerhalb von 50 bis 2000 ms depolarisiert (mitte). In *voltage clamp* Experimenten (oben) wurden die Zellen auf -20 mV depolarisiert (Pfeile kennzeichnen das kapazitive Artefakt), während in *current clamp* Messungen (unten) die injizierte Stromstärke so angepasst wurde, dass die 50 ms-Rampe ein Aktionspotential auslöste. **B** Die Amplitude des ersten in *voltage clamp* Messungen ausgelösten Einstroms wurde durch die Dauer der Stromrampe signifikant ( $p=0,003$ ,  $n=11$ ) beeinflusst. Je langsamer die Depolarisation, desto kleiner der Einstrom (50 ms:  $12,0 \pm 2,7$  pA/pF; 2000 ms:  $5,3 \pm 1,7$  pA/pF). **C** Obwohl die in **B** gezeigte Reduktion des Einstroms auf eine Inaktivierung von Na<sup>+</sup>-Kanälen schließen lässt, war die Aktionspotentialschwelle in *current clamp* Messungen unabhängig von der Geschwindigkeit der Membrandepolarisation ( $p=0,7$ ;  $n=4$ ).

ersten ausgelösten Aktionspotentials bestimmt. Die Aktionspotentialschwelle war nicht abhängig von der Depolarisationsgeschwindigkeit (50 ms:  $-35,5 \pm 0,9$  mV; 2000 ms:  $-35,8 \pm 1,5$  mV;  $p=0,7$ ;  $n=4$ ; Abb. 4.16 C).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse eine spannungsabhängige Inaktivierung von  $\text{Na}^+$ -Kanälen in CR Zellen, wobei das Ausmaß der Inaktivierung von der Depolarisationsgeschwindigkeit abhängt. Die Inaktivierung spannungsgesteuerter  $\text{Na}^+$ -Kanäle verändert dabei die Aktionspotentialschwelle nicht signifikant. Wahrscheinlich trägt die Inaktivierung von Ionen-Kanälen durch GABAerge Depolarisation nur unwesentlich zur inhibitorischen Wirkung depolarisierender GABAerger Antworten bei. Die inhibitorische Wirkung ist höchstwahrscheinlich überwiegend auf eine Reduktion des Eingangswiderstandes zurück zu führen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Die native $[Cl^-]_i$ in CR Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Kilb et al., 2002) gezeigt, dass die  $[Cl^-]_i$  in CR Zellen im Ruhezustand  $\sim 30$  mM beträgt. Eine hohe  $[Cl^-]_i$  ist charakteristisch für unreife Neuronen des zentralen Nervensystems. Mit Hilfe der auch in dieser Arbeit angewandten Gramicidin *perforated patch* Methode wurde in unreifen Neuronen des zerebralen Kortex (Owens et al., 1996; Yamada et al., 2004), des Hippocampus (Sipila et al., 2006), des Hirnstammes (Kakazu et al., 1999), des Hypothalamus (Gao & van den Pol, 2001), des Rückenmarks (Rohrbough & Spitzer, 1996) und der Retina (Zhang et al., 2006) eine  $[Cl^-]_i$  zwischen 20 – 40 mM ermittelt. Ähnliche Werte wurden mit Hilfe nicht invasiver mikrofluorimetrischer Methoden bestimmt (Shimizu-Okabe et al., 2002; Ikeda et al., 2003).

Die native  $[Cl^-]_i$  in CR Zellen ist deutlich höher als die unter den gegebenen Versuchsbedingungen durch eine passive  $Cl^-$ -Verteilung zu erwartenden 13,4 mM (s. 3.2.6). Um  $[Cl^-]_i$  zu ermöglichen, die von der passiven  $Cl^-$ -Verteilung abweichen, muss  $Cl^-$  aktiv transportiert werden (Rohrbough & Spitzer, 1996; Payne *et al.*, 2003), wenn  $Cl^-$  nicht während Phasen der Membrandepolarisation intrazellulär akkumuliert (Titz et al., 2003). Aktive  $Cl^-$ -Akkumulation kann über  $Na^+$ -abhängigen  $K^+$ - $Cl^-$ -Cotransport erfolgen (Ballanyi & Grafe, 1985; Alvarez-Leefmans *et al.*, 1988), der durch den  $Na^+$ - $K^+$ - $Cl^-$ -Cotransporter vermittelt wird (Delpire, 2000). Der Transporter wird in der Isoform 1 (NKCC1) in weiten Teilen des unreifen Gehirns exprimiert (Plotkin et al., 1997; Clayton et al., 1998; Li et al., 2002). Der NKCC1-vermittelte  $Cl^-$ -Transport nutzt die Triebkraft für  $Na^+$ , um  $Cl^-$  zu transportieren, und ist durch die Schleifendiuretika Bumetanid und Furosemid blockierbar

(Russell, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die  $[Cl^-]_i$  in CR Zellen durch die Entfernung von extrazellulärem  $Na^+$  und durch die Inkubation mit Bumetanid (Bedingungen also, unter denen NKCC1 vermittelter  $Cl^-$ -Transport blockiert ist) signifikant gesenkt wird. Ähnliches konnte für eine Vielzahl anderer neuronaler Zelltypen gezeigt werden (Kakazu *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2004; Brumback & Staley, 2008; Sipila *et al.*, 2006; Sun & Murali, 1999). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunohistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen NKCC1 und Reelin, einem Marker für CR Zellen (D'Arcangelo *et al.*, 1997), zeigten, dass NKCC1 in CR Zellen und anderen, Reelin-negativen Zelltypen der Marginalzone exprimiert wird. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass ein NKCC1-vermittelter  $Cl^-$ -Akkumulationsprozess zur Aufrechterhaltung der hohen  $[Cl^-]_i$  in CR Zellen beiträgt.

## **5.2 Der $Cl^-$ -Akkumulationsprozess in CR Zellen**

Aus Untersuchungen der nativen  $[Cl^-]_i$  lässt sich nicht ableiten, in welchem Maße der NKCC1-vermittelte  $Cl^-$ -Transport neben NKCC1 unabhängigen  $Cl^-$ -Akkumulationsmechanismen (Balakrishnan *et al.*, 2003; Titz *et al.*, 2003) an der Regulation der  $Cl^-$ -Homöostase beteiligt ist und mit welcher Geschwindigkeit die Zelle auf Änderungen der  $[Cl^-]_i$  reagieren kann. Deshalb wurde untersucht, wie schnell sich die  $[Cl^-]_i$  nach massiver Reduktion erholt und welche pharmakologischen Eigenschaften dieser Erholungsprozess zeigt. Die  $[Cl^-]_i$  wurde durch ein Entladungsprotokoll gesenkt, mit dessen Hilfe die  $[Cl^-]_i$  auf 6 mM, also unter die durch passive  $Cl^-$ -Verteilung zu erwartende  $[Cl^-]_i$  von 13,4 mM, reduziert wurde. Erst nach ~ 15 min erreichte die  $[Cl^-]_i$  wieder das Ausgangsniveau.

Die Erholung der  $[Cl^-]_i$  beruht auf zwei simultan ablaufenden Prozessen: passiven  $Cl^-$ -Strömen, angetrieben durch den elektrochemischen Gradienten für  $Cl^-$ , und aktivem  $Cl^-$ -Transport. Der Erholungsprozess lässt sich in zwei Phasen unterteilen. Bis zum Erreichen der passiven  $Cl^-$ -Verteilung bei einer  $[Cl^-]_i$  von 13,4 mM sind passive und aktive  $Cl^-$ -Ströme gleichgerichtet und tragen beide zur  $Cl^-$ -Akkumulation bei. Während der Erholung der  $[Cl^-]_i$  über 13,4 mM hinaus sind passive und aktive Prozesse entgegengerichtet. Das heißt, dass  $Cl^-$  weiterhin aktiv akkumuliert wird, durch passive  $Cl^-$ -Leitfähigkeiten aber aus der Zelle hinaus diffundiert. In der ersten Phase der Erholung ist die Akkumulationsrate also als Summe zweier Prozesse aufzufassen, in der zweiten Phase als Differenz.

Bei einer  $[Cl^-]_i$  von 13,4 mM existiert keine Triebkraft für passive  $Cl^-$ -Ströme. Die Änderung der  $[Cl^-]_i$  bei dieser Konzentration beruht demnach nur auf aktiven Transportprozessen. In der vorliegenden Arbeit wurde bei einer  $[Cl^-]_i$  von 13,4 mM eine  $Cl^-$ -Akkumulationsrate von 47  $\mu M/s$  bestimmt. Unter der Annahme eines Zellvolumens von 4,2 pl (Abschätzung des Zellvolumens als Volumen kugelförmiger Zellen mit einem Durchmesser von 20  $\mu m$ ), errechnet sich eine  $Cl^-$ -Transportgeschwindigkeit von  $\sim 1,2 \times 10^8$  Ionen/s. Die geringe Geschwindigkeit des  $Cl^-$ -Einstroms erklärt den langsamen Erholungsprozess der  $[Cl^-]_i$  nach der Entladung und deutet auf eine niedrige Transportkapazität der  $Cl^-$ -Akkumulation in CR Zellen hin.

In der Gegenwart von Bumetanid erholte sich die  $[Cl^-]_i$  langsamer und nur teilweise. Es wurde eine Endkonzentration von 13,4 mM erreicht, also genau die Konzentration, die sich durch passive  $Cl^-$ -Verteilung einstellen würde. Dies zeigt, dass die Erholung der  $[Cl^-]_i$  in der Gegenwart von Bumetanid ausschließlich durch passive  $Cl^-$ -Ströme getragen wird und aktiver  $Cl^-$ -Transport in CR Zellen durch Bumetanid vollständig geblockt werden kann. Die  $Cl^-$ -Akkumulation wurde darüber hinaus auch durch die Entfernung von

extrazellulärem  $\text{Na}^+$  vollständig blockiert (s.u.). Die vorliegenden Daten zeigen, dass NKCC1-abhängige  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation in CR Zellen wahrscheinlich den einzigen Mechanismus darstellt, um die hohe  $[\text{Cl}^-]_i$  einzustellen und aufrecht zu erhalten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein passiver  $\text{Cl}^-$ -Einstrom während Phasen der Depolarisation zur  $\text{Cl}^-$ -Homöostase in CR Zellen beiträgt (Titz et al., 2003), aber die Ergebnisse dieser Untersuchung, durchgeführt bei konstantem Membranpotential, zeigen eindeutig, dass die hohe  $[\text{Cl}^-]_i$  ausschließlich durch NKCC1-abhängige  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation erreicht wird. Die native  $[\text{Cl}^-]_i$  wird dabei vermutlich durch ein Gleichgewicht zwischen NKCC1-abhängiger  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation und passivem  $\text{Cl}^-$ -Verlust determiniert.

In Übereinstimmung mit der geringen Transportkapazität der  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation in CR Zellen, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit von CR Zellen ebenfalls gering ist. Aus der Abnahme der  $[\text{Cl}^-]_i$ , die nach Blockade der NKCC1-abhängigen  $\text{Cl}^-$ -Akkumulationsprozesse durch Bumetanid auftrat, wurde bei nativer  $[\text{Cl}^-]_i$  eine Geschwindigkeit des  $\text{Cl}^-$ -Verlust von  $\sim 0,5 \times 10^8$  Ionen/s berechnet. Ein Vergleich der  $\text{Cl}^-$ -Verlustgeschwindigkeit mit der Geschwindigkeit der  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation zeigt, dass der aktive  $\text{Cl}^-$ -Transport in CR Zellen schnell genug ist, um passive  $\text{Cl}^-$ -Verluste auszugleichen.

Über die Geschwindigkeit des  $\text{Cl}^-$ -Verlustes wurde eine  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit in CR Zellen von  $\sim 430$  pS errechnet. Da die  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit in CR Zellen gering ist, fallen Änderungen der  $[\text{Cl}^-]_i$  durch die Messmethode stark ins Gewicht. Deshalb wurde berechnet, welchen Anteil GABAerge Ströme, die zur Bestimmung von  $E_{\text{GABA}}$  ausgelöst werden mussten, am  $\text{Cl}^-$ -Verlustes haben. Die Berechnungen ergaben, dass etwa 10-20 % des  $\text{Cl}^-$ -Verlustes auf GABAerge  $\text{Cl}^-$ -Ströme zurückzuführen sind. Der überwiegende Teil der Ionen diffundiert also unabhängig vom Messvorgang aus der Zelle hinaus.

Pharmakologische Experimente, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, um in CR Zellen exprimierte Cl<sup>-</sup>-Kanäle zu identifizieren, stützen den Befund, dass CR Zellen eine geringe Leitfähigkeit für Cl<sup>-</sup> aufweisen. Sie zeigten, dass die Leitfähigkeit von ligandenaktivierten Cl<sup>-</sup>-Kanälen, die durch Gabazin und Strychnin blockiert wurden, und nicht ligandenaktivierten Cl<sup>-</sup>-Kanälen, die durch 9-AC und DIDS blockiert wurden, in CR Zellen lediglich ~ 132 bzw. ~ 64 pS beträgt. Auch wenn nicht auszuschließen ist, dass in CR Zellen Cl<sup>-</sup>-Kanäle exprimiert werden, die durch die verwendeten Pharmake nicht blockiert und somit nicht detektiert wurden, ist die Gesamtleitfähigkeit für Cl<sup>-</sup>, die sich aus diesen Experimenten ergibt, gering.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die hohe native [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> in CR Zellen durch NKCC1-vermittelte Cl<sup>-</sup>-Akkumulation erklärt werden kann. NKCC1-abhängiger Cl<sup>-</sup>-Transport stellt vermutlich den einzigen Mechanismus der Cl<sup>-</sup>-Akkumulation in CR Zellen dar. Die Kapazität des Cl<sup>-</sup>-Transportes ist gering, aber ausreichend, um passive Cl<sup>-</sup>-Verluste auszugleichen. Die geringe Transportkapazität der NKCC1-abhängigen Cl<sup>-</sup>-Akkumulation könnte reflektieren, dass die Frequenz synaptischer GABAerger Eingänge in CR Zellen unter physiologischen Bedingungen bei nur 0,005 bis 1,02 Hz liegt (Kilb & Luhmann, 2001; Chan & Yeh, 2003; Soda *et al.*, 2003) und somit unter Ruhebedingungen kein effektives Cl<sup>-</sup>-Akkumulationssystem benötigt wird. In unreifen Neuronen des Hippocampus, in denen GABAerge synaptische Eingänge mit einer Frequenz von ~2,4 Hz auftreten (Hosokawa *et al.*, 1994), wurde folgerichtig auch eine schnellere NKCC1-abhängige Cl<sup>-</sup>-Akkumulation mit einer Maximalgeschwindigkeit von ~1,6 mM/s gezeigt (Brumback & Staley, 2008).

### 5.3 Cl<sup>-</sup>-Auswärtstransport in CR Zellen

In Na<sup>+</sup>-freier extrazellulärer Lösung erholte sich die [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, wie bereits beschrieben, nach Entladung nur teilweise auf eine Endkonzentration von ~ 9 mM und erreichte nicht die Konzentration von 13,4 mM, die sich durch passive Cl<sup>-</sup>-Verteilung einstellen würde. Dies deutet auf die Existenz eines Mechanismus hin, der Cl<sup>-</sup> aus der Zelle hinaus transportiert. Durch die Entfernung von extrazellulärem Na<sup>+</sup> könnte die Transportrichtung des NKCC1 umgekehrt werden, wie es für andere Kationen-Chlorid-Transporter bereits beschrieben wurde (Kakazu et al., 2000). NKCC1 könnte so Cl<sup>-</sup> aus der Zelle hinaus transportieren. In dieser Arbeit wurde aber gezeigt, dass eine passive Cl<sup>-</sup>-Verteilung der [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> in Na<sup>+</sup>-freier extrazellulärer Lösung auch in der Gegenwart von Bumetanid nicht erreicht wird und der Erholungsprozess unverändert bleibt. Der mutmaßliche Cl<sup>-</sup>-Auswärtstransport kann also nicht durch NKCC1 vermittelt werden, der unter diesen Bedingungen blockiert ist. Bumetanid blockt nicht nur NKCC1 sondern auch den K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-Cotransporter KCC2, der bei physiologischem K<sup>+</sup>-Gradienten Cl<sup>-</sup> aus der Zelle hinaus transportiert (Russell, 2000). Deshalb zeigt der Befund, dass Bumetanid die [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> in Na<sup>+</sup>-freier Lösung nicht beeinflusst, ebenfalls, dass in CR Zellen kein KCC2 vermittelter Cl<sup>-</sup>-Auswärtstransport stattfindet.

Das Entfernen von extrazellulärem Na<sup>+</sup> beeinflusst nicht nur den NKCC1-abhängigen Cl<sup>-</sup>-Akkumulationsprozess, sondern auch andere Na<sup>+</sup>-abhängige Transporter, darunter den Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher (Aronson, 1985). Dessen Blockade führt zu einer intrazellulären Übersäuerung, durch die die [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]<sub>i</sub> reduziert wird. Die Reduktion der [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]<sub>i</sub> aktiviert in unreifen Neuronen Anionenaustauscher, die HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in die Zelle herein und Cl<sup>-</sup> im Gegenzug aus der Zelle hinaus transportieren (Sterling & Casey, 2002). Die Aktivierung dieser Anionenaustauscher stellt eine Möglichkeit dar, den Cl<sup>-</sup>-

Auswärtstransport, der in  $\text{Na}^+$ -freier extrazellulärer Lösung beobachtet wird, zu erklären.

Diese Form des  $\text{Cl}^-$ -Auswärtstransports ist unter physiologischen Bedingungen nicht aktiv, so dass CR Zellen wahrscheinlich kein effektives System exprimieren, das  $\text{Cl}^-$  unter Ruhebedingungen aus der Zelle hinaus transportiert.

#### **5.4 Effekte von GABA in CR Zellen**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die fokale Applikation von GABA in fast allen CR Zellen aufgrund der hohen nativen  $[\text{Cl}^-]_i$  exzitatorisch ist. NKCC1-abhängige  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation ist dabei notwendig, um die exzitatorische Wirkung von GABA zu gewährleisten. Die geringe Kapazität des  $\text{Cl}^-$ -Transportsystems war ausreichend, um bei niederfrequenter Stimulation von CR Zellen durch repetitive GABA-Applikation eine hohe  $[\text{Cl}^-]_i$  aufrecht zu erhalten und GABAerge Exzitation zu ermöglichen. Bei höherer Stimulationsfrequenz wurde die Transportkapazität des NKCC1-abhängigen Akkumulationsprozesses überschritten, so dass  $[\text{Cl}^-]_i$  und damit die Amplitude GABAerger Antworten sukzessive abnahm. GABA induzierte unter diesen Bedingungen zwar eine Membrandepolarisation, löste aber keine Aktionspotentiale mehr aus. Massive und lang anhaltende GABAerge Erregung führt also bedingt durch die geringe  $\text{Cl}^-$ -Transportkapazität lediglich zu einer transienten Auslösung von Aktionspotentialen in CR Zellen. Dieser Befund wird bestätigt durch eine Arbeit, in der mit Hilfe von *cell attached* Messungen an CR Zellen gezeigt werden konnte, dass länger andauernde Applikation von GABA zu einer transienten Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz in CR Zellen führt (Mienville, 1998).

Unterschwellige GABAerge Membrandepolarisationen können parallel eintreffende erregende Reize in Abhängigkeit von der  $[Cl^-]_i$  und dem Zeitfenster, in dem Reiz und GABAerge Membrandepolarisation aufeinander treffen, faszilitieren oder inhibieren (Gao *et al.*, 1998; Jean-Xavier *et al.*, 2007; Gullledge & Stuart, 2003). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Wirkung depolarisierender unterschwelliger GABA-Antworten in CR Zellen zeigten, dass zeitnah eintreffende erregende Reize bei  $[Cl^-]_i$  über 20 mM während der gesamten GABAergen Membrandepolarisation faszilitiert werden und GABA exzitatorisch ist. Bei einer  $[Cl^-]_i$  von 10 mM waren depolarisierende GABA-Antworten während der gesamten GABAergen Membrandepolarisation inhibitorisch. Bei  $[Cl^-]_i$  zwischen 10 und 20 mM, einem Konzentrationsbereich, der durch repetitive Stimulation in CR Zellen erreicht werden kann (die Abnahme der GABAergen Depolarisation auf -54 mV entspricht einer Reduktion der  $[Cl^-]_i$  auf ~12,5 mM), war die Wirkung von GABA abhängig vom Zeitfenster, in dem der erregende Reiz eintraf. Je später der erregende Reiz mit der GABAergen Membrandepolarisation zusammentraf, desto höher musste die  $[Cl^-]_i$  sein, um eine faszilitierende Wirkung zu erreichen. Das heißt, dass während der abnehmenden Phase der GABAergen Membrandepolarisation in CR Zellen die inhibitorische Wirkung stärker ausgeprägt ist als während der maximalen GABAergen Membrandepolarisation. Dies steht im Gegensatz zu anderen Arbeiten, die zeigen, dass die inhibitorische Wirkung GABAerger Membrandepolarisationen in unreifen Neuronen des Rückenmarks und des Hypothalamus überwiegend in der Nähe des Maximums der Depolarisation zu finden ist. In der abnehmenden Phase der GABAergen Membrandepolarisation werden hingegen faszilitierende Effekte beschrieben (Gao *et al.*, 1998; Jean-Xavier *et al.*, 2007). Dies deutet darauf hin, dass sich GABAerge Inhibition und GABAerge Exzitation in CR Zellen anders zueinander verhalten, als in den oben beschriebenen Neuronen.

Zwei Mechanismen können der inhibitorischen Wirkung GABAerger Membrandepolarisationen zu Grunde liegen: eine Verschiebung der Aktionspotentialschwelle, bedingt durch eine Änderung der Offenwahrscheinlichkeit bzw. Verfügbarkeit aktivierbarer spannungsabhängiger Ionenkanälen, und die Erhöhung der postsynaptischen Membranleitfähigkeit durch die Öffnung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Edwards, 1990). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Hinweis auf eine Verschiebung der Aktionspotentialschwelle in CR Zellen durch Membrandepolarisationen gefunden werden. Die inhibitorische Wirkung GABAerger Membrandepolarisationen in CR Zellen beruht also wahrscheinlich ausschließlich auf der Reduktion des Eingangswiderstandes durch die Öffnung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. Die GABAerge Wirkung in CR Zellen setzt sich somit zusammen aus einer erregenden Komponente, der Membrandepolarisation, und einer hemmenden Komponente, der Reduktion des Eingangswiderstandes. Die dominierende Komponente determiniert die GABAerge Wirkung (Staley & Mody, 1992). In unreifen Neuronen des Rückenmarks wurde gezeigt, dass die GABAerge Membrandepolarisation länger anhaltend ist als die Reduktion des Eingangswiderstandes, so dass in der abnehmenden Phase der GABAergen Membrandepolarisation die faszilitierende Wirkung überwiegt (Jean-Xavier et al., 2007). In CR Zellen überwiegt in der abnehmenden Phase der GABAergen Membrandepolarisation offenbar die Reduktion des Eingangswiderstandes, während die erregende Membrandepolarisation im Bereich der maximalen GABAergen Membrandepolarisation dominiert.

Aufgrund der geringen Transportkapazität der NKCC1-abhängigen Cl<sup>-</sup>-Akkumulation unterliegt die GABAerge Wirkung in CR Zellen einer großen Variabilität. Je nach vorangegangener Aktivität der Zelle kann GABA exzitatorisch oder inhibitorisch sein und zeitgleich eintreffende Reize verstärken oder hemmen.

Die physiologische Relevanz dieses Befundes kann durch artifizielle GABA-Applikation nicht geklärt werden. In CR Zellen der Maus werden aber Aktivitätsmuster beschrieben, die auf GABAerger Neurotransmission beruhen und transienten Charakter haben. So wird durch Carbachol-induzierte Netzwerkaktivität (Dupont et al., 2006) eine massive Zunahme der Frequenz GABAerger synaptischer Eingänge hervorgerufen. *Perforated patch* Messungen zeigten, dass synaptische GABAerge Eingänge in der Anfangsphase der gesteigerten Aktivität Aktionspotentiale auslösen. Im weiteren Verlauf der Carbachol-induzierten Netzwerkaktivität werden die synaptischen GABAergen Eingänge unterschwellig (Hügel, Achilles und Kilb; vorläufige Ergebnisse). In  $Mg^{2+}$ -freier extrazellulärer Lösung wurden in CR Zellen synchronisierte GABAerge Aktivitätsmuster beschrieben, die  $\sim 2$  s dauerten und mit einer Frequenz von 0,01 Hz auftraten (Soda et al., 2003). Der transiente Charakter der beschriebenen Aktivitätsmuster könnte durch eine limitierte Kapazität der  $Cl^-$ -Akkumulation erklärt werden, die bei massiver Erregung zu einem Übergang von exzitatorischen zu depolarisierenden GABA-Antworten führt.

### **5.5 $Cl^-$ -Akkumulation und die Regulation von Netzwerkaktivität**

Ein  $Cl^-$ -Akkumulationssystem mit geringer Transportkapazität könnte Netzwerkaktivität im unreifen Gehirn folgendermaßen modulieren: Durch massive GABAerge Aktivität, die die Kapazität des Transportsystems übersteigt, wird die  $[Cl^-]_i$  so stark gesenkt, dass die ursprünglich exzitatorische Wirkung von GABA inhibitorisch wird. Erst nachdem die native  $[Cl^-]_i$  wieder hergestellt ist, kann GABA von neuem eine Erregung auslösen. Über diesen Mechanismus wäre Netzwerkaktivität an- und abschaltbar. Durch den

Übergang zu einer inhibitorischen Wirkung GABAerge Depolarisationen würde zudem einer toxischen Übererregung vorgebeugt (Ben-Ari, 2002a).

Spontane Netzwerkaktivität wird in vielen Regionen des unreifen Gehirns beschrieben, beispielsweise im Hippocampus, im Neocortex, der Retina und dem Rückenmark. Sie bildet die Grundlage für die Bildung funktioneller Synapsen (Penn & Shatz, 1999). Nicht nur in CR Zellen werden dabei Aktivitätsmuster beschrieben, die durch eine limitierte Kapazität der  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation erklärt werden könnten. Die Spontanaktivität unreifer Neurone des Rückenmarks von Hühnern wird überwiegend von GABA und Glycin getragen und besteht aus Episoden massiver Erregung, die etwa 60 s andauern. Während der darauf folgenden 10 - 15 min kann keine Spontanaktivität mehr registriert werden – die Zellen befinden sich in einem refraktären Zustand (Fedirchuk et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass  $[\text{Cl}^-]_i$  nach den Episoden massiver Erregung signifikant reduziert ist. Es wird davon ausgegangen, dass der refraktären Phase langsame  $\text{Cl}^-$  Umverteilungsprozesse zu Grunde liegen (Chub & O'Donovan, 2001). Die spontane Netzwerkaktivität dieses Zellverbandes wurde durch Simulationen rekonstruiert, in denen langsame Fluktuationen der  $[\text{Cl}^-]_i$  ein wesentliches Element darstellen (Marchetti et al., 2005).

Die spontane Netzwerkaktivität in unreifen Neuronen des Hippocampus besteht aus Membrandepolarisationen, die etwa 300 ms anhalten und mit massiver Erregung einhergehen. Sie werden GDPs (giant depolarizing potentials) genannt und treten mit einer Frequenz von 0,1 Hz auf (Ben-Ari, 2002). GDPs entstehen in einem Netzwerk, in das hunderte GABAerger Interneurone und glutamaterger Pyramidenzellen involviert sind. Es werden mehrere Mechanismen diskutiert, die der Entstehung von GDPs zu Grunde liegen könnten. In einem Ansatz wird die Synchronisation der beteiligten Zellen durch einen netzwerkinternen Rhythmus erklärt, der auf der

synergistischen Interaktion zwischen glutamatergen und GABAergen postsynaptischen Potentialen beruht (Ben-Ari et al., 1989). Das Level neuronaler Depolarisation und Exzitation während des GDPs wird dabei überwiegend durch GABAerge Synapsen und Interneurone determiniert (Ben Ari et al., 2007). GABA-Agonisten führen zu einer transienten Erhöhung der GDP-Frequenz, unterdrücken aber letztendlich die Netzwerkaktivität, vermutlich bedingt durch einen Übergang von exzitatorischen zu inhibitorischen GABAerge Membrandepolarisationen (Khalilov et al., 1999). Fluktuationen der  $[Cl^-]_i$  könnten also an der Generierung des netzwerkinternen Rhythmus beteiligt sein. Ein anderer Ansatz zur Erklärung der Entstehung von GDPs schreibt GABAergen Membrandepolarisationen aber lediglich eine faszilitierende und keine Rhythmus-gebende Funktion bei der Generierung von GDPs zu. Der netzwerkinterne Rhythmus wird hier durch die Eigenfrequenz spontaner Aktivität in Pyramidenzellen geprägt (Sipila et al., 2005). Zumindest die Aufrechterhaltung einer hohen  $[Cl^-]_i$  durch NKCC1 (Sipila et al., 2006), die depolarisierende GABAerge Antworten ermöglicht, ist in beiden Modellen essentiell.

Außer in den Arbeiten an unreifen Neuronen des Rückenmarks wurde die Bedeutung einer dynamischen  $[Cl^-]_i$  im Zusammenhang mit Netzwerkaktivität nicht explizit untersucht. Die potentielle Rolle von Fluktuationen der  $[Cl^-]_i$  bei der Generierung von Netzwerkaktivität in unreifen Neuronen stellt einen interessanten Ansatz für weiterführende Untersuchungen dar.

## **5.6 Die Bedeutung elektrischer Aktivität in CR Zellen**

Es wird postuliert, dass CR Zellen die Dendriten von Pyramidenzellen in der Marginalzone verankern. Über synaptische Kontakte sollen sie die notwendige elektrische Aktivität liefern, um die Dendriten bis zur Ausbildung ihrer

endgültigen Verknüpfungen mit Ausläufern später ankommender Neurone in ihrer Position zu halten (Marin-Padilla, 1998; Radnikow et al., 2002). Diese Aufgabe ähnelt der Funktion von CR Zellen im Hippocampus, die unter anderem als transiente Zielzellen entorhinaler Projektionen fungieren, bis diese ihre endgültigen Verknüpfungen mit Pyramiden- und Körnerzellen ausgebildet haben (Ceranik et al., 2000). Die exzitatorische Wirkung von GABA in CR Zellen könnte also dazu beitragen, die korrekte Ausbildung synaptischer Verbindungen in der Marginalzone zu ermöglichen.

Die Reelin-Sekretion in CR Zellen könnte über GABAerge Exzitation reguliert werden (Mienville, 1998). GABA wäre somit essentiell für die korrekte Ausbildung der charakteristischen Struktur des Neokortex. Dagegen spricht, dass Reelin von Neuronen des Cerebellums konstitutiv sezerniert und die Sekretion nicht über Neurotransmitter reguliert wird (Lacor et al., 2000). Bislang liegen keine Studien zur Reelin-Sekretion in unreifen Neuronen vor.

Frühe Netzwerkaktivität stellt einen entscheidenden Faktor für die Ausbildung und Festigung bzw. Elimination synaptischer Verbindungen in der neuronalen Entwicklung dar (Katz & Shatz, 1996; Penn & Shatz, 1999). In der Marginalzone wurde korrelierte Netzwerkaktivität zwischen Nicht-CR Zellen beschrieben. CR Zellen waren nicht direkt in dieses Netzwerk integriert, sollen aber über glutamaterge Projektionen die korrelierte Aktivität regulieren (Schwartz et al., 1998). CR Zellen könnten also nach Erregung durch GABA über glutamaterge Projektionen sowohl die Schichtbildung des Kortex als auch die frühe Induktion von Netzwerken beeinflussen. NKCC1-abhängige Cl<sup>-</sup>-Akkumulation, die exzitatorische GABA Antworten in CR Zellen vermittelt, wäre dafür essentiell.

## 6 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit stellen eine detaillierte Analyse der Mechanismen der Cl<sup>-</sup>-Homöostase in unreifen Neuronen des Neocortex dar. Es konnte gezeigt werden, dass die hohe native [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> in CR Zellen ausschließlich durch Bumetanid sensitiven und Na<sup>+</sup>-abhängigen aktiven Cl<sup>-</sup>-Transport aufrechterhalten wird. Diese pharmakologischen Hinweise auf eine NKCC1-abhängige Cl<sup>-</sup>-Akkumulation konnten durch den Nachweis der Expression dieses Transporters in der gesamten Marginalzone, speziell in CR Zellen, bestätigt werden.

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Daten zur Geschwindigkeit der Cl<sup>-</sup>-Akkumulation erhoben. Sie zeigten, dass die Transportgeschwindigkeit der NKCC1-abhängigen Cl<sup>-</sup>-Akkumulation gering ist, was auf eine limitierte Transportkapazität schließen lässt. Aufgrund einer äußerst geringen Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit in CR Zellen war NKCC1-abhängige Cl<sup>-</sup>-Akkumulation ausreichend, um unter Ruhebedingungen und bei niederfrequenter Stimulation eine hohe [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> zu gewährleisten. Dies bewirkte, dass GABAerge Stimulationen exzitatorisch waren. Die Cl<sup>-</sup>-Transportkapazität konnte durch höherfrequente Stimulation überschritten werden, was dazu führte, dass ursprünglich exzitatorische GABA Antworten inhibitorisch wurden.

Es wurde gezeigt, dass unter-schwellige GABAerge Membrandepolarisationen in CR Zellen parallel eintreffende erregende Reize in Abhängigkeit von der [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> und dem Zeitfenster, in dem Reiz und GABAerge Membrandepolarisation aufeinander treffen, sowohl faszilitieren als auch inhibieren können. Die Aktionspotentialschwelle wurde durch länger andauernde Membrandepolarisationen nicht beeinflusst. Die inhibitorische Wirkung von GABA beruht also nicht auf einer Verschiebung der Aktionspotentialschwelle,

sondern wird vermutlich überwiegend durch die Reduktion des Eingangswiderstandes der Zelle vermittelt.

Durch die vorliegende Arbeit wurden die Mechanismen der  $\text{Cl}^-$ -Homöostase in CR Zellen weitestgehend geklärt und deren funktionelle Konsequenzen detailliert beschrieben.

## 7 Literaturverzeichnis

Achilles, K., Okabe, A., Ikeda, M., Shimizu-Okabe, C., Yamada, J., Fukuda, A., Luhmann, H. J., & Kilb, W. (2007). Kinetic properties of Cl uptake mediated by Na<sup>+</sup>-dependent K<sup>+</sup>-2Cl cotransport in immature rat neocortical neurons. *J Neurosci.* **27**, 8616-8627.

Aguiló, A., Schwartz, T. H., Kumar, V. S., Peterlin, Z. A., Tsiola, A., Soriano, E., & Yuste, R. (1999). Involvement of Cajal-Retzius neurons in spontaneous correlated activity of embryonic and postnatal layer 1 from wild-type and reeler mice. *Journal of Neuroscience* **19**, 10856-10868.

Alvarez-Leefmans, F. J., Gamino, S. M., Giraldez, F., & Nogueron, I. (1988). Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studied with ion-selective microelectrodes. *Journal of Physiology* **406**, 225-246.

Angevine, J. B. & Sidman, R. L. (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* **192**, 766-768.

Aronson, P. S. (1985). Kinetic properties of the plasma membrane Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. *Annu.Rev.Physiol* **47**, 545-560.

Balakrishnan, V., Becker, M., Lohrke, S., Nothwang, H. G., Guresir, E., & Friauf, E. (2003). Expression and function of chloride transporters during development of inhibitory neurotransmission in the auditory brainstem. *Journal of Neuroscience* **23**, 4134-4145.

Ballanyi, K. & Grafe, P. (1985). An intracellular analysis of gamma-aminobutyric-acid-associated ion movements in rat sympathetic neurones. *J.Physiol* **365**, 41-58.

Barrett, J. N. & Crill, W. E. (1974). Specific membrane properties of cat motoneurones. *J.Physiol* **239**, 301-324.

Barry, P. H. & Lynch, J. W. (1991). Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *Journal of Membrane Biology* **121**, 101-117.

Ben Ari, Y., Gaiarsa, J. L., Tyzio, R., & Khazipov, R. (2007). GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev.* **87**, 1215-1284.

Ben Ari, Y., Khalilov, I., Represa, A., & Gozlan, H. (2004). Interneurons set the tune of developing networks. *Trends in Neuroscience* **27**, 422-427.

Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience* **3**, 728-739.

Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., & Gaiarsa, J.-L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *Journal of Physiology* **416**, 303-325.

Bielle, F., Griveau, A., Narboux-Neme, N., Vigneau, S., Sigrist, M., Arber, S., Wassef, M., & Pierani, A. (2005). Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nature Neuroscience* **8**, 1002-1012.

Bormann, J. (1988). Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends in Neuroscience* **11**, 112-116.

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

Brumback, A. C. & Staley, K. J. (2008). Thermodynamic regulation of NKCC1-mediated Cl<sup>-</sup> cotransport underlies plasticity of GABA(A) signaling in neonatal neurons. *Journal of Neuroscience* **28**, 1301-1312.

Bystron, I., Blakemore, C., & Rakic, P. (2008). Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nature Reviews Neuroscience* **9**, 110-122.

Cancedda, L., Fiumelli, H., Chen, K., & Poo, M. M. (2007). Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *J Neurosci.* **27**, 5224-5235.

Caviness, V. S., Jr. (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Research* **256**, 293-302.

Caviness, V. S., Jr. & Rakic, P. (1978). Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice. *Annual Review of Neuroscience* **1**, 297-326.

Ceranik, K., Zhao, S., & Frotscher, M. (2000). Development of the entorhino-hippocampal projection: guidance by Cajal-Retzius cell axons. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **911**, 43-54.

Chan, C. H. & Yeh, H. H. (2003). Enhanced GABA(A) receptor-mediated activity following activation of NMDA receptors in Cajal-Retzius cells in the developing mouse neocortex. *J Physiol* **550**, 103-111.

Chen, G., Trombley, P. Q., & van den Pol, A. N. (1996). Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *J.Physiol* **494** ( Pt 2), 451-464.

Cherubini, E., Gaiarsa, J. L., & Ben-Ari, Y. (1991). GABA: An excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends in Neuroscience* **14**, 515-519.

Chub, N. & O'Donovan, M. J. (2001). Post-episode depression of GABAergic transmission in spinal neurons of the chick embryo. *J Neurophysiol* **85**, 2166-2176.

Clayton, G. H., Owens, G. C., Wolff, J. S., & Smith, R. L. (1998). Ontogeny of cation-Cl<sup>-</sup> cotransporter expression in rat neocortex. *Developmental Brain Research* **109**, 281-292.

D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S. C., Soares, H. D., Morgan, J. I., & Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* **374**, 719-723.

D'Arcangelo, G., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., & Curran, T. (1997). Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *Journal of Neuroscience* **17**, 23-31.

De Bergeyck, V., Naerhuyzen, B., Goffinet, A. M., & De Rouvroit, C. L. (1998). A panel of monoclonal antibodies against reelin, the extracellular matrix protein defective in reeler mutant mice. *Journal of Neuroscience Methods* **82**, 17-24.

Del Rio, J. A., Martinez, A., Fonseca, M., Auladell, C., & Soriano, E. (1995). Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. *Cereb. Cortex* **5**, 13-21.

Del Rio, J. A., Soriano, E., & Ferrer, I. (1992). Development of GABA-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *Journal of Comparative Neurology* **326**, 501-526.

Delpire, E. (2000). Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci.* **15**, 309-312.

Demarque, M., Represa, A., Becq, H., Khalilov, I., Ben Ari, Y., & Aniksztejn, L. (2002). Paracrine intercellular communication by a Ca<sup>2+</sup>- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron* **36**, 1051-1061.

Derer, P. & Derer, M. (1990). Cajal-Retzius cell ontogenesis and death in mouse brain visualized with horseradish peroxidase and electron microscopy. *Neuroscience* **36**, 839-856.

Dupont, E., Hanganu, I. L., Kilb, W., Hirsch, S., & Luhmann, H. J. (2006). Rapid developmental switch in the mechanisms driving early cortical columnar networks. *Nature* **439**, 79-83.

Edwards, D. H. (1990). Mechanisms of depolarizing inhibition at the crayfish giant motor synapse. I. Electrophysiology. *Journal of Neurophysiology* **64**, 532-540.

- Fedirchuk, B., Wenner, P., Whelan, P. J., Ho, S., Tabak, J., & O'Donovan, M. J. (1999). Spontaneous network activity transiently depresses synaptic transmission in the embryonic chick spinal cord. *Journal of Neuroscience* **19**, 2102-2112.
- Fonseca, M., Del Río, J. A., Martínez, A., Gómez, S., & Soriano, E. (1995). Development of calretinin immunoreactivity in the neocortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology* **361**, 177-192.
- Fricker, D., Verheugen, J. A., & Miles, R. (1999). Cell-attached measurements of the firing threshold of rat hippocampal neurones. *J Physiol* **517 ( Pt 3)**, 791-804.
- Frotscher, M. (1997). Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development. *Cell Tissue Res.* **290**, 315-322.
- Frotscher, M. (1998). Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Current Opinion in Neurobiology* **8**, 570-575.
- Gao, X. B., Chen, G., & van den Pol, A. N. (1998). GABA-dependent firing of glutamate-evoked action potentials at AMPA/kainate receptors in developing hypothalamic neurons. *Journal of Neurophysiology* **79**, 716-726.
- Gao, X. B. & van den Pol, A. N. (2001). GABA, not glutamate, a primary transmitter driving action potentials in developing hypothalamic neurons. *Journal of Neurophysiology* **85**, 425-434.
- Goldman, David E. (1943), Potential, Impedance, and Rectification in Membranes. *Journal of General Physiology* **27**, 37-60
- Gressens, P. (2000). Mechanisms and disturbances of neuronal migration. *Pediatric Research* **48**, 725-730.
- Gulledge, A. T. & Stuart, G. J. (2003). Excitatory actions of GABA in the cortex. *Neuron* **37**, 299-309.

Hartfuss, E., Forster, E., Bock, H. H., Hack, M. A., LePrince, P., Luque, J. M., Herz, J., Frotscher, M., & Gotz, M. (2003). Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Development* **130**, 4597-4609.

Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretzschmar, H., Sisodia, S., & Muller, U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J.* **23**, 4106-4115.

Hestrin, S. & Armstrong, W. E. (1996). Morphology and physiology of cortical neurons in layer I. *Journal of Neuroscience* **16**, 5290-5300.

Hevner, R. F., Neogi, T., Englund, C., Daza, R. A., & Fink, A. (2003). Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Brain Res.Dev.Brain Res.* **141**, 39-53.

Hirotsune, S., Takahara, T., Sasaki, N., Hirose, K., Yoshiki, A., Ohashi, T., Kusakabe, M., Murakami, Y., Muramatsu, M., Watanabe, S. (1995). The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons. *Nat.Genet.* **10**, 77-83.

Hodgkin, A. L. & Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *Journal of Physiology* **108(1)**, 37-77

Hosokawa, Y., Sciancalepore, M., Stratta, F., Martina, M., & Cherubini, E. (1994). Developmental changes in spontaneous GABA<sub>A</sub>-mediated synaptic events in rat hippocampal CA3 neurons. *European Journal of Neuroscience* **6**, 805-813.

Hubner, C. A., Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Meyer, T., Ballanyi, K., & Jentsch, T. J. (2001). Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* **30**, 515-524.

Ikeda, M., Toyoda, H., Yamada, J., Okabe, A., Sato, K., Hotta, Y., & Fukuda, A. (2003). Differential development of cation-chloride cotransporters and Cl<sup>-</sup> homeostasis contributes to differential GABAergic actions between developing

rat visual cortex and dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Research* **984**, 149-159.

Janusonis, S., Gluncic, V., & Rakic, P. (2004). Early serotonergic projections to Cajal-Retzius cells: relevance for cortical development. *Journal of Neuroscience* **24**, 1652-1659.

Jean-Xavier, C., Mentis, G. Z., O'Donovan, M. J., Cattaert, D., & Vinay, L. (2007). Dual personality of GABA/glycine-mediated depolarizations in immature spinal cord. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**, 11477-11482.

Kaila, K. (1994). Ionic basis of GABA<sub>A</sub> receptor channel function in the nervous system. *Progress in Neurobiology* **42**, 489-537.

Kakazu, Y., Akaike, N., Komiyama, S., & Nabekura, J. (1999). Regulation of intracellular chloride by cotransporters in developing lateral superior olive neurons. *Journal of Neuroscience* **19**, 2843-2851.

Kakazu, Y., Uchida, S., Nakagawa, T., Akaike, N., & Nabekura, J. (2000). Reversibility and cation selectivity of the K(+)-Cl(-) cotransport in rat central neurons. *Journal of Neurophysiology* **84**, 281-288.

Katz, L. C. & Shatz, C. J. (1996). Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* **274**, 1133-1138.

Khalilov, I., Dzhala, V., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (1999). Dual role of GABA in the neonatal rat hippocampus. *Developmental Neuroscience* **21**, 310-319.

Khazipov, R. & Luhmann, H. J. (2006). Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends in Neuroscience* **29**, 414-418.

Kilb, W., Ikeda, M., Uchida, K., Okabe, A., Fukuda, A., & Luhmann, H. J. (2002). Depolarizing glycine responses in Cajal-Retzius cells of neonatal rat cerebral cortex. *Neuroscience* **112**, 299-307.

Kilb, W. & Luhmann, H. J. (2000). Characterization of a hyperpolarization-activated inward current in Cajal-Retzius cells in rat neonatal neocortex. *Journal of Neurophysiology* **84**, 1681-1691.

Kilb, W. & Luhmann, H. J. (2001). Spontaneous GABAergic postsynaptic currents in Cajal-Retzius cells in neonatal rat cerebral cortex. *European Journal of Neuroscience* **13**, 1387-1390.

Kim, H. G., Fox, K., & Connors, B. W. (1995). Properties of excitatory synaptic events in neurons of primary somatosensory cortex of neonatal rats. *Cereb.Cortex* **5**, 148-157.

Kirmse, K. & Kirischuk, S. (2006). Ambient GABA constrains the strength of GABAergic synapses at Cajal-Retzius cells in the developing visual cortex. *Journal of Neuroscience* **26**, 4216-4227.

Kyrozis, A. & Reichling, D. B. (1995). Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. *Journal of Neuroscience Methods* **57**, 27-35.

Lacor, P. N., Grayson, D. R., Auta, J., Sugaya, I., Costa, E., & Guidotti, A. (2000). Reelin secretion from glutamatergic neurons in culture is independent from neurotransmitter regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 3556-3561.

Lee, H., Chen, C. X., Liu, Y. J., Aizenman, E., & Kandler, K. (2005). KCC2 expression in immature rat cortical neurons is sufficient to switch the polarity of GABA responses. *European Journal of Neuroscience* **21**, 2593-2599.

Leinekugel, X., Medina, I., Khalilov, I., Ben Ari, Y., & Khazipov, R. (1997). Ca<sup>2+</sup> oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* **18**, 243-255.

Li, H., Tornberg, J., Kaila, K., Airaksinen, M. S., & Rivera, C. (2002). Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *European Journal of Neuroscience* **16**, 2358-2370.

LoTurco, J. J., Owens, D. F., Heath, M. J., Davis, M. B., & Kriegstein, A. R. (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* **15**, 1287-1298.

Luhmann, H. J. & Prince, D. A. (1991). Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *Journal of Neurophysiology* **65**, 247-263.

Luhmann, H. J., Reiprich, R. A., Hanganu, I., & Kilb, W. (2000). Cellular physiology of the neonatal rat cerebral cortex: Intrinsic membrane properties, sodium and calcium currents. *Journal of Neuroscience Research* **62**, 574-584.

Luhmann, H. J., Schubert, D., Kötter, R., & Staiger, J. F. (1999). Cellular morphology and physiology of the perinatal rat cerebral cortex. *Developmental Neuroscience* **21**, 298-309.

Lytle, C., Xu, J. C., Biemesderfer, D., & Forbush, B., III (1995). Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies. *Am.J.Physiol* **269**, C1496-C1505.

Magdaleno, S., Keshvara, L., & Curran, T. (2002). Rescue of ataxia and preplate splitting by ectopic expression of Reelin in reeler mice. *Neuron* **33**, 573-586.

Marchetti, C., Tabak, J., Chub, N., O'Donovan, M. J., & Rinzel, J. (2005). Modeling spontaneous activity in the developing spinal cord using activity-dependent variations of intracellular chloride. *J Neurosci.* **25**, 3601-3612.

Marin-Padilla, M. (1998). Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends in Neuroscience* **21**, 64-71.

Martin, R., Gutiérrez, A., Penafiel, A., Marín-Padilla, M., & De la Calle, A. Persistence of Cajal-Retzius cells in the adult human cerebral cortex. *Histol.Histopathol.* **14**, 487-490. 1999.

Marty, S., Wehrle, R., Alvarez-Leefmans, F. J., Gasnier, B., & Sotelo, C. (2002). Postnatal maturation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransporter expression and inhibitory synaptogenesis in the rat hippocampus: an immunocytochemical analysis. *European Journal of Neuroscience* **15**, 233-245.

Mercado, A., Mount, D. B., & Gamba, G. (2004). Electroneutral cation-chloride cotransporters in the central nervous system. *Neurochemical Research* **29**, 17-25.

Meyer, G., Soria, J. M., Martínez-Galán, J. R., Martín-Clemente, B., & Fairén, A. (1998). Different origins and developmental histories of transient neurons in the marginal zone of the fetal and neonatal rat cortex. *Journal of Comparative Neurology* **397**, 493-518.

Mienville, J. M. (1998). Persistent depolarizing action of GABA in rat Cajal-Retzius cells. *Journal of Physiology* **512**, 809-817.

Mienville, J. M. & Pesold, C. (1999). Low resting potential and postnatal upregulation of NMDA receptors may cause Cajal-Retzius cell death. *Journal of Neuroscience* **19**, 1636-1646.

Neher, E. (1992). Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol.* **207**, 123-131.

Nguyen, L., Rigo, J. M., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Rogister, B., Leprince, P., & Moonen, G. (2001). Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res.* **305**, 187-202.

Nickell, W. T., Kleene, N. K., Gesteland, R. C., & Kleene, S. J. (2006). Neuronal chloride accumulation in olfactory epithelium of mice lacking NKCC1. *J Neurophysiol* **95**, 2003-2006.

Nilius, B. & Droogmans, G. (2003). Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand.* **177**, 119-147.

Owens, D. F., Boyce, L. H., Davis, M. B., & Kriegstein, A. R. (1996). Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *Journal of Neuroscience* **16**, 6414-6423.

Owens, D. F. & Kriegstein, A. R. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nature Reviews Neuroscience* **3**, 715-727.

Parnavelas, J. G. & Edmonds, S. M. (1983). Further evidence that Retzius-Cajal cells transform to nonpyramidal neurons in the developing rat visual cortex. *Journal of Neurocytology* **12**, 863-871.

Payne, J. A., Rivera, C., Voipio, J., & Kaila, K. (2003). Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends in Neuroscience* **26**, 199-206.

Penn, A. A. & Shatz, C. J. (1999). Brain waves and brain wiring: the role of endogenous and sensory-driven neural activity in development. *Pediatric Research* **45**, 447-458.

Plotkin, M. D., Snyder, E. Y., Hebert, S. C., & Delpire, E. (1997). Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: A possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *Journal of Neurobiology* **33**, 781-795.

Radnikow, G., Feldmeyer, D., & Lubke, J. (2002). Axonal projection, input and output synapses, and synaptic physiology of cajal-retzius cells in the developing rat neocortex. *Journal of Neuroscience* **22**, 6908-6919.

Rakic, P. & Caviness, V. S., Jr. (1995). Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Neuron* **14**, 1101-1104.

Represa, A. & Ben Ari, Y. (2005). Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends in Neuroscience* **28**, 278-283.

Rivera, C., Voipio, J., & Kaila, K. (2005). Two developmental switches in GABAergic signalling: the K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *J Physiol* **562**, 27-36.

Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., & Kaila, K. (1999). The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251-255.

Rohrbough, J. & Spitzer, N. C. (1996). Regulation of intracellular Cl<sup>-</sup> levels by Na<sup>(+)</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> cotransport distinguishes depolarizing from hyperpolarizing GABAA receptor-mediated responses in spinal neurons. *Journal of Neuroscience* **16**, 82-91.

Russell, J. M. (2000). Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev.* **80**, 211-276.

Schwartz, T. H., Rabinowitz, D., Unni, V., Kumar, V. S., Smetters, D. K., Tsiola, A., & Yuste, R. (1998). Networks of coactive neurons in developing layer 1. *Neuron* **20**, 541-552.

Shimizu-Okabe, C., Yokokura, M., Okabe, A., Ikeda, M., Sato, K., Kilb, W., Luhmann, H. J., & Fukuda, A. (2002). Layer-specific expression of Cl<sup>-</sup> transporters and differential [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> in newborn rat cortex. *Neuroreport* **13**, 2433-2437.

Sipila, S. T., Huttu, K., Soltesz, I., Voipio, J., & Kaila, K. (2005). Depolarizing GABA acts on intrinsically bursting pyramidal neurons to drive giant depolarizing potentials in the immature hippocampus. *J Neurosci.* **25**, 5280-5289.

Sipila, S. T., Schuchmann, S., Voipio, J., Yamada, J., & Kaila, K. (2006). The cation-chloride cotransporter NKCC1 promotes sharp waves in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol* **573**, 765-773.

Soda, T., Nakashima, R., Watanabe, D., Nakajima, K., Pastan, I., & Nakanishi, S. (2003). Segregation and coactivation of developing neocortical layer 1 neurons. *Journal of Neuroscience* **23**, 6272-6279.

Soriano, E. & Del Rio, J. A. (2005). The cells of Cajal-Retzius: still a mystery one century after. *Neuron* **46**, 389-394.

Staley, K. J. & Mody, I. (1992). Shunting of excitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing GABAA receptor-mediated postsynaptic conductance. *Journal of Neurophysiology* **68**, 197-212.

Sterling, D. & Casey, J. R. (2002). Bicarbonate transport proteins. *Biochem. Cell Biol.* **80**, 483-497.

Sun, D. & Murali, S. G. (1999). Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter in immature cortical neurons: A role in intracellular Cl<sup>-</sup> regulation. *Journal of Neurophysiology* **81**, 1939-1948.

Sung, K. W., Kirby, M., McDonald, M. P., Lovinger, D. M., & Delpire, E. (2000). Abnormal GABA<sub>A</sub> receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *Journal of Neuroscience* **20**, 7531-7538.

Super, H., Del Rio, J. A., Martinez, A., Perez-Sust, P., & Soriano, E. (2000). Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cereb. Cortex* **10**, 602-613.

Titz, S., Hans, M., Kelsch, W., Lewen, A., Swandulla, D., & Misgeld, U. (2003). Hyperpolarizing inhibition develops without trophic support by GABA in cultured rat midbrain neurons. *J. Physiol* **550**, 719-730.

Tyzio, R., Ivanov, A., Bernard, C., Holmes, G. L., Ben Ari, Y., & Khazipov, R. (2003). Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. *Journal of Neurophysiology* **90**, 2964-2972.

Tyzio, R., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., Gozlan, H., & Aniksztejn, L. (1999). The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *Journal of Neuroscience* **19**, 10372-10382.

Valverde, F., De Carlos, J. A., & López-Mascaraque, L. (1995). Time of origin and early fate of preplate cells in the cerebral cortex of the rat. *Cereb. Cortex* **5**, 483-493.

Wang, Y. F., Gao, X. B., & van den Pol, A. N. (2001). Membrane properties underlying patterns of GABA-dependent action potentials in developing mouse hypothalamic neurons. *J Neurophysiol* **86**, 1252-1265.

Yamada, J., Okabe, A., Toyoda, H., Kilb, W., Luhmann, H. J., & Fukuda, A. (2004). Cl<sup>-</sup> uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J Physiol* **557**, 829-841.

Zecevic, N. & Rakic, P. (2001). Development of layer I neurons in the primate cerebral cortex. *Journal of Neuroscience* **21**, 5607-5619.

Zhang, L. L., Pathak, H. R., Coulter, D. A., Freed, M. A., & Vardi, N. (2006). Shift of intracellular chloride concentration in ganglion and amacrine cells of developing mouse retina. *J Neurophysiol* **95**, 2404-2416.

Zhou, F. M. & Hablitz, J. J. (1996). Morphological properties of intracellularly labeled layer I neurons in rat neocortex. *Journal of Comparative Neurology* **376**, 198-213.

## **Danke**

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater bedanken, der es mir ermöglicht hat, an einem gut strukturierten und erfolgsversprechenden Projekt arbeiten zu können. Ich habe mich sehr kompetent betreut gefühlt! Danke für all die Anregungen und die Heranführung an wissenschaftliches Arbeiten. Es hat Spaß gemacht, unter Deiner Anleitung zu arbeiten!

Danke natürlich auch an die Lehrstuhlleitung dafür, dass ich meine Doktorarbeit an Ihrem Lehrstuhl anfertigen konnte. Ich habe mich immer gut aufgehoben und unterstützt gefühlt!

Besonders möchte ich mich für das Verständnis und die Unterstützung bedanken, die mir entgegen gebracht wurden, als sich unsere Tochter ankündigte. Es ist durchaus nicht selbstverständlich, dass sich Chefs über Nachwuchs freuen.

Vielen Dank an die technische Assistentin für sehr gute technische Assistenz!

Danke meinem Mann für liebevolle Unterstützung, Toleranz der Abend- und Wochenendarbeit, Babysitten und natürlich das Korrekturlesen!

Danke an meine Familie, die mich immer unterstützt und sich in der Endphase des Zusammenschreibens rührend um meine Tochter gekümmert hat! Ohne Euch säße ich wahrscheinlich immer noch am Diskussionsteil.

Danke an meine Tochter: ohne Dich wäre die Arbeit zwar eher fertig gewesen, aber das Leben würde weniger Spaß machen : )