

Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Abteilung Klinische Neuropharmakologie
Institut für Zoologie der Technischen Universität München

**Elektrophysiologische Untersuchungen zur glutamatergen
und GABAergen Informationsübertragung an neocorticalen
Pyramidenneuronen mit Hilfe Infrarot-gelenkter
Photostimulation**

Matthias G. Eder

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Firl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H.-J. Leppelsack
2. apl.-Prof. Dr. W. Zieglgänsberger/Ludwig-
Maximilians-Universität München
3. Priv.-Doz. Dr. H. Adelsberger

Die Dissertation wurde am 19.06.2000 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 18.07.2000 angenommen.

Für meine Eltern, Jeannette und Carolin

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Synaptische Informationsübertragung	1
1.1.1 Glutamaterge Transmission	1
1.1.1.1 AMPA-Rezeptoren	2
1.1.1.2 NMDA-Rezeptoren	3
1.1.2 GABAerge Transmission	5
1.1.2.1 Iontrope GABA-Rezeptoren	5
1.1.2.2 GABA _B -Rezeptoren	7
1.1.2.3 Verteilung der GABA-Rezeptoren im Neocortex	7
1.1.2.4 Entwicklungsabhängige Veränderungen in der GABAergen Transmission	8
1.2 Synaptische Langzeitplastizität.....	8
1.2.1 Ca ²⁺ -Abhängigkeit der LTP-/LTD-Induktion.....	9
1.2.2 Bidirektionalität synaptischer Langzeitplastizität.....	10
1.2.3 Synaptischer Ort der LTP-/LTD-Expression	10
1.2.4 Räumliche Spezifität synaptischer Langzeitplastizität	11
1.3 Der zerebrale Cortex beim Säugetier	11
1.3.1 Aufbau, Funktion und Entwicklung.....	11
1.3.2 Pyramidenneurone der Lamina V.....	13
1.4 Synaptische Integration	14
1.4.1 Passive Eigenschaften der Dendriten	14
1.4.2 Aktive Eigenschaften der Dendriten	14
1.5 Untersuchungsgegenstand der Arbeit.....	15
2 MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1 Präparation der neocorticalen Hirnschnitte	17
2.2 Infrarot-gelenkte Photostimulation	18
2.2.1 Infrarot-Videomikroskopie.....	18
2.2.2 Laser-Photostimulation	19
2.2.3 Caged Substanzen.....	21

2.3 Elektrophysiologie	23
2.3.1 Versuchsaufbau	23
2.3.2 Ganzzelleableitung	23
2.3.2.1 Pipetten	24
2.3.2.2 Etablierung der Ganzzelleableitung	24
2.3.3 Extrazelluläre Stimulation	25
2.3.4 Auswertung und Statistik	26
3 ERGEBNISSE	27
3.1 Eigenschaften neocorticaler Pyramidenneurone der Lamina V	27
3.2 Räumliche Spezifität neocorticaler LTD	29
3.2.1 Induktion von "Photostimulations-LTD"	29
3.2.1.1 Induktions-Protokoll	30
3.2.1.2 Ausschluß einer Schädigung der Neurone durch UV-Licht	31
3.2.2 Induktion von "Photostimulations-LTP"	31
3.2.3 Eigenschaften der Photostimulations-LTD	32
3.2.3.1 NMDA-Rezeptor- und Ca ²⁺ -Abhängigkeit	32
3.2.3.2 Kinetik der Glutamatantwort	34
3.2.4 Räumliche Spezifität der Photostimulations-LTD	35
3.2.4.1 Räumliche Spezifität der Infrarot-gelenkten Photostimulation	35
3.2.4.2 Photostimulations-LTD ist räumlich hoch spezifisch	36
3.2.5 Synaptische Langzeitdepression ist mit einer Abnahme der dendritischen Glutamatsensitivität assoziiert	37
3.2.6 Eigenschaften der synaptischen LTD	40
3.2.6.1 NMDA-Rezeptor-Abhängigkeit der synaptischen LTD	40
3.2.6.2 Kinetik der Glutamatantwort	41
3.3 Differentielle Verteilung der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren	42
3.3.1 Eigenschaften der GABA-Antworten	42
3.3.1.1 Pharmakologische Isolierung reiner GABA _A - oder GABA _B -Antworten	42
3.3.1.2 Depolarisierende GABA _A -Antworten	42
3.3.1.3 Umkehrpotentiale	45
3.3.1.4 Kinetiken der GABA-Antworten	46
3.3.2 GABA-Sensitivität des apikalen Dendriten	47
3.3.2.1 Abhängigkeit der Amplitude vom Stimulationsort	47
3.3.2.2 Abhängigkeit der Anstiegszeit vom Stimulationsort	48
3.3.3 Numerische Simulationen der elektrotonischen Amplitudenabschwächung	49
3.3.3.1 Das äquivalente Zylinder Modell	49

3.3.3.2 Berechnung der elektrotonischen Amplitudenabschwächung	50
3.3.4 Dendritische Ganzzelleableitungen	52
3.3.5 Quantifizierung des relativen Verhältnisses der GABA _A - zu den GABA _B -Rezeptoren	54
4 DISKUSSION	56
4.1 Elektrophysiologische Eigenschaften der untersuchten Neurone	56
4.2 Räumliche Spezifität neocorticaler LTD	57
4.2.1 Synaptischer Ort der LTP-/LTD-Expression	57
4.2.2 Induktion von Photostimulations-LTP	60
4.2.3 Molekularer Mechanismus neocorticaler LTD	61
4.2.4 Neocorticale LTD besitzt eine hohe räumliche Spezifität	63
4.3 Differentielle Verteilung der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren	64
4.3.1 Somatische und dendritische Kolo-kalisation von GABA _A - und GABA _B -Rezeptoren	64
4.3.2 Relatives Verhältnis der GABA _A - zu den GABA _B -Rezeptoren.....	66
4.3.2.1 GABA-Sensitivität des apikalen Dendriten	66
4.3.2.2 Numerische Simulationen der elektrotonischen Amplitudenabschwächung ..	69
4.3.2.3 Dendritische Ganzzelleableitungen	71
4.3.2.4 Physiologische Bedeutung der differentiellen Verteilung der GABA _A - und GABA _B -Rezeptoren	71
5 ZUSAMMENFASSUNG	73
6 LITERATURVERZEICHNIS	76
ABKÜRZUNGEN	89
VERWENDETE SUBSTANZEN	91
DANKSAGUNG	92
LEBENS LAUF	93
EIGENE ARBEITEN	94

1 Einleitung

1.1 Synaptische Informationsübertragung

Nervenzellen kommunizieren vor allem über spezialisierte Kontaktstellen, die Synapsen. Man unterscheidet dabei zwei prinzipiell verschiedene Mechanismen der Signalübertragung. Zum einen sind Neurone durch sogenannte "gap junctions" direkt elektrisch miteinander gekoppelt. Zum anderen löst bei den chemischen Synapsen ein elektrisches Signal an den präsynaptischen Nervenendigungen die Freisetzung eines Botenstoffes aus, der über den synaptischen Spalt diffundiert und an spezifische Rezeptoren des postsynaptischen Neurons bindet. Bei der Interaktion zwischen einem solchen Neurotransmitter und seinem Rezeptor wird die chemische Information des Transmitters in ein elektrisches Signal zurückverwandelt. Eine Depolarisation führt hierbei zu einer Erregung, eine Hyperpolarisation zu einer Hemmung der postsynaptischen Nervenzelle.

1.1.1 Glutamaterge Transmission

Die Aminosäure L-Glutamat gilt heute als wichtigster erregender Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) der Säugetiere. Die Synthese von L-Glutamat aus Ammoniumionen und α -Ketoglutarat wird durch das Enzym Glutamat-Dehydrogenase katalysiert und findet vor allem in den Nervenendigungen statt. Neben der synaptischen Informationsübertragung spielt Glutamat bei der Speicherung von Gedächtnisinhalten (siehe Abschnitt 1.2), der Ausbildung neuronaler Strukturen wie Axonen und Dendriten, und der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Alzheimer'schen Demenz, eine wichtige Rolle (als Übersichten siehe Mayer & Westbrook, 1987; Dingledine et al., 1988; Monaghan et al., 1989; Lees, 1996; Ozawa et al. 1998).

Glutamatrezeptoren werden heute in zwei verschiedene Klassen eingeteilt. Die erste Klasse, die ionotropen Glutamatrezeptoren, sind an Kationenkanäle gekoppelt und vermitteln dadurch direkt und schnell die exzitatorische synaptische Transmission. Entsprechend ihrer Affinität zu spezifischen, künstlich synthetisierten Agonisten werden sie in die drei Untergruppen der α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA)-, der N-methyl-D-aspartat (NMDA)- und der Kainat-Rezeptoren eingeteilt. Die zweite Klasse, die metabotropen Glutamatrezeptoren, gehören zur Familie der G-Protein-

gekoppelten Rezeptoren. Sie entfalten ihre vielfältigen Wirkungen indirekt über intrazelluläre Botenstoffe (als Übersichten siehe Nakanishi, 1992; Seeburg, 1993; Hollman & Heinemann, 1994). L-Glutamat ist der natürliche, endogene Agonist für alle genannten Rezeptoren.

1.1.1.1 AMPA-Rezeptoren

AMPA-Rezeptoren vermitteln an den meisten Synapsen im ZNS die schnelle erregende synaptische Transmission. Der ionotrope Kanal der AMPA-Rezeptoren besitzt eine hohe Permeabilität für die Kationen Na^+ und K^+ . Teilweise ist er auch für Ca^{2+} -Ionen durchgängig. Man nimmt an, daß der Kanal in Analogie zum nikotinischen Acetylcholin- (nACh)-, GABA_A - und NMDA-Rezeptor eine pentamere Struktur aufweist. Bis heute wurden vier Untereinheiten identifiziert, die entweder als GluRA – GluRD (Keinänen et al., 1990) oder GluR1 – GluR4 (Boulter et al., 1990; Nakanishi et al., 1990) bezeichnet werden. Jede dieser Untereinheiten besteht aus ungefähr 900 Aminosäuren und existiert in zwei verschiedenen "Splice"-Varianten, der "Flip"- beziehungsweise der "Flop"-Form (Sommer et al., 1990). Die Vielfalt der verschiedenen Untereinheiten wird weiterhin durch "RNA-Editing" erhöht (Sommer et al., 1991). "Splice"-Varianten entstehen durch das sogenannte "alternative splicing". Bei diesem Vorgang werden zusätzlich zu den Introns ("splicing") spezifische Exon-Sequenzen aus dem primären mRNA-Transkript herausgeschnitten. Das "RNA-Editing" ist ein Vorgang, bei dem nur einzelne Codons der mRNA-Matrize verändert werden.

Die Untereinheiten von Liganden-gesteuerten Ionenkanälen besitzen eine große Domäne am extrazellulär lokalisierten Amino-Terminus und vier hydrophobe Transmembransegmente (TM1 – TM4). Als Folge dieser Anordnung liegt das Carboxylende ebenfalls auf der extrazellulären Seite der Membran. Diese Vorstellung wurde für die ionotropen Glutamatrezeptoren revidiert. Nach heutiger Ansicht besitzen GluR1 – GluR4 nur 3 Membransegmente, wobei TM2 entweder intrazellulär an der Membran liegt oder in der Zellmembran eine Haarnadel bildet. Die Domäne zwischen TM3 und TM4 kommt dadurch extrazellulär und das Carboxylende intrazellulär zu liegen (Hollmann et al., 1994; Wo & Oswald, 1994; Abbildung 1.1). Die funktionellen Eigenschaften der AMPA-Rezeptoren werden durch den Aufbau aus den verschiedenen Untereinheiten bestimmt, wobei sowohl eine homomere, als auch heteromere Zusammensetzung möglich ist. Eine besondere Rolle spielt hierbei die GluR2 Untereinheit. Rezeptoren, die aus einer Kombination von GluR2 mit GluR1,3 und/oder 4 bestehen, sind für Ca^{2+} -Ionen wenig permeabel und zeigen in ihrer Strom-Spannungsbeziehung eine Auswärtsgleichrichtung. In Abwesenheit der GluR2

Untereinheit hingegen ist die Ca^{2+} -Permeabilität deutlich erhöht und es ist eine Einwärtsgleichrichtung zu beobachten (als Übersichten siehe Seeburg, 1993; Hollmann & Heinemann, 1994; Jonas & Burnashev, 1995). Ein gleichrichtender Ionenkanal kann mit einer Diode verglichen werden. Seine Strom-Spannungsbeziehung verläuft demnach nicht linear.

AMPA-Rezeptoren besitzen verschiedene Bindungsstellen, durch die ihre funktionellen Eigenschaften moduliert werden können. Kompetitive Antagonisten wie die Quinoxalindione CNQX und das selektivere NBQX binden an der Glutamatbindungsstelle (Honoré et al., 1988; Sheardown et al., 1990). Das Benzodiazepinderivat GYKI 52466 blockiert durch einen nicht-kompetitiven, allosterischen Mechanismus AMPA-Rezeptor mediierte Ströme (Donevan & Rogawski, 1993; Parsons et al., 1994). Cyclothiazid bindet an eine Stelle des Rezeptors, über die die Kinetik der Ströme beeinflusst wird. Dieses Benzothiadiazid reduziert die Desensitivierung und verlangsamt die Deaktivierung (Yamada & Rothman, 1992; Patneau et al., 1993; Partin et al., 1996).

1.1.1.2 NMDA-Rezeptoren

Der NMDA-Rezeptor ist der am besten charakterisierte Glutamatrezeptor-Subtyp. Er spielt eine wichtige Rolle bei der synaptischen Transmission, der synaptischen Plastizität (siehe Abschnitt 1.2), der neuronalen Entwicklung und bei pathophysiologischen Prozessen (als Übersichten siehe Monaghan et al., 1989; Bliss & Collingridge, 1993; Scatton, 1993). An vielen erregenden Synapsen des ZNS wurde eine Kolokalisation und eine damit einhergehende Koaktivierung von NMDA- und AMPA-Rezeptoren beobachtet (Bekkers & Stevens, 1989; Jones & Baughman, 1991; Clements et al., 1992). Der Kanal des NMDA-Rezeptors ist für die Kationen Na^+ , K^+ und Ca^{2+} permeabel (MacDermot et al., 1986; Abbildung 1.1). Charakteristisch für den NMDA-Rezeptor ist die spannungsabhängige Blockierung durch Mg^{2+} -Ionen und die im Vergleich zu den AMPA-Rezeptoren deutlich langsamere Kinetik der durch ihn vermittelten exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSCs) (Lester et al., 1990). In Analogie zu den AMPA-Rezeptoren gibt es mehrere Subtypen von NMDA-Rezeptoren, die sich in ihrer molekularen Struktur und Funktion unterscheiden. Bedingt ist diese Vielfalt durch einen unterschiedlichen, heteromeren Aufbau aus den verschiedenen Untereinheiten. Die Gene für die bis heute bekannten fünf Untereinheiten gliedern sich in zwei Gruppen. Die erste Gruppe kodiert ausschließlich die für einen funktionsfähigen NMDA-Rezeptor essentielle NR1 Untereinheit. Die zweite Gruppe kodiert die vier Untereinheiten NR2A – NR2D. Für die NR1 Untereinheit sind bis heute acht verschiedene "Splice"-Varianten bekannt. Für die NR2A – NR2C Untereinheiten gibt es bislang keine Hinweise auf "Splice"-Varianten.

Die NR2D Untereinheit kommt in den zwei Formen NR2D1 und NR2D2 vor (Ishii et al., 1993; Seeburg, 1993; Hollmann & Heinemann, 1994; McBain & Mayer, 1994; Mori & Mishina, 1995; Zukin & Bennett, 1995).

Die Pharmakologie von NMDA-Rezeptoren ist sehr komplex. Durch eine Vielzahl verschiedener Bindungsstellen ist eine Modulation der funktionellen Eigenschaften möglich (Abbildung 1.1). Für zahlreiche Liganden sind Bindungsstellen bekannt: **(1)** Den Agonisten (L-Glutamat, NMDA etc.), **(2)** den für die Aktivierung des Kanals essentiellen Co-Agonisten Glycin (Johnson & Ascher, 1987; Kleckner & Dingledine, 1988), **(3)** die modulatorisch wirkende Polyamine, wie Spermin und Spermidin (McGurk et al., 1990; Benveniste & Mayer, 1993; Williams et al., 1993), **(4)** die den Kanal spannungsunabhängig blockierende Zn^{2+} -Ionen (Christine & Choi, 1990; Legendre & Westbrook, 1990), **(5)** die den Kanal spannungsabhängig blockierenden Mg^{2+} -Ionen (Monyer et al., 1994), **(6)** die sogenannten "open channel blocker", wie MK-801, Phencyclidin (PCP, "Angel dust") und Tenocyclidin (TCP) (als Übersicht siehe Scatton, 1993) und **(7)** Protonen (Traynelis & Cull-Candy, 1991). Kompetitive Antagonisten, wie D-APV, binden an die Glutamat/NMDA-Bindungsstelle. Die NMDA-Rezeptoren besitzen extrazellulär gelegene Glykosylierungsstellen (Hollman & Heinemann, 1994). Durch Phosphorylierung an den entsprechenden intrazellulär lokalisierten Stellen kann die Aktivität der Rezeptoren reguliert werden (Chen & Huang, 1992).

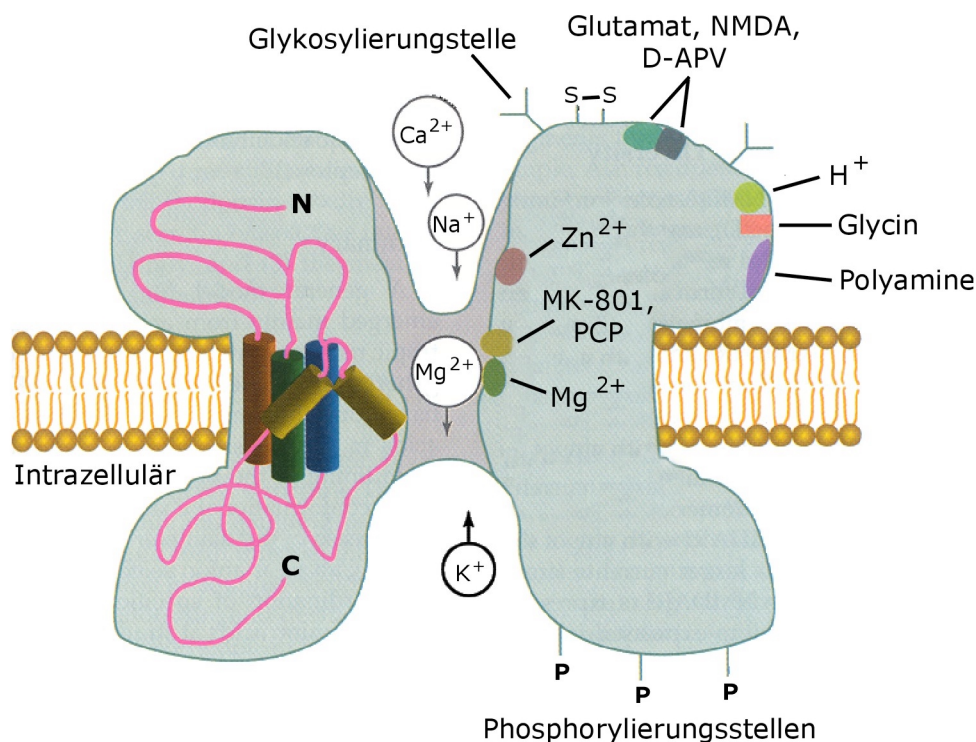


Abb. 1.1: Modell des NMDA-Rezeptors. Verändert nach Waxham (1999).

1.1.2 GABAerge Transmission

Die neuronale Aktivität wird durch ein Wechselspiel zwischen erregenden und hemmenden Einflüssen reguliert. Als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter im ZNS gilt die neutrale Aminosäure γ -Aminobuttersäure (GABA, " γ -aminobutyric acid"). Ihre Biosynthese erfolgt durch Decarboxylierung von Glutamat durch das Enzym GAD (" γ -glutamic acid decarboxylase"). GABAerge Projektionen werden hauptsächlich von Interneuronen ausgebildet. Es gibt allerdings auch sogenannte "long-axoned GABA cells", die beispielsweise vom Striatum in die Substantia nigra projizieren. Dysfunktionen des GABAergen Systems sind für die Entstehung zahlreicher neurologischer und psychiatrischer Krankheiten verantwortlich. Als Beispiele seien die Epilepsie, Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis und die Alzheimer'sche Demenz genannt. GABA-Rezeptoren werden heute in die Klassen der ionotropen GABA_A- und GABA_C- und der metabotropen GABA_B-Rezeptoren eingeteilt (als Übersicht siehe Enna & Bowery, 1996).

1.1.2.1 Ionotrope GABA-Rezeptoren

Die ionotropen GABA_A-Rezeptoren vermitteln eine schnelle Hyperpolarisation der postsynaptischen Nervenzelle. Die für Cl⁻-Ionen selektive Ionenpore ist ein aus fünf Untereinheiten bestehendes Heterooligomer mit einem Molekulargewicht von ungefähr 275 kDa (Olsen & Tobin, 1990). Die Heterogenität des GABA_A-Rezeptors beruht auf den Kombinationsmöglichkeiten der Untereinheiten, die derzeit nach ihrem Homologiegrad in die vier Klassen α , β , γ und δ eingeteilt werden. Jede Untereinheit liegt im Gehirn in mehreren unabhängig voneinander exprimierten Isoformen vor. Bisher wurden 15 Untereinheiten (α 1 - α 6, β 1 - β 4, γ 1 - γ 4 und δ) identifiziert. Für einige dieser Untereinheiten existieren "Splice"-Varianten (als Übersichten siehe Barnard, 1995; Lüddens et al., 1995; Möhler et al., 1995a, b; Sieghart, 1995; Smith & Olsen, 1995). In den meisten Gehirnregionen bestehen die GABA_A-Rezeptoren aus einer Kombination von α -, β - und γ -Untereinheiten. Die δ -Untereinheit wird hauptsächlich in den Körnerzellen des Cerebellums exprimiert und ersetzt dort die γ -Untereinheit (Fritschy & Möhler, 1995; McKernan & Whiting, 1996). GABA_A-Rezeptoren, die eine δ -Untereinheit enthalten, zeigen eine verstärkte Antwort auf GABA (Saxena & Macdonald, 1994).

Die Pharmakologie der GABA_A-Rezeptoren ist komplex. Die α -, β - und γ -Untereinheiten besitzen jeweils eine Bindungsstelle für Agonisten (GABA, Muscimol), sodaß 4 - 5 Moleküle GABA an einem Rezeptor binden können. Ein bekannter kompetitiver Antagonist ist Bicucullin. Sogenannte Konvulsiva wie Picrotoxin wirken als nicht-kompetitive

Antagonisten. Die Lokalisation der entsprechenden Bindungsstelle wird kontrovers diskutiert. Therapeutisch sind Benzodiazepine, wie Diazepam und Clobazam, von großer Bedeutung. Über eine allosterische Verstärkung der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Hemmung bewirken sie anxiolytische, antikonvulsive, muskelrelaxierende und sedativ-hypnotische Effekte. Die Funktion von GABA_A-Rezeptoren wird weiterhin durch Barbiturate, neuroaktive Steroide, Alkohol und Zn²⁺-Ionen moduliert (als Übersichten siehe Lüddens et al., 1995; Upton & Blackburn, 1996; Abbildung 1.2).

GABA_C-Rezeptoren bilden die zweite Klasse der ionotropen GABA-Rezeptoren. Sie sind für Bicucullin nicht sensitiv und können daher pharmakologisch von den GABA_A-Rezeptoren abgegrenzt werden. Die pentameren Homomere sind entweder aus der ρ1- oder der ρ2-Untereinheit aufgebaut. Im Gegensatz zu den GABA_A-Rezeptoren ist der Chloridkanal der GABA_C-Rezeptoren auch für andere kleine Anionen bis zur Größe von Acetat permeabel. Die Funktion der GABA_C-Rezeptoren wurde vor allem an Neuronen der Retina untersucht. An den Horizontalzellen fungieren sie als Autorezeptoren und vermitteln präsynaptische Inhibition an den bipolaren Zellen (als Übersichten siehe Johnston, 1996; Waxham, 1999).

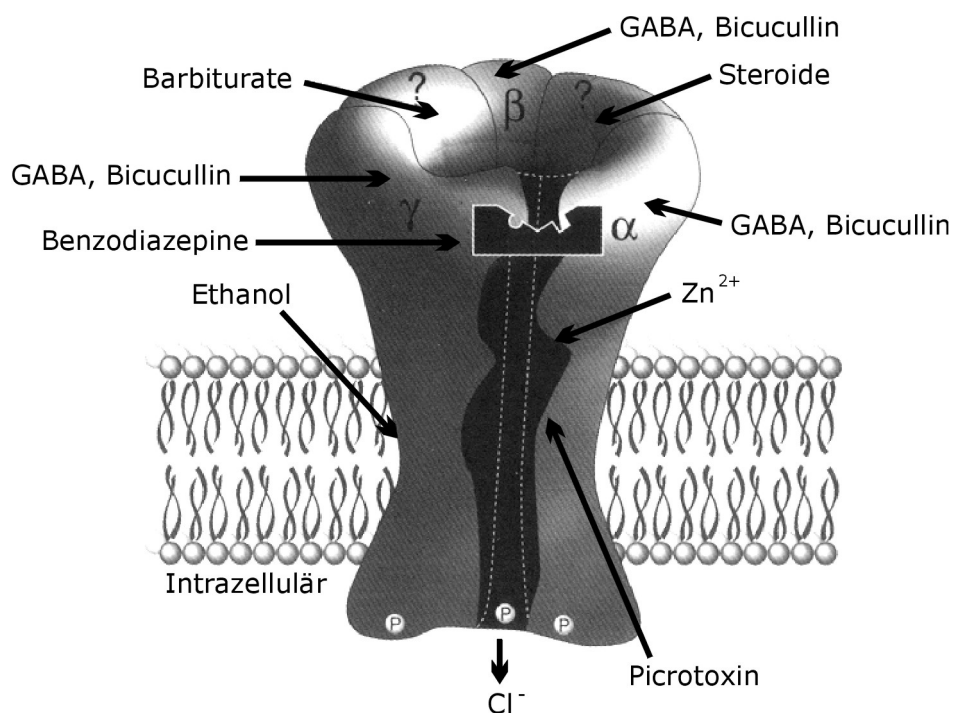


Abb. 1.2: Modell des GABA_A-Rezeptors. Verändert nach Upton & Blackburn (1996).

1.1.2.2 GABA_B-Rezeptoren

Die metabotropen GABA_B-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Neurotransmitterrezeptoren. Metabotrope Rezeptoren bestehen aus einem einzigen Polypeptid mit sieben Transmembransegmenten (TM1 – TM7). Das Carboxylende ist intrazellulär und der Amino-Terminus extrazellulär lokalisiert (als Übersicht siehe Waxham, 1999). Neuere Arbeiten weisen jedoch überzeugend darauf hin, daß der GABA_B-Rezeptor ein Heterodimer ist und aus den beiden Untereinheiten GABA_BR1 und GABA_BR2 besteht (als Übersicht siehe Marshall et al., 1999). Über die Aktivierung einer K⁺-Leitfähigkeit vermitteln GABA_B-Rezeptoren das späte, langsame inhibitorische postsynaptische Potential (IPSP) (Connors et al., 1982; Howe et al., 1987b; Benardo, 1994; van Brederode & Spain, 1995; De Koninck & Mody, 1997). Präsynaptisch lokalisierte GABA_B-Rezeptoren bewirken als Autorezeptoren ebenfalls eine Hemmung. Als Folge davon wird der Ca²⁺-Einstrom über spannungsabhängige Ca²⁺-Leitfähigkeiten und die daraus resultierende Transmitterfreisetzung reduziert (McCarren & Alger, 1985; Deisz & Prince, 1989; Deisz et al., 1997). Der GABA_B-Rezeptor ist für Bicucullin nicht sensitiv. Selektive Antagonisten des GABA_B-Rezeptors sind Saclofen, Phaclofen und CGP35348. Ein typischer Agonist ist Baclofen.

1.1.2.3 Verteilung der GABA-Rezeptoren im Neocortex

Die Verteilung der GABA-Rezeptoren im Neocortex der Ratte wurde mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Generell zeigte sich eine inhomogene Verteilung in den verschiedenen Laminae. In autoradiographischen Studien war die Dichte sowohl der GABA_A-, als auch der GABA_B-Rezeptoren in den äußeren Laminae (Lamina I – IV) höher als in den tiefen Laminae (Lamina V – VI) (Bowery et al., 1987). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß sich die neocorticale Verteilung der GABA_A-Rezeptoren von der der GABA_B-Rezeptoren unterscheidet (Chu et al., 1990). Wisden et al. (1992) untersuchten mit der *in situ* Hybridisierungstechnik das regionale Expressionsmuster der mRNA von 13 Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors (α 1 - α 6, β 1 - β 3, γ 1 - γ 3 und δ). Mit Ausnahme von α 6 konnten sämtliche Untereinheiten in allen Laminae nachgewiesen werden, wobei die Stärke der Expression in den einzelnen Schichten variierte. Die zitierten Arbeiten sowie immunzytochemische Studien (Fritschy & Möhler, 1995; Land et al., 1995) erlauben allerdings keine eindeutige Aussage über die differentielle Verteilung von funktionellen GABA-Rezeptorsubtypen auf einzelnen corticalen Neuronen. Ein Grund hierfür ist, daß mit den genannten molekularbiologischen Methoden lediglich das Rezeptorprotein oder die dafür kodierende mRNA detektiert werden kann.

1.1.2.4 Entwicklungsabhängige Veränderungen in der GABAergen Transmission

Funktionelle GABA_A-Rezeptoren werden von der frühen Embryonalentwicklung an in Neuronen exprimiert. Eine Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung bewirkt eine Depolarisation von Nervenzellen des Rückenmarks (Wu et al., 1992; Serafini et al., 1995; Rohrbough & Spitzer, 1996), des Hypothalamus (Obrietan & van den Pol, 1995), des Cerebellums (Connor et al., 1987), des Cortex (Luhmann & Prince, 1991; LoTurco et al., 1995; Owens et al., 1996), des Hippocampus (Hebb, 1949; Mueller et al., 1984; Ben-Ari et al., 1989; Fiszman et al., 1990) und des Bulbus olfactorius (Serafini et al., 1995). Dies führte zu der weit verbreiteten Ansicht, daß die schnelle exzitatorische Wirkung von GABA via GABA_A-Rezeptoren eine generelle Eigenschaft sich entwickelnder Nervenzellen ist und die GABA_A-Rezeptoren die Funktion der in den frühen Entwicklungsstadien fehlenden AMPA-Rezeptoren übernehmen (als Übersicht siehe Ben-Ari et al., 1997). Die depolarisierende Wirkung von GABA beruht nicht auf außergewöhnlichen Eigenschaften von neonatalen GABA_A-Rezeptoren, sondern auf einer erhöhten intrazellulären Cl⁻-Konzentration, die aus entwicklungsabhängigen Veränderungen des Homöostasesystems für die intrazelluläre Cl⁻-Ionen-Konzentration resultiert (Inoue et al., 1991; Zhang et al., 1991; Hara et al., 1992; Serafini et al., 1995; Staley et al., 1996; Takebayashi et al., 1996).

1.2 Synaptische Langzeitplastizität

Lang anhaltende, aktivitätsabhängige Veränderungen in der Effizienz von glutamaterger synaptischer Transmission sind von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung des Nervensystems, für die Informationsspeicherung und die corticale Neukartierung nach Verletzungen oder Amputationen. Schon vor ungefähr 50 Jahren vertrat man die Meinung, daß Gedächtnisinhalte zu einem großen Teil im zerebralen Cortex gespeichert werden (Hebb, 1949). Aus diesem Grund wurden die ersten Studien zur synaptischen Langzeitplastizität an Präparaten dieser Gehirnregion durchgeführt. Die Ergebnisse waren allerdings verwirrend und man konzentrierte sich verstärkt auf den Hippocampus, eine Struktur, der ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Informationsspeicherung zugedacht wird. Zahlreiche Studien zur Charakterisierung von synaptischer Langzeitplastizität wurden seitdem am Hippocampus durchgeführt und machten vor allem die glutamaterge Schaffer-Kollateral-Synapse zu einem wichtigen Modell für die Untersuchung von grundlegenden Mechanismen von Lernen und Gedächtnisbildung bei Vertebraten.

Generell unterscheidet man zwischen zwei Formen der Langzeitplastizität. Eine Verstärkung der Effizienz einer Synapse wird als Langzeitpotenzierung (LTP, "long-term potentiation") bezeichnet und für gewöhnlich durch eine kurze, hochfrequente elektrische Stimulation von Afferenzen induziert. Diese Form der synaptischen Plastizität wurde zum erstenmal 1973 von Bliss & Lomo im Hippocampus beobachtet. Eine Verminderung der synaptischen Antwort wird dagegen Langzeitdepression (LTD, "long-term depression") genannt. Eine verlässliche Induktion erfolgt meistens durch eine niederfrequente, im Bereich von Minuten durchgeführte Stimulation von Afferenzen. In vielen Gehirnregionen konnte bei glutamatergen Synapsen Langzeitplastizität beobachtet werden. Als Beispiele seien neben dem Hippocampus der Neocortex, das Cerebellum, die Amygdala und das Rückenmark genannt (als Übersichten siehe Bliss & Collingridge, 1993; Linden, 1994; Malenka, 1995).

1.2.1 Ca^{2+} -Abhängigkeit der LTP-/LTD-Induktion

Die Induktion aller Formen von LTP beziehungsweise LTD scheint generell von einer Erhöhung der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration abhängig zu sein (als Übersichten siehe Tsumoto, 1992; Bear & Malenka, 1994; Jodar & Kaneto, 1995). Neurone reagieren auf einen Ca^{2+} -Einstrom äußerst empfindlich, da die intrazelluläre Konzentration in etwa $0,1 \mu\text{M}$ und die extrazelluläre Konzentration ungefähr 2 mM beträgt. Für die Aufrechterhaltung dieses starken Konzentrationsgradienten existieren mehrere Mechanismen der Ca^{2+} -Sequestrierung (als Übersicht siehe McCormick, 1999). Sowohl im Hippocampus als auch im Neocortex erfolgt die für die Induktion von LTP beziehungsweise LTD notwendige Erhöhung der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration durch eine starke Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, spannungsabhängigen Ca^{2+} -Leitfähigkeiten (VDCCs, "L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels") oder metabotropen Glutamatrezeptoren (als Übersicht siehe Malenka, 1995). Auf Grund des spannungsabhängigen Mg^{2+} -Blocks fungiert der NMDA-Rezeptor hierbei als Koinzidenzdetektor der prä- und postsynaptischen Aktivität (Malenka & Nicoll, 1993; Markram et al., 1997). Nur wenn Glutamat an den Rezeptor gebunden ist und zeitgleich die Membran ausreichend depolarisiert ist, sodaß die Mg^{2+} -Ionen ihre Bindungsstelle verlassen, kann Ca^{2+} durch den NMDA-Rezeptor in die Zelle einströmen. Die Induktion der meisten Formen von synaptischer Langzeitplastizität ist von der Aktivierung der NMDA-Rezeptoren abhängig und läßt sich deswegen durch NMDA-Rezeptor-Antagonisten, wie D-APV oder MK-801, blockieren.

1.2.2 Bidirektionalität synaptischer Langzeitplastizität

In Abhängigkeit von der Stärke der Stimulation kann an vielen exzitatorischen Synapsen im ZNS sowohl LTP als auch LTD induziert werden. Dieser Bidirektionalität der synaptischen Langzeitplastizität liegen nach der "sliding threshold"-Theorie (Bienenstock et al., 1982; Bear, 1995) unterschiedliche Schwellenwerte der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration zugrunde. Nach heutiger Ansicht werden durch eine starke Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration Proteinkinasen (zum Beispiel die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II) aktiviert. Eine daraus resultierende Phosphorylierung von Substratproteinen induziert LTP. Im Gegensatz dazu führt eine geringere Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einer Aktivierung von Proteinphosphatasen (zum Beispiel Calcineurin), die durch Proteindephosphorylierung eine LTD auslösen (als Übersichten siehe Bear & Malenka, 1994; Tsumoto et al., 1996). Studien an Pyramidenneuronen der hippocampalen CA1-Region und des visuellen Cortex stützen diese Hypothese (Bröcher et al., 1992; Artola & Singer, 1993; Kirkwood et al., 1993; Tsumoto et al., 1996; Hansel et al., 1997).

1.2.3 Synaptischer Ort der LTP-/LTD-Expression

Im Gegensatz zur einhelligen Meinung, daß die Induktion von synaptischer Langzeitplastizität von einer Erhöhung der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration abhängt, wird der synaptische Ort der LTP-/LTD-Expression kontrovers diskutiert. Ob dabei post- und/oder präsynaptische Mechanismen beteiligt sind, wurde bisher vor allem mit indirekten Methoden untersucht. Da diese Analysen auf Annahmen bezüglich des Mechanismus der Transmitterfreisetzung basieren, lieferten sie gegensätzliche Ergebnisse. Tsien & Malinow (1990) zeigten, daß LTP mit einer Erhöhung der synaptischen Variabilität assoziiert ist. Sie schlossen daraus auf einen präsynaptischen Mechanismus der LTP-Expression. Im Gegensatz dazu machten Manabe et al. (1992) postsynaptische Veränderungen für die von ihnen während einer LTP beobachteten Amplitudenvergrößerung von "Minis" (mEPSCs, "miniature EPSCs") verantwortlich. Beide Studien wurden an Pyramidenneuronen der hippocampalen CA1-Region durchgeführt. Einen etwas direkteren experimentellen Ansatz zur Klärung des synaptischen Ortes der LTP-/LTD-Expression bietet die mikroiontophoretische Applikation von Glutamat. Untersuchungen mit dieser Technik lieferten jedoch ebenfalls kontroverse Ergebnisse (Lynch et al., 1976; Davies et al., 1989; Cormier et al., 1993). Aus diesem Grund betonten Bliss & Fazeli (1996) die Notwendigkeit von Applikationstechniken, mit denen die synaptische Transmission imitiert werden kann. Die einzige derzeit verfügbare Technik, mit der im Hirnschnitt visualisierte neuronale Strukturen mit einer hinreichend

hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung stimuliert werden können, ist die vor kurzem von Dodt et al. (1999) entwickelte Infrarot-gelenkte Photostimulation (siehe Abschnitt 2.2).

1.2.4 Räumliche Spezifität synaptischer Langzeitplastizität

Nach dem klassischen Konzept von Hebb (1949) ist für die Induktion von synaptischer Plastizität eine Koinzidenz von prä- und postsynaptischer Aktivität notwendig. Die Frage, inwieweit die Expression einer dadurch ausgelösten Langzeitplastizität spezifisch an einer einzelnen, repetitiv aktivierten Synapse erfolgt, beziehungsweise sich auf benachbarte Synapsen ausbreitet, konnte bis heute mangels geeigneter Untersuchungstechniken nicht befriedigend beantwortet werden. LTP und LTD werden ausschließlich in dendritischen Regionen induziert, in denen eine starke synaptische Transmission erfolgte. Diese sogenannte Eingangsspezifität konnte experimentell jedoch nur für große Gruppen von Synapsen nachgewiesen werden. Dies gilt sowohl für den Neocortex als auch für die CA1-Region des Hippocampus (Kirkwood et al., 1993; Malenka & Nicoll, 1999). Einen direkten experimentellen Ansatz zur Untersuchung der räumlichen Spezifität von LTP in der CA1-Region des Hippocampus verwendeten Engert & Bonhoeffer (1997). In dieser Arbeit wurde in organotypischen Schnittkulturen für die räumliche Ausbreitung von LTP ein Wert von ungefähr 70 μm bestimmt. Hierfür wurde die LTP durch eine extrazelluläre elektrische Stimulation an Synapsen induziert, die zuvor durch eine spezielle Superfusionstechnik von benachbarten Synapsen pharmakologisch isoliert worden waren. Da die verwendete Superfusionstechnik eine räumliche Auflösung von maximal 30 μm besitzt, erlaubt diese Studie ebenfalls keine eindeutige Aussage über die räumliche Spezifität von Langzeitplastizität an einzelnen oder wenigen Synapsen.

1.3 Der zerebrale Cortex beim Säugetier

1.3.1 Aufbau, Funktion und Entwicklung

Die Großhirnrinde der Säugetiere gliedert sich in das limbische System und den Neocortex, der beim Menschen ungefähr 80 % des Gehirnvolumens ausmacht. In Analogie zum Bulbus olfactorius, dem Hippocampus und dem Cerebellum zeichnet sich der Neocortex durch einen mehrlagigen geschichteten Aufbau aus. Für diese Laminierung sind Unterschiede in der Zusammensetzung und Dichte der Zellen, der Form und Größe ihrer Somata, sowie der Faserprojektionen verantwortlich (als Übersicht siehe Sheperd,

1990). Nach Brodman (1909) wird der Neocortex in sechs Schichten (Lamina I – VI) eingeteilt, die zwischen der Pia mater und der weißen Substanz liegen (Abbildung 1.3). Funktionell unterscheidet man innerhalb des Neocortex zwischen sensorischen, motorischen und Assoziationsarealen. Die Kommunikation zwischen den einzelnen Cortexregionen findet ipsilateral über sogenannte Assoziationsfasern statt. Die über den Balken laufenden Kommissurenfasern verbinden Areale, die in unterschiedlichen Hemisphären liegen.

Innerhalb der ersten zwei postnatalen Wochen finden im Neocortex starke entwicklungsbedingte anatomische und physiologische Veränderungen statt. Die Neurone nehmen in dieser Zeit an Größe und Komplexität zu, etablieren die charakteristische laminäre Schichtung und bilden ein nahezu adultes Innervationsmuster aus (Wise & Jones, 1978; van Eden et al., 1990; Burgard & Hablitz, 1993b; Sutor & Luhmann, 1995).

Abb. 1.3: Schichtung des Neocortex höherer Säugetiere. Links: Golgi-Imprägnation, rechts: Nisslfärbung. Verändert nach Creutzfeld (1983).

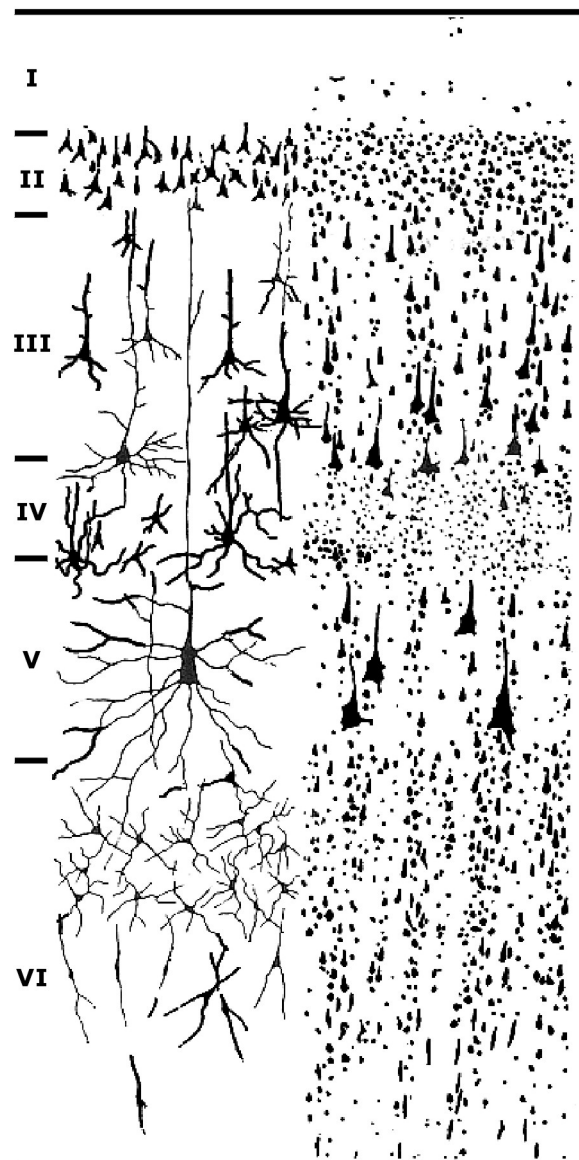
Lamina I, die äußere plexiforme Schicht, enthält nur wenige Somata und besteht vorwiegend aus den Ausläufern apikaler Dendriten und parallel zur Cortexoberfläche verlaufenden Axonen.

In Lamina II (äußere granuläre Schicht) und Lamina III sind vorwiegend Pyramidenneurone kleiner und mittlerer Größe sowie Interneurone (zum Beispiel Sternzellen) lokalisiert. Die Pyramidenneurone dieser Schichten bilden Verbindungen zu anderen Cortexarealen aus.

Lamina IV wird als innere granuläre oder innere Körnerschicht bezeichnet und ist das primäre Ziel der Afferenzen aus dem Thalamus. Sie enthält hauptsächlich Sternpyramidenzellen und Sternzellen. Diese Schicht ist besonders in den sensorischen Gebieten ausgeprägt und fehlt in den motorischen Arealen.

In Lamina V, der ganglionären Schicht, sind große Pyramidenneurone und Interneurone lokalisiert. Der motorische Cortex enthält die größten Pyramidenneurone, die sogenannten Betzzellen. Die Lamina V Pyramidenneurone projizieren zu subcorticalen Gebieten, wie dem Hirnstamm, dem Rückenmark und den Basalganglien.

Lamina VI, die Spindelzellschicht, wird von Spindelzellen und wenigen mittelgroßen Pyramidenneuronen gebildet. Die dieser Schicht entspringenden Projektionen zum Thalamus dienen der Informationsrückkopplung. Einige Autoren unterscheiden noch eine von Lamina VI verschiedene siebte Schicht.



Neocorticale Zelltypen können nach verschiedenen Kriterien eingeteilt werden. Eine Möglichkeit ist die Differenzierung entsprechend dem Vorhandensein dendritischer Dornfortsätze ("spines") (Sheperd, 1990). Vieles deutet darauf hin, daß neocorticalen Nervenzellen mit dendritischen Dornfortsätzen eine exzitatorische Funktion zukommt. Die Mehrheit der bedornten Neurone sind Pyramidenzellen. Sie machen ungefähr zwei Drittel der Gesamtpopulation der Neurone im Neocortex aus. Die Nervenzellen mit "glatten" Dendriten ("smooth cells" oder "non-spiny neurones") bilden die Population der lokal projizierenden, inhibitorischen Interneurone. Diese morphologisch äußerst heterogenen Nervenzellen können nach der Form und Verteilung der axonalen Ramifikationen klassifiziert werden. Als Beispiele seien Korbzellen, Kandelaberzellen und "Double-Bouquet"-Zellen genannt (Szentágothai, 1975, 1978; Peters & Kimerer, 1981). Die meisten neocorticalen Interneurone enthalten neben dem Neurotransmitter GABA neuroaktive Peptide (zum Beispiel das Neuropeptid Y, Somatostatin und Cholecystokinin), deren physiologische Bedeutung jedoch weitgehend ungeklärt ist. Inhibitorische Synapsen vermitteln im Neocortex entweder eine rekurrente Hemmung oder eine Vorwärtshemmung (als Übersicht siehe Benardo & Wong, 1995).

1.3.2 Pyramidenneurone der Lamina V

Die Pyramidenneurone der Lamina V sind die größten Zellen, die im Neocortex vorkommen. Ihr großes Soma ist für die Versorgung der ausgedehnten Dendriten- und Axonbäume notwendig. Die wesentlichen morphologischen Merkmale dieser Nervenzellen sind der pyramidenförmige Zellkörper und der apikale Dendrit, der die Lamina V bis I durchläuft. Im Cortex des Menschen kann er eine Länge von 2,5 mm erreichen (Marin-Padilla, 1967). Im neocorticalen Netzwerk nehmen die Lamina V Pyramidenneurone eine besondere Stellung ein, da sie es sind, die zehntausende exzitatorische und inhibitorische synaptische Eingänge aus allen Laminae und dem Thalamus integrieren (siehe Abschnitt 1.4) und die so erhaltenen Informationen an subcorticale Regionen, wie das Tectum, das Striatum, die Pons, das Mittelhirn und das Rückenmark, weiterleiten. Erregende Nervenzellen bilden mit Lamina V Pyramidenneuronen asymmetrische Axon-Dornfortsatz-Synapsen, hemmende Interneurone dagegen symmetrische Axon-Dendrit-, Axon-Soma-, und Axon-Axon-Synapsen aus (als Übersichten siehe Martin, 1991; Connors & Amitai, 1995; Hammond, 1996).

1.4 Synaptische Integration

Ein einzelnes Pyramidenneuron empfängt über den apikalen und die basalen Dendriten zehntausende exzitatorische und inhibitorische synaptische Eingänge. Der Prozeß, in dem die Dendriten die eingehenden Signale koordinieren und in ihrer Effizienz modulieren, wird synaptische Integration genannt. Er hängt von den passiven und aktiven dendritischen Eigenschaften ab (als Übersichten siehe Johnston et al., 1996; Yuste & Tank, 1996; Stuart et al., 1997; Magee et al., 1998).

1.4.1 Passive Eigenschaften der Dendriten

Im Dendritenbaum generierte synaptische und regenerative Potentiale werden in Richtung des Somas und des Axons weitergeleitet. Auf Grund der passiven elektrotonischen Eigenschaften der Dendriten wird hierbei die Amplitude der Potentialänderungen vermindert und die Kinetik verlangsamt. Die Stärke dieses elektrotonischen Effektes hängt proportional von der Laufstrecke des elektrischen Signals und dem Längswiderstand (R_i) und umgekehrt proportional vom Radius des Dendriten und dem spezifischen Membranwiderstand (R_m) ab. Schnelle Signale werden stärker durch die "Elektrotonik" beeinflusst als langsame Signale (Rall, 1977; Rall & Segev, 1985; Spruston et al., 1993, 1994; Stuart & Spruston, 1998). Mit Hilfe des von Rall & Segev (1985) entwickelten "equivalent cylinder" Modells kann die elektrotonische Amplitudenabschwächung quantifiziert werden. Der Dendrit wird hierbei als einzelner Zylinder betrachtet und ist durch seine elektrotonische Länge (L) charakterisiert (siehe Abschnitt 3.3.3.1).

1.4.2 Aktive Eigenschaften der Dendriten

Die Vorstellung vom Dendriten als rein passives "Kabel" wurde in den letzten Jahren durch zahlreiche Studien revidiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß in der dendritischen Membran spannungsabhängige Ionenkanäle lokalisiert sind, die unter anderem die Weiterleitung von elektrischen Signalen aktiv modulieren. Als Beispiele seien einige repräsentative Ergebnisse beschrieben: **(1)** Die Dendriten neocorticaler Pyramidenneurone besitzen spannungsabhängige Na^+ -Kanäle, die die in den Dendriten zurücklaufenden, somatisch generierten Aktionspotentiale (APs) aktiv weiterleiten (Stuart & Sakmann 1994). Die Koinzidenz von rekurrenten APs und exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSPs) scheint für die Induktion von LTP beziehungsweise LTD wichtig zu sein (Markram et al., 1997). **(2)** In der gesamten dendritischen Membran

neocorticaler Pyramidenneurone sind spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle lokalisiert (Sutor & Zieglgänsberger, 1987; Deisz et al., 1991; Yuste et al., 1994; Schiller et al., 1995). Die Aktivierung dieser Kanäle ermöglicht die Initiierung Ca^{2+} -abhängiger APs (Frick et al., zur Publikation eingereicht) und die Induktion von synaptischer Langzeitplastizität (siehe Abschnitt 1.2.1). **(3)** Cash & Yuste (1998) konnten zeigen, daß dendritische K^+ -Kanäle vom transienten A-Typ und NMDA-Rezeptoren die Summation von EPSPs linearisieren und positionsunabhängig machen. Sowohl die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle, als auch die NMDA-Rezeptoren sind an den Dendriten von Pyramidenneuronen ungleichförmig verteilt (Hoffman et al., 1997; Dodt et al., 1998). **(4)** Die Ergebnisse einer Studie von Stuart & Spruston (1998) deuten darauf hin, daß Ionenkanäle, die den durch Hyperpolarisation aktivierten depolarisierenden I_h -Strom vermitteln, in der Membran des apikalen Dendriten von Lamina V Pyramidenneuronen ebenfalls ungleichförmig verteilt sind und hyperpolarisierende Potentialänderungen in der Amplitude modulieren.

1.5 Untersuchungsgegenstand der Arbeit

Viele grundlegende neurobiologische Fragestellungen konnten bis heute mangels geeigneter Visualisierungs- und Applikationstechniken nicht geklärt werden. Als Beispiele seien der Ort der LTP-/LTD-Expression (siehe Abschnitt 1.2.3), die räumliche Spezifität von synaptischer Langzeitplastizität (siehe Abschnitt 1.2.4) und die Verteilung von funktionellen GABA-Rezeptorsubtypen auf einzelnen Neuronen (siehe Abschnitt 1.1.2.3) genannt.

Die vor kurzem entwickelte Methode der Infrarot-gelenkten Photostimulation ermöglicht es nun, Nervenzellen zu visualisieren und einzelne Strukturen an einem Neuron durch photolytische Applikation von Neurotransmittern zu stimulieren (siehe Abschnitt 2.2). Die daraus resultierenden Antworten der Nervenzelle können mit der "Patch-Clamp"-Technik abgeleitet werden (siehe Abschnitt 2.3.2). Durch die sehr große räumliche und zeitliche Auflösung kann mit der Infrarot-gelenkten Photostimulation synaptische Transmission imitiert und die Verteilung funktioneller Neurotransmitterrezeptoren auf einzelnen Neuronen studiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten mit dieser Technik folgende grundlegende Fragestellungen untersucht werden:

(1) Kann durch Applikation von Glutamat am apikalen Dendriten von neocorticalen Lamina V Pyramidenneuronen der Ratte ein LTP- und/oder LTD-ähnlicher Effekt induziert werden?

(2) Wie groß ist gegebenenfalls die räumliche Spezifität dieses Effektes?

(3) Ist synaptisch induzierte LTD im somatosensorischen Neocortex mit einer Reduktion der postsynaptischen Glutamatsensitivität assoziiert?

Die Untersuchung dieser Fragen sollte Aufschluß über den Ort, an dem die LTP-/LTD-Expression stattfindet, und ein Maß für die Speicherdichte für Informationen im ZNS geben.

(4) Wie sind GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren relativ zueinander auf der Membran des apikalen Dendriten von Pyramidenneuronen der Lamina V verteilt?

Diese Fragestellung sollte durch eine Kartierung der GABA-Sensitivität des apikalen Dendriten mittels Applikation von GABA untersucht werden. Da synaptische Verbindungen mit der Verteilung der entsprechenden Rezeptoren korreliert sind, könnte die Beantwortung dieser Frage zum Verständnis des neuronalen Netzwerkes im Neocortex und der synaptischen Integration (siehe Abschnitt 1.4) von GABAergen Eingängen beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation der neocorticalen Hirnschnitte

Für alle Experimente wurden männliche Albinoratten (*Rattus norvegicus familiaris*, Zuchtreihe Sprague Dawley) verwendet. Zur Anfertigung der Schnitte wurden Tiere mit einem Alter von 14 - 21 Tagen benutzt, weil die Nervenzellen junger Tiere unempfindlicher gegen Anoxie sind und leichter mit der "Patch-Clamp"-Technik abgeleitet werden können als die von erwachsenen Ratten.

Die Tiere wurden mit Äther narkotisiert und dann dekapitiert. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten unter gekühlter (2 - 4 °C) und mit Carbogen (95 % O₂/5 % CO₂) gesättigter künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF, Zusammensetzung (mM): NaCl 125; KCl 2,5; NaH₂PO₄ 1,25; MgCl₂ 1; Glucose 25; NaHCO₃ 25; CaCl₂ 2; pH 7,38). Sie wurden rasch und mit äußerster Vorsicht durchgeführt, um das Gehirn weder durch Berührung noch durch Druck zu schädigen. Mittels einer Schere wurde mit einem sagittal geführten Schnitt durch die Kopfhaut der Schädel freigelegt. Anschließend erfolgten zwei Transversalschnitte von caudal und ein flach geführter Sagittalschnitt entlang der Mittellinie nach rostral. Die so eröffnete Schädelkalotte wurde mit einer Knochenzange nach beiden Seiten bis zum Bregma abgehoben. Das Gehirn konnte nun, nach Durchtrennung der Nervi optici und des verlängerten Rückenmarks, mit einem gerundeten Spatel aus dem Schädel herausgelöst werden. Nach gründlicher Kühlung (1 - 2 min) wurde das Gehirn mit der Basis nach unten auf ein mit ACSF getränktes Filterpapier gelegt. Durch einen Sagittalschnitt ungefähr 3 mm von der Mittellinie mit einer in Aceton und Ethanol gereinigten Rasierklinge wurde nun die Schnittfläche hergestellt, mit der der Gehirnblock später auf einen Plexiglasquader geklebt wurde. Die andere Hirnhälfte, das Kleinhirn, der frontale Teil des Endhirns sowie das basale Gehirn wurden abgetrennt. Nachdem der Gehirnblock mit Cyanoacrylatklebstoff auf einen Plexiglasquader aufgeklebt und in ein mit ACSF gefülltes Schneidegefäß überführt worden war, wurden mit einem Vibratom (FTB, Mayer) 300 µm dicke Sagittalschnitte angefertigt (Klingen: Vibratom Blades, TIM Ltd.). Die fertigen Hirnschnitte wurden mit dem weiten Ende einer Pasteurpipette in Gefäße mit Carbogen-gesättigter ACSF überführt und ungefähr 20 min bei 34 °C inkubiert. Anschließend wurden sie bis zum Überführen in die Ableitkammer bei Raumtemperatur (22 - 24 °C) aufbewahrt.

2.2 Infrarot-gelenkte Photostimulation

Die Infrarot-gelenkte Photostimulation (Abbildung 2.3) ist eine Kombination aus Infrarot-Videomikroskopie und Photostimulation. Mit dieser Technik können an visualisierten Strukturen von Neuronen Substanzen (zum Beispiel Neurotransmitter) appliziert werden. Da diese Technik eine sehr große räumliche und zeitliche Auflösung ermöglicht, ist sie gut geeignet, um synaptische Transmissionsvorgänge zu imitieren, die Verteilung funktioneller Neurotransmitterrezeptoren auf einzelnen Neuronen zu studieren und neuronale Netzwerke zu untersuchen.

2.2.1 Infrarot-Videomikroskopie

Mit Hilfe der Infrarot (IR)-Videomikroskopie können Soma, Dendrit und Axon einzelner Nervenzellen im lebenden Hirnschnitt sichtbar gemacht werden (MacVicar, 1984; Dodt & Zieglgänsberger, 1990, 1994; Abbildung 2.1). Das grundlegende Prinzip dieser Technik besteht darin, daß langwelliges IR-Licht biologisches Gewebe leichter durchdringt, als sichtbares Licht. Da der Kontrast der limitierende Faktor für die Visualisierung kleiner Strukturen (zum Beispiel dendritische Dornfortsätze) ist, kann der Verlust an räumlicher Auflösung, der bei Verwendung von langwelligem Licht auftritt, in Kauf genommen werden.

Für die Infrarot-Videomikroskopie wurde ein Mikroskop der Fa. Zeiss (Axioskop FS) verwendet. Durch einen zwischen Halogenlampe und Kondensator positionierten Infrarot-Interferenzfilter konnte lediglich IR-Licht mit einer maximalen Wellenlänge von 780 nm in den Strahlengang des Mikroskops gelangen. Das Mikroskop war mit einem Öl-Immersionenkondensator (numerische Apertur 1,4; Zeiss) und einem 60X Wasser-Immersionobjektiv (numerische Apertur 0,9; Olympus) ausgestattet. Durch einen Strahlenteiler wurde das Bild gleichzeitig auf zwei infrarotsensitive Videokameras (Hamamatsu) projiziert. Ein zwischen Mikroskop und Videokamera positionierter Vergrößerungstubus vergrößerte das Bild für eine der beiden Kameras um den Faktor 4. Eine Verstärkung des Kontrastes wurde zum einen durch eine in den Videokameras eingebaute Kontrastverstärkung und zum anderen durch ein neu entwickeltes Gradientenkontrast (GC)-Verfahren (Dodt et al., 1999) erreicht. Das Prinzip dieser Technik ist die Minimierung von Streulicht und die Erzeugung eines Beleuchtungsgradienten in zwei orthogonalen Richtungen. Im Vergleich zum Differential-Interferenzkontrast nach Nomarski (DIC) wird mit dem Gradientenkontrast (Abbildung 2.3) eine um ungefähr 50 % größere Visualisierungstiefe im Schnitt und ein sehr viel höherer Kontrast erreicht. Da für das GC-System keine optischen Elemente zur

Kontrastverstärkung hinter dem Objektiv plaziert werden müssen, gelangt auch bei hohen Vergrößerungen genügend Licht in die Videokamera. Die Videobilder wurden auf zwei Schwarz-Weiß-Monitoren sichtbar gemacht. Sie konnten mit Hilfe von Videorekordern (Panasonic) aufgezeichnet werden. Während oder nach dem Experiment konnten die Bilder entweder auf einem Thermo-Videoprinter (Panasonic) ausgedruckt oder über ein Digitalisierungssystem (Argus-20, Hamamatsu) direkt von einem Computer eingelesen und anschließend mit einem Bildverarbeitungsprogramm (Adobe Photoshop) weiterbearbeitet werden. Dadurch konnten elektrophysiologische und neuroanatomische Daten miteinander korreliert werden.

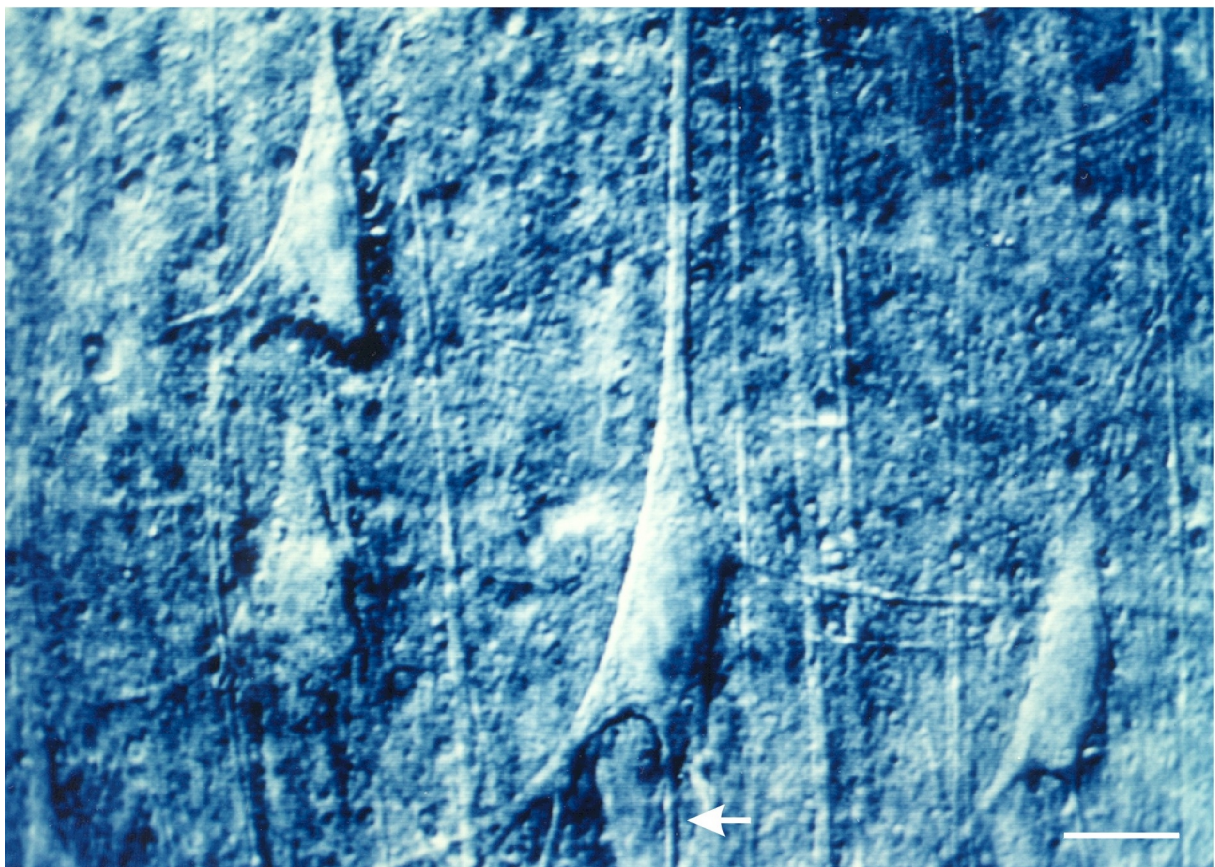


Abb. 2.1: Visualisierung von Nervenzellen im lebenden Hirnschnitt mit Infrarot-Videomikroskopie. Die Abbildung zeigt Lamina II/III Pyramidenneurone des visuellen Cortex der Ratte. Neben dem Soma sind deutlich der apikale Dendrit, basale Dendriten sowie der Beginn des Axons (Pfeil) zu erkennen. Der Skalierungsbalken entspricht 10 μm . Verändert nach Dodt & Zieglgänsberger (1998).

2.2.2 Laser-Photostimulation

Das Grundprinzip der Laser-Photostimulation ist die photolytische Freisetzung einer biologisch aktiven Substanz aus einer durch Veresterung inaktivierten Verbindung

("caged" Verbindung). Durch energiereiches ultraviolettes (UV) Licht wird die kovalente Esterbindung photolytisch gespalten und das biologisch aktive Molekül freigesetzt (Abbildung 2.2). Dieser schnelle Prozeß führt zu einem sofortigen Anstieg in der Konzentration von Neurotransmittern oder sekundären Botenstoffen (McCray & Trentham, 1989; Adams & Tsien, 1993; Hess et al., 1995). Durch eine zusätzliche Fokussierung des UV-Lichts auf einen kleinen Punkt kann Information über räumliche Signalereignisse gewonnen werden (O'Neill et al., 1990; Callaway & Katz, 1993; Wang & Augustine, 1995).

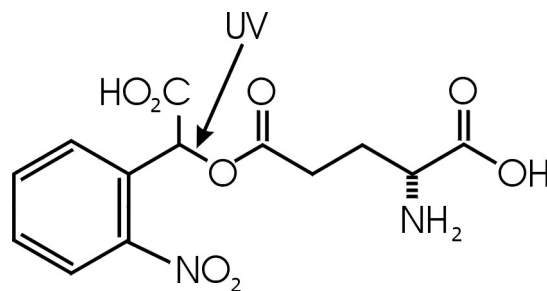


Abb. 2.2: "Caged" Glutamat. Der Neurotransmitter ist durch Veresterung inaktiviert. Durch UV-Licht kann die Esterbindung (Pfeil) gespalten werden. Das dadurch freigesetzte L-Glutamat kann dann an spezifische Rezeptoren binden und diese aktivieren.

Für die Experimente der vorliegenden Dissertation wurde zur Photolyse von caged Glutamat beziehungsweise caged GABA zuerst ein Helium/Cadmium-Laser (Liconix) und später ein Argon-Ionenlaser (Enterprise II, Coherent) verwendet. Die UV-Strahlung des Lasers wurde über eine Quarzfaser mit einem Durchmesser von 25 μm in den Auflichtstrahlengang des Mikroskops eingekoppelt und über einen dichroitischen Strahlenteiler (FT 460) von oben in das Objektiv eingespiegelt. Durch den dichroitischen Spiegel gelangte ausschließlich Licht mit einer Wellenlänge von < 460 nm auf die Hirnschnitte. Der Laser emittierte UV-Licht mit einer Wellenlänge von 351-364 nm. Durch das Objektiv wurde die Strahlung des Lasers in den Brennpunkt des Objektivs und somit in die Fokalebene gebündelt. Der daraus resultierende Lichtpunkt hatte einen Durchmesser von 1 μm . Da die Strahlung des Lasers im Hirnschnitt nicht sichtbar ist, wurde vor den Experimenten mit Hilfe eines fluoreszierenden Papiers der Lichtpunkt auf eine Markierung am Bildschirm eingestellt. Mit Hilfe dieser Markierung konnte die genaue Position der Stimulation während des Versuchs festgestellt werden. Mit den Mikromanipulatoren konnte das Mikroskop relativ zum Hirnschnitt bewegt (siehe Abschnitt 2.3.1) und das Neuron dadurch an verschiedenen Stellen stimuliert werden. Über eine Steuereinheit (Luigs und Neumann) und einen Computer mit spezieller Software (mpc Software, Luigs und Neumann) war es möglich, die Entfernung zu einem zuvor festgelegten Referenzpunkt auf 1 μm genau zu messen. Die Dauer der applizierten Lichtpulse konnte

über einen sogenannten Shutter (Uniblitz) reguliert werden. Der Shutter wurde durch einen Taktgeber (RKE, Digitimer Ltd. 4030) oder einen Computer mit der entsprechenden Software (Pulse, HEKA) über einen AD-Wandler (ITC 16, HEKA) getriggert. Die Öffnungsdauer war ab 3 ms konstant. Dadurch betrug die kürzeste konstante Applikationsdauer 3 ms. Die Stimulationsstärke wurde bei Verwendung des Helium/Cadmium-Lasers durch Transmissionsfilter eingestellt. Beim Argon-Ionenlaser konnte die Intensität der emittierten UV-Strahlung direkt am Gerät in Schritten von jeweils 1 mW auf einen Wert zwischen 0 - 90 mW eingestellt werden. Die durch die Photolyse am Neuron ausgelösten Veränderungen des Membranpotentials wurden mit der "Patch-Clamp"-Technik abgeleitet (siehe Abschnitt 2.3.2).

2.2.3 Caged Substanzen

Für die Versuche wurde (CNB)-caged Glutamat¹ in einer Konzentration von 0,5 mM und (CNB)-caged GABA² in einer Konzentration von 1 mM verwendet. Diese Verbindungen wurden von Molecular Probes bezogen. Vorteile der CNB-Gruppe gegenüber anderen "caging" Gruppen sind eine hohe "uncaging" Rate und Wasserlöslichkeit. Weiterhin sind (CNB)-caged Verbindungen äußerst inert. Im Hirnschnitt sind caged Glutamat und caged GABA physiologisch inaktiv. Durch ausreichende Beleuchtung mit UV-Licht wird physiologisch aktives Glutamat innerhalb von 21 μ s zu 90 % mit einer maximalen Quantenausbeute von 14 % freigesetzt (Wieboldt et al., 1994). Die maximal erreichbare freie Konzentration von Glutamat betrug deshalb 50 μ M.

Eine spontane Spaltung der caged Verbindung, zum Beispiel durch das Raumlicht, könnte zu einer Desensibilisierung der entsprechenden Rezeptoren führen. Um die Stabilität der (CNB)-caged Verbindungen unter Versuchsbedingungen zu untersuchen, wurden die Amplituden und Anstiegszeiten synaptisch ausgelöster EPSPs (siehe Abschnitt 2.3.3) vor und nach Einwaschen von (CNB)-caged Glutamat (0,5 mM) analysiert. Es konnte jedoch weder für die Amplitude, noch für die Anstiegszeit (20 - 80 %) eine statistisch signifikante Beeinflussung durch caged Glutamat festgestellt werden. Die Amplitude betrug im Mittel $6,3 \pm 0,8$ mV vor und $6,1 \pm 0,9$ mV nach Einwaschen der caged Substanz (Mittelwerte \pm S.E.M., $p > 0,5$; t-Test). Die Werte für die Anstiegszeit waren $5,0 \pm 0,7$ ms in Abwesenheit und $4,5 \pm 0,6$ ms in Anwesenheit von caged Glutamat ($n = 6$ Neurone, $p > 0,1$). Für jedes Neuron wurden 15 EPSPs vor und nach dem Einwaschen gemittelt. Weiterhin konnte keine Veränderung des Ruhemembranpotentials

¹ γ -(α -Carboxy-2-nitrobenzyl)-glutamat

² O-(α -Carboxy-2-nitrobenzyl)- γ -aminobutyrat

sowie der Spontanaktivität im Hirnschnitt beobachtet werden. Eine Desensitisierung der entsprechenden Rezeptoren kann deshalb ausgeschlossen werden.

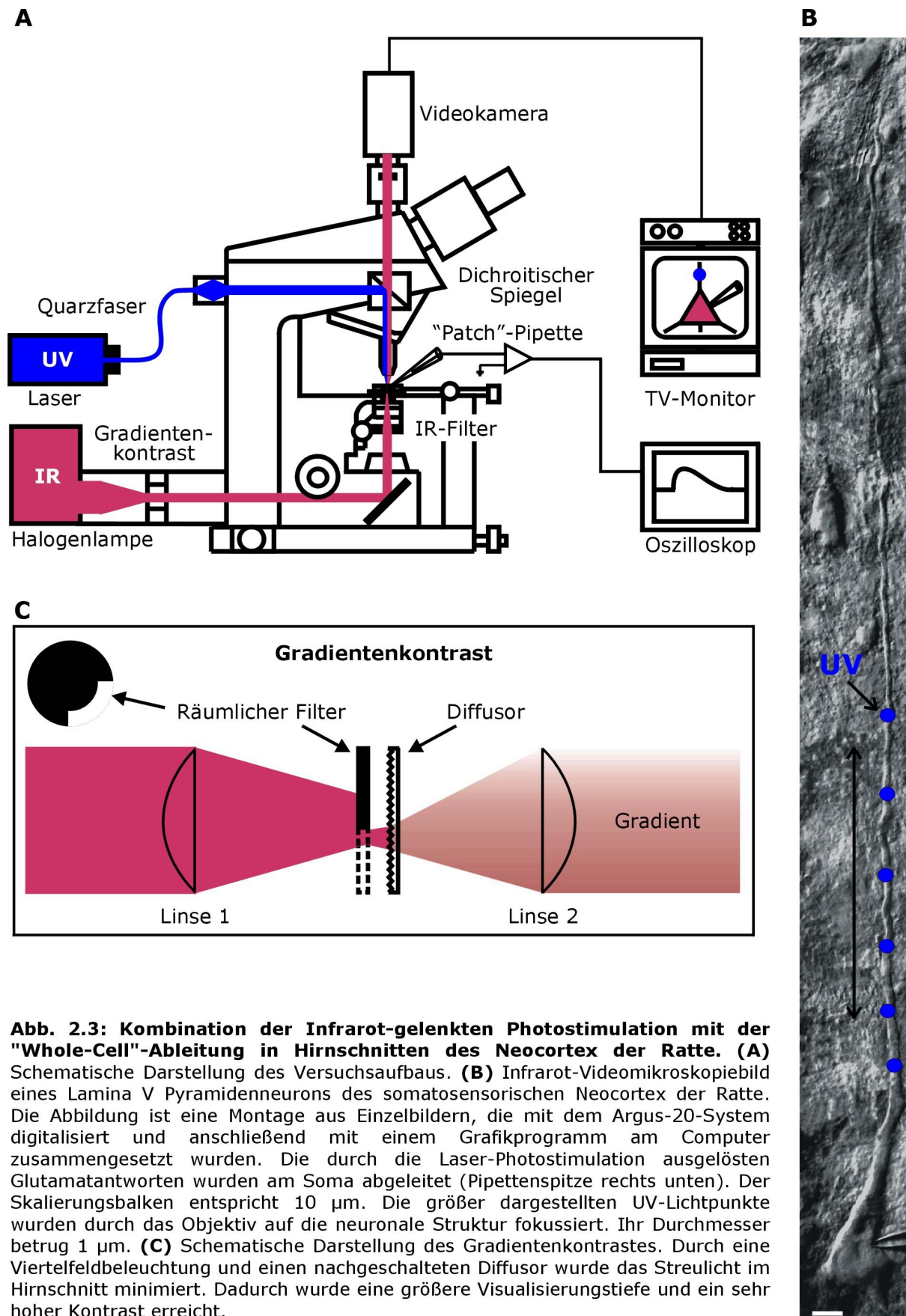


Abb. 2.3: Kombination der Infrarot-gelenkten Photostimulation mit der "Whole-Cell"-Ableitung in Hirnschnitten des Neocortex der Ratte. (A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. **(B)** Infrarot-Videomikroskopiebild eines Lamina V Pyramidenneurons des somatosensorischen Neocortex der Ratte. Die Abbildung ist eine Montage aus Einzelbildern, die mit dem Argus-20-System digitalisiert und anschließend mit einem Grafikprogramm am Computer zusammengesetzt wurden. Die durch die Laser-Photostimulation ausgelösten Glutamatantworten wurden am Soma abgeleitet (Pipettenspitze rechts unten). Der Skalierungsbalken entspricht 10 μm . Die größer dargestellten UV-Lichtpunkte wurden durch das Objektiv auf die neuronale Struktur fokussiert. Ihr Durchmesser betrug 1 μm . **(C)** Schematische Darstellung des Gradientenkontrastes. Durch eine Viertelfeldbeleuchtung und einen nachgeschalteten Diffusor wurde das Streulicht im Hirnschnitt minimiert. Dadurch wurde eine größere Visualisierungstiefe und ein sehr hoher Kontrast erreicht.

2.3 Elektrophysiologie

2.3.1 Versuchsaufbau

Für die elektrophysiologischen Experimente war das verwendete Infrarot-Mikroskop mit einem System motorisierter Mikromanipulatoren (Luigs und Neumann) ausgestattet. Hierdurch konnten das Mikroskop, die Ableitkammer, die Patch-Pipette und eine Stimulationselektrode unabhängig voneinander in allen drei Raumrichtungen bewegt werden. So war es möglich, die Hirnschnitte nach für die Ableitung brauchbaren Neuronen zu durchsuchen und den apikalen Dendriten zu verfolgen. Für die Versuche wurde eine Ableitkammer vom "submerged"-Typ (Alger, 1984) verwendet, die für Ganzzellaufbauten vorteilhaft ist (Blanton et al., 1989). Zur Fixierung der Hirnschnitte am Kammerboden diente ein mit dünnen Nylonfäden bespannter Platinrahmen.

Die Kammer wurde mit Carbogen-gesättigter ACSF durchspült, wodurch eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Neurone gewährleistet war. Der Zufluß aus einem Vorratsgefäß erfolgte mittels Schwerkraft und wurde auf einen Wert von 3 ml pro Minute eingestellt. Der Abfluß erfolgte ebenfalls mittels Schwerkraft. Nachdem im Hirnschnitt für die Ableitung brauchbare Neurone (plastisch wirkende Zellen mit einer glatten Membran) ausgewählt worden waren, wurde auf ein zusätzliches Zu- und Ablaufsystem umgeschaltet. Über dünne Teflonschläuche, die über eine Schlauchpumpe liefen, wurde ein kleines Volumen (3 ml) ACSF rezirkuliert und reoxygeniert. Dieses Rezirkulationssystem wurde aus Kostengründen für die Experimente mit den sehr teuren caged Substanzen eingesetzt. Es ermöglichte stabile Ableitungen für 1 - 3 h. Die verwendeten caged Verbindungen und Pharmaka wurden nach Aufzeichnung der Strom-Spannungsbeziehung des abgeleiteten Neurons (siehe Abschnitt 2.3.2.2) der rezirkulierenden ACSF zugesetzt. Es dauerte ungefähr 10 min, bis die Substanzen vollständig eingewaschen waren. Nach dieser Zeit konnte mit den Photostimulationsexperimenten begonnen werden.

2.3.2 Ganzzellaufbau

Die Ableitung einzelner Lamina V Pyramidenneurone des somatosensorischen Neocortex der Ratte erfolgte mit der "Patch-Clamp"-Technik (Stuart et al., 1993). Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Ableitung mit scharfen Mikroelektroden besteht vor allem in dem sehr hohen Abdichtungswiderstand zwischen der Pipettenspitze und der Zellmembran im Bereich von $G\Omega$ ("Giga-seal"). Das daraus resultierende gute Signal/Rausch-Verhältnis

ermöglicht die Messung sehr kleiner Ströme beziehungsweise Potentialänderungen. Als Beispiel sei die Ableitung von Einzelkanalströmen an einem Membranfleck ("Patch") genannt (Neher et al., 1978). Weiterhin kann die elektrische Aktivität ganzer Zellen in der sogenannten "Whole-Cell"-Konfiguration gemessen werden (Blanton et al., 1989; Edwards et al., 1989). Da für die Ganzzelleableitung normalerweise niederohmige Pipetten verwendet werden, können der Pipettenlösung zugesetzte Pharmaka in die Zelle diffundieren. Dies ermöglicht zum Beispiel eine intrazelluläre Blockade von Ionenkanälen oder eine Pufferung von Ca^{2+} -Ionen durch Komplexbildner. Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Ableitungen erfolgten in der "Whole-Cell"-Konfiguration.

2.3.2.1 Pipetten

Die Pipetten wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren mit Innenfilament (Clark, Electromedical Instruments) mit einem Horizontalziehgerät (DMZ-Universalpuller, Zeitz) angefertigt und hitzepoliert. Der Innendurchmesser der Kapillaren betrug 0,86 mm, der Außendurchmesser 1,5 mm. Durch Veränderung verschiedener Parameter am Ziehgerät konnten der Spitzendurchmesser und die Spitzenform der Pipetten für die jeweilige Anwendung optimal eingestellt werden. Die Intrazellulärlösung hatte folgende Zusammensetzung (in mM): K-Gluconat 130; KCl 5; HEPES 10; EGTA 0,5; Mg-ATP 2; Glucose 5. Der pH-Wert wurde mit 1 molarer KOH auf 7,2 eingestellt. Die Osmolarität betrug 260 – 270 mosM (Andreasen & Hablitz, 1994). Für die Ableitungen der Neurone am Soma betrug die Gleichstromwiderstände der gefüllten Pipetten 4 – 7 M Ω . Dies entspricht einem Spitzendurchmesser von ungefähr 1 μm . Für die dendritischen Ableitungen wurden 8 - 11 M Ω -Pipetten verwendet.

2.3.2.2 Etablierung der Ganzzelleableitung

Die Neurone wurden in der "Whole-Cell"-Konfiguration entweder im Brücken- oder im "Voltage-Clamp"-Modus abgeleitet. Hierzu waren die mit Intrazellulärlösung gefüllten Pipetten über einen chlorierten Silberdraht mit dem Verstärker (SEC 1L, Firma npi, Tamm) elektrisch verbunden. Der Stromkreis war über ein Silber/Silberchloridplättchen im Bad geschlossen. Die abgeleiteten Potentiale (Brückenmodus) beziehungsweise Ströme ("Voltage-Clamp"-Modus) wurden mit einem AD-Wandler (ITC 16, HEKA) digitalisiert und mit einem Macintosh-Computer und der entsprechenden Software (Pulse, HEKA) aufgezeichnet. Nachdem der Hirnschnitt nach einem für die Ableitung geeigneten Neuron durchsucht worden war, wurde die Ableitkammer um ungefähr 1 mm abgesenkt und die Pipettenspitze in der Fokalebene auf einen Punkt in der Bildmitte positioniert.

Anschließend wurde die Elektrode zurückgezogen, der Hirnschnitt mit der Ableitkammer wieder angehoben und das abzuleitende Neuron bei maximaler Vergrößerung auf diesen Punkt scharf gestellt. Durch langsames Wiedervorfahren der Ableitelektrode gelangte die Pipettenspitze in die unmittelbare Nähe der Nervenzelle. Um ein Verstopfen der Pipette im Hirnschnitt zu verhindern, wurde ein positiver Druck (ungefähr 110 cmH₂O) angelegt. Die Druckdosierung erfolgte extern über eine 100 ml-Spritze und einen Druckluftregler. Nachdem im Brücken- und "Current-Clamp"-Modus der Widerstand und die Kapazität der Elektrode abgeglichen worden waren, wurde die Pipette vorsichtig der Zellmembran angenähert, mit langsam stärker werdendem negativem Druck die "Cell-Attached"-Konfiguration hergestellt und anschließend der Membranbereich unter der Pipettenspitze durchbrochen. Der niedrige Zugangswiderstand zwischen Elektrode und Neuron erlaubt die freie Passage für Ionen. Anschließend wurden der Serienwiderstand und die Serienkapazität abgeglichen und die Stom-Spannungsbeziehung der Zelle aufgezeichnet. Alle Ableitungen wurden bei Raumtemperatur (22 - 24 °C) durchgeführt.

Ableitungen im Brückenmodus

Die Mehrzahl der Ableitungen erfolgte im Brückenmodus. Über die sogenannte Wheatstone'sche Brücke kann bei dieser Art der Ableitung gleichzeitig die Spannung gemessen und Strom in das Neuron injiziert werden. Während der Ableitungen mußten gelegentlich der Serienwiderstand und die Serienkapazität nachkompensiert werden.

Ableitungen im "Voltage-Clamp"-Modus

Einige Zellen wurden im sogenannten "Voltage-Clamp"-Modus abgeleitet, da für diese Experimente ein absolut konstantes Membranpotential nötig war (siehe Abschnitt 3.3.1.2). Der verwendete Verstärker arbeitet nach dem Prinzip des diskontinuierlichen Einzelelektroden-"Voltage-Clamp"-Verfahrens (dSEVC, "discontinuous single electrode voltage clamp"). Dies bedeutet, daß der Verstärker zyklisch zwischen Spannungsmessung und Injektion des Kompensationsstroms wechselt. Der Vorteil gegenüber konventionellen "Patch-Clamp"-Verstärkern besteht darin, daß die Spannungsmessung echt ist, das heißt das Membranpotential entspricht real dem eingestellten Haltepotential.

2.3.3 Extrazelluläre Stimulation

Es wurden einige Experimente durchgeführt, bei denen durch elektrische Stimulation synaptische EPSPs ausgelöst wurden (siehe Abschnitt 3.2.5). Hierzu wurde eine bipolare,

konzentrische Stimulationselektrode aus Wolfram (Außendurchmesser 200 μm , Innendurchmesser 100 μm , SNEX-100X, Science Trading Products) in der weißen Substanz unter dem am Soma abgeleiteten Neuron plaziert. Die Stimulationselektrode war mit einem externen Stimulationsgerät verbunden, das durch einen Taktgeber (RKE, Digitimer Ltd. 4030) oder einen Computer mit der entsprechenden Software (Pulse, HEKA) über den AD-Wandler getriggert wurde. Durch Spannungspulse (0,2 ms) konnten so Axone präsynaptischer Neurone überschwellig erregt und das postsynaptische Neuron orthodrom stimuliert werden (Ichinose & Murakoshi, 1996; Shao & Burkhalter, 1996).

2.3.4 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Computerprogrammen Pulse, Igor Pro (HEKA) und Excel (Microsoft). Für die Statistik wurde das Programm SigmaStat (SPSS Inc.) verwendet. Die Meßwerte wurden mit dem Student's t-Test für abhängige beziehungsweise unabhängige Daten auf signifikante Unterschiede überprüft. Mittelwerte werden grundsätzlich mit dem zugehörigen S.E.M. ("standard error of the mean")-Wert angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Eigenschaften neocorticaler Pyramidenneurone der Lamina V

Die im folgenden dargestellten elektrophysiologischen Befunde wurden an 130 Lamina V Pyramidenneuronen des somatosensorischen Neocortex der Ratte erhoben. Nach folgenden Kriterien wurden die einzelnen Nervenzellen aus einer größeren Anzahl von Ableitungen ausgewählt: **(1)** Der Wert des Ruhemembranpotentials (RMP) mußte negativer als -58 mV sein. **(2)** Das Aktionspotential (AP) mußte bei den somatischen Ableitungen eine Amplitude von mehr als 85 mV besitzen. Vergleichbare Kriterien werden auch von anderen Arbeitsgruppen verwendet (Burgard & Hablitz, 1993a; Stuart & Sakmann, 1994).

Das RMP der am Soma abgeleiteten Neurone lag im Mittel bei $-61 \pm 0,3$ mV ($n = 117$ Neurone). Das am Dendriten (200 μm vom Soma entfernt, siehe Abschnitt 3.3.4) gemessene RMP betrug $-61 \pm 0,7$ mV ($n = 13$ Neurone). Nachdem sich die Ableitung stabilisiert hatte wurde die Strom-Spannungsbeziehung des Neurons aufgezeichnet. Hierzu wurden Rechteckstimpulse von 160 ms Dauer (alle 1,5 s) unterschiedlicher Amplitude und Polarität über die Elektrode in das Neuron injiziert (Abbildung 3.1A). Bei der Auswertung wurde die Auslenkung des Membranpotentials am Plateauwert 140 ms nach Beginn der Strominjektion in mV gemessen und in Relation zur Stärke der Strominjektion in nA gesetzt (Abbildung 3.1B). Aus der Steigung der Strom-Spannungskurve konnte der Eingangswiderstand (R_N) der Nervenzelle beim Ruhemembranpotential berechnet werden. Im Mittel lag R_N bei 99 ± 4 M Ω ($n = 130$ Neurone). Weiterhin wurde die anomale Rektifizierung bestimmt. Sie berechnete sich aus dem Verhältnis der Steigung der Regressionsgeraden für die Werte im de- und hyperpolarisierenden Bereich. Im Mittel betrug die anomale Rektifizierung $1,31 \pm 0,04$ ($n = 130$ Neurone). Sie liegt damit deutlich unter dem für adulte Neurone typischen Wert (Howe et al., 1987a). Die durchschnittliche AP-Amplitude der am Soma abgeleiteten Neurone betrug 100 ± 1 mV ($n = 109$ Neurone). Alle untersuchten Neurone zeigten das typische Entladungsverhalten von sogenannten RS ("regular spiking")-Neuronen. Sie antworteten auf lang anhaltende, überschwellige Strompulse mit einer Serie von APs, die schnell akkomodierten (Connors & Gutnick, 1990).

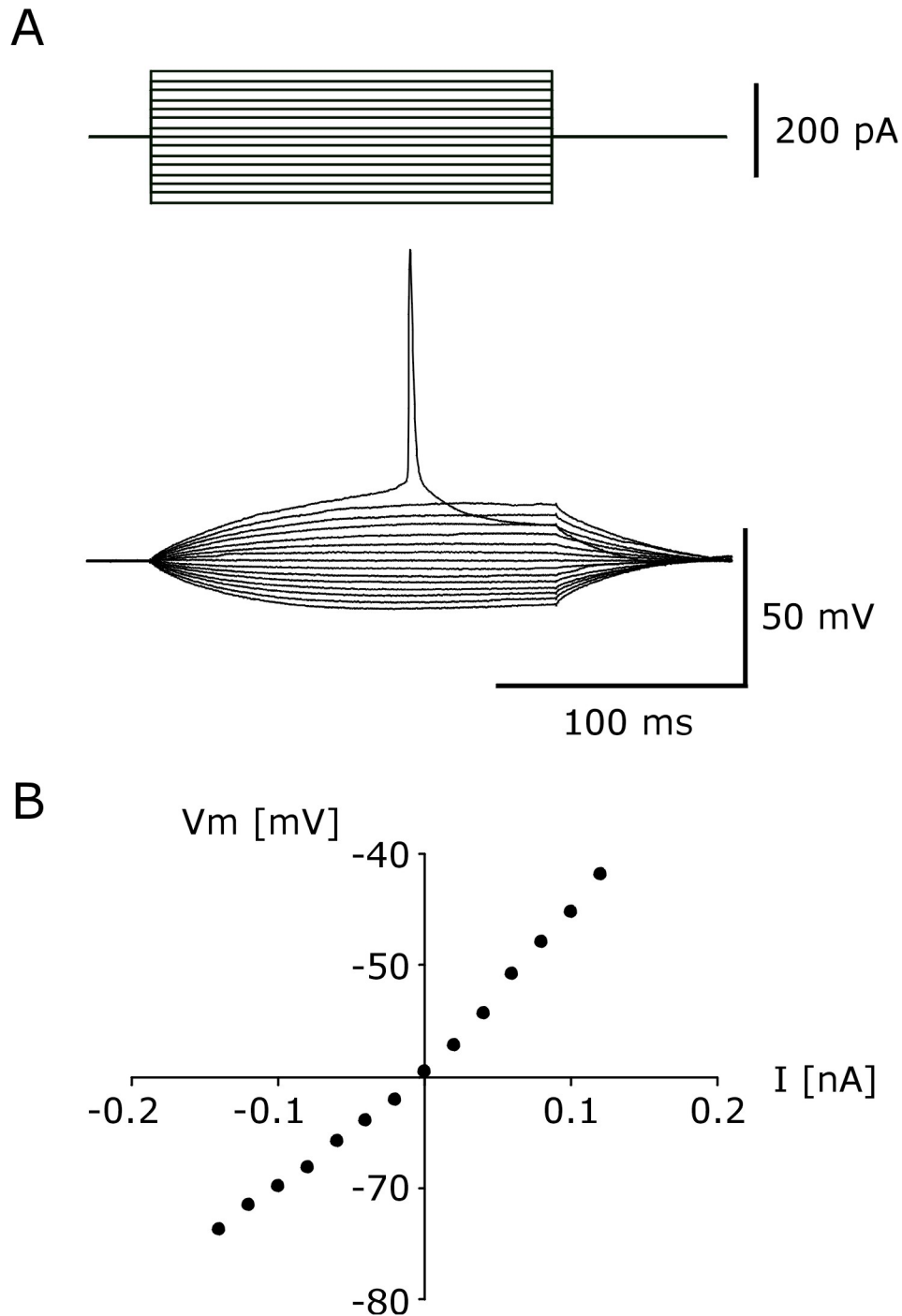


Abb. 3.1: Strom-Spannungsbeziehung eines neocorticalen Pyramidenneurons der Lamina V (16. Tag postnatal). (A) Auslenkungen des Membranpotentials der Nervenzelle (untere Spuren) als Reaktion auf die Injektion hyper- und depolarisierender Strompulse (obere Spuren). (B) Die Potentialauslenkungen sind gegen den injizierten Strom aufgetragen. Die Potentialmessungen erfolgten in der Plateauphase 140 ms nach Beginn der Strominjektion. Es wurden nur Antworten aufgetragen, bei denen keine Aktionspotentiale ausgelöst wurden. Das Ruhemembranpotential des Neurons betrug -60 mV, der Eingangswiderstand (R_M) 101 M Ω .

3.2 Räumliche Spezifität neocorticaler LTD

Im ersten Teil der vorliegenden Dissertation wird gezeigt, daß durch Applikation von Glutamat am Dendriten mittels Infrarot-gelenkter Photostimulation ein LTD-ähnlicher Effekt induziert werden kann. Durch weitere Experimente wurde untersucht, inwieweit diese Form der Langzeit-Plastizität generelle Eigenschaften synaptischer Langzeit-Plastizität besitzt. Auf Grund der hohen räumlichen Auflösung der Infrarot-gelenkten Photostimulation konnte außerdem die räumliche Spezifität der beobachteten "Photostimulations-LTD" quantifiziert werden.

3.2.1 Induktion von "Photostimulations-LTD"

Es wurde zunächst untersucht, ob eine Applikation von Glutamat mittels Infrarot-gelenkter Photostimulation LTD- beziehungsweise LTP-ähnliche Effekte induzieren kann. Für diese Versuche wurde der Perfusionslösung 0,5 mM caged Glutamat zugesetzt. Durch die Zugabe von 1 μ M Tetrodotoxin (TTX) wurden die für die AP-Initiierung verantwortlichen spannungsabhängigen Na^+ -Leitfähigkeiten blockiert und das untersuchte Neuron von synaptischen Eingängen isoliert. Ein beobachteter Effekt mußte daher rein postsynaptischer Natur sein. Glutamat wurde an einem einzelnen Stimulationsort am apikalen Dendriten in einer Entfernung von 100 – 150 μ m vom Soma appliziert. Diese Entfernung wurde aus folgenden Gründen gewählt: **(1)** Der apikale Dendrit konnte verlässlich bis zu dieser Entfernung visualisiert werden. **(2)** In dieser Region (Lamina IV) bilden viele thalamocorticale Afferenzen mit den apikalen Dendriten der Lamina V Pyramidenneurone glutamaterge Synapsen aus (Peters, 1987). **(3)** Thalamocorticale Synapsen zeigen sowohl LTP als auch LTD (Feldman et al., 1998). Glutamat wurde somit in einer Region des Dendriten appliziert, in der glutamaterge synaptische Transmission stattfindet und in der sich plastische Vorgänge abspielen.

Bei der Untersuchung einer solchen synaptischen Plastizität muß vor der Induktion überprüft werden, ob bei niedriger Stimulationsfrequenz die Amplituden der ausgelösten Antworten über einen längeren Zeitraum konstant bleiben. Zur Induktion von LTP beziehungsweise LTD wird im Anschluß an diese Kontrollstimulation mit höherer Frequenz stimuliert. Danach wird über einen längeren Zeitraum wieder die niedrige Stimulationsfrequenz des Kontrollversuchs verwendet. Eine statistisch signifikante Vergrößerung der Antwort-Amplituden, die länger als 30 min anhält, wird als LTP, eine Verkleinerung als LTD bezeichnet.

3.2.1.1 Induktions-Protokoll

Für die Kontrollstimulation wurde die Energie des Lasers auf einen Wert zwischen 5 – 10 mW eingestellt, sodaß die Amplituden der Glutamatantworten 3 – 5 mV betragen. Ähnliche Werte wurden auch für "unitary" EPSPs bestimmt (Markram et al., 1997). Die Stimulationsdauer betrug 3 ms. Die depolarisierenden Glutamatantworten wurden am Soma beim RMP abgeleitet.

Für die im folgenden dargestellten Experimente betrug die Länge der Kontrollstimulation 10 min. Innerhalb dieser Zeit wurde alle 20 s Glutamat appliziert. Dies entspricht einer Frequenz von 0,05 Hz. Vorversuche zeigten, daß eine tetanische Photostimulation eine Reduktion der Glutamatantwort-Amplitude bewirken kann. Als verlässliches Protokoll zur Induktion dieser "Photostimulations-LTD" erwies sich eine Stimulation von 1 min mit einer Frequenz von 5 Hz. Dieses Stimulationsparadigma, im folgenden als "5 Hz-Stimulation" bezeichnet, bewirkte eine statistisch signifikante Reduktion der Amplitude von mehr als 30 % im Mittel ($33 \pm 2 \%$, Mittelwert der Daten der 16. – 20. Minute nach der 5 Hz-Stimulation, $n = 9$ Neurone, $p < 0,001$, t-Test). Die Reduktion der Amplitude trat unmittelbar nach der 5 Hz-Stimulation auf und hielt bis zum Ende der Ableitung (60 min nach der 5 Hz-Stimulation) an (Abbildung 3.2).

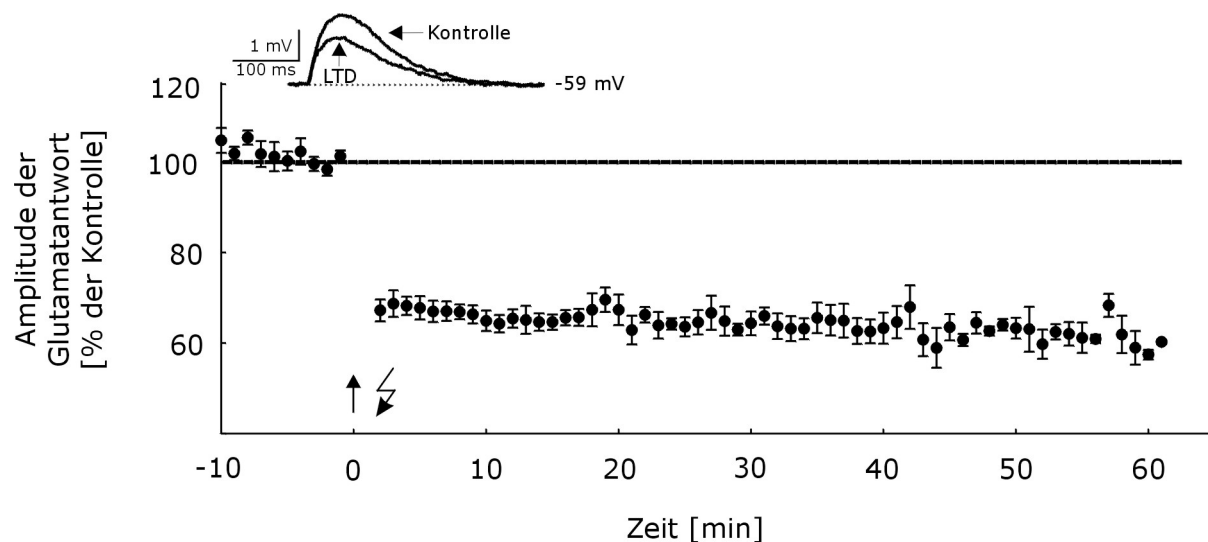


Abb. 3.2: Eine fokale Photolyse von caged Glutamat induziert eine LTD der Glutamatrezeptoren. Eine tetanische Freisetzung von Glutamat aus caged Glutamat durch eine schnelle Folge von UV-Lichtpulsen (3 ms lang, 5 Hz für 1 min) bewirkt eine LTD der Glutamatantworten ($n = 9$ Neurone). Vor und nach der Tetanisierung (Pfeil) wurde Glutamat alle 20 s durch 3 ms lange Lichtpulse photolytisch freigesetzt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm S.E.M. für jeweils 1 min. Der 100 % Wert repräsentiert den Mittelwert der letzten 5 min vor der Tetanisierung.

3.2.1.2 Ausschluß einer Schädigung der Neurone durch UV-Licht

In Kontrollexperimenten wurde untersucht, ob der beobachteten Abnahme der Glutamatsensitivität eine Schädigung des Neurons durch die UV-Strahlung des Lasers zugrunde liegt. Hierzu wurde nach der Kontrollstimulation das caged Glutamat ausgewaschen und die 5 Hz-Stimulation in Abwesenheit dieser Substanz durchgeführt. Anschließend wurde caged Glutamat erneut eingewaschen und das Neuron alle 20 s stimuliert. Hierbei konnte bei den Glutamatantworten keine statistisch signifikante Reduktion der Amplituden beobachtet werden ($3 \pm 4 \%$, Mittelwert der ersten 5 min nachdem caged Glutamat wieder vollständig eingewaschen war, $n = 3$, $p > 0.5$). Eine anschließende Wiederholung der 5 Hz-Stimulation in Anwesenheit von caged Glutamat induzierte wiederum eine stabile LTD (Abbildung 3.3). Diese Experimente zeigen klar, daß die beobachtete Photostimulations-LTD nicht durch eine Schädigung der Zelle durch das UV-Licht des Lasers ausgelöst wurde.

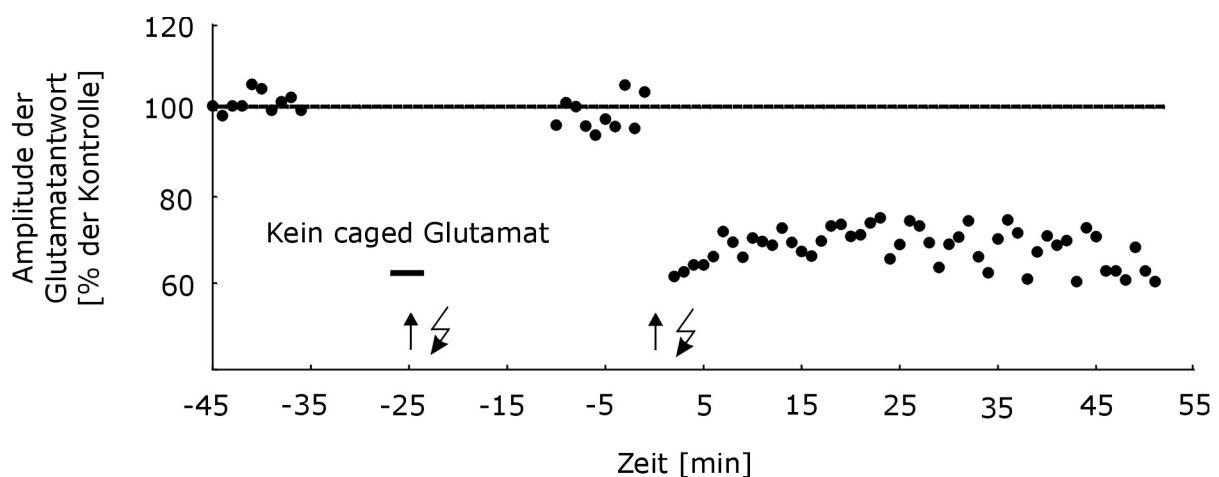


Abb. 3.3: Photostimulations-LTD wird nicht durch die UV-Strahlung des Lasers induziert. Nach der Kontrollstimulation wurde das caged Glutamat ausgewaschen und anschließend die 5 Hz-Stimulation durchgeführt. Nachdem caged Glutamat wieder vollständig eingewaschen war, konnte keine Reduktion der Amplituden beobachtet werden. Eine weitere 5 Hz-Stimulation in Anwesenheit von caged Glutamat induzierte eine stabile Photostimulations-LTD. Die Abbildung zeigt die Daten eines einzelnen Experimentes.

3.2.2 Induktion von "Photostimulations-LTP"

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob durch Applikation von Glutamat auch "Photostimulations-LTP" ausgelöst werden kann. Nach der "sliding threshold theory" (Bienenstock et al., 1982; Bear, 1995) resultiert eine LTP aus einer starken Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, während eine geringere Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einer LTD führt. Um einen stärkeren Ca^{2+} -Einstrom in das Neuron

zu erreichen, wurden drei experimentelle Modifikationen eingeführt: **(1)** Die Stimulationsfrequenz des Induktions-Protokolls wurde erhöht. **(2)** Das Neuron wurde während der 5 Hz-Stimulation zusätzlich durch Strominjektion depolarisiert. **(3)** Die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurde erhöht.

In den Versuchen wurden diese Modifikationen sowohl einzeln als auch kombiniert eingesetzt. Das Auftreten einer Photostimulations-LTP hätte sich dabei durch eine Erhöhung der Glutamatsensitivität manifestieren müssen. Bei keinem der untersuchten Neurone konnte jedoch eine solche Erhöhung beobachtet werden.

3.2.3 Eigenschaften der Photostimulations-LTD

3.2.3.1 NMDA-Rezeptor- und Ca^{2+} -Abhängigkeit

Die Induktion von synaptischer LTP und LTD ist häufig von der Aktivierung der NMDA-Rezeptoren und des daraus resultierenden Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle abhängig. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die beobachtete Photostimulations-LTD ebenfalls eine NMDA-Rezeptor- und Ca^{2+} -Abhängigkeit zeigt.

Blockierung der NMDA-Rezeptoren

Zum Nachweis einer NMDA-Rezeptor-Abhängigkeit wurde der aktivitätsabhängige NMDA-Rezeptor-Antagonist MK-801 der Perfusionslösung in einer Konzentration von 20 μM zugesetzt. Die extrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration wurde von 1 mM auf 4 mM erhöht. Durch die daraus resultierende Blockade der NMDA-Rezeptoren (siehe Abschnitt 1.1.1.2) verringerte sich die Amplitude der Glutamatantworten im Mittel um $39 \pm 3 \%$ ($n = 6$ Neurone). Dies zeigt deutlich, daß die NMDA-Rezeptoren auch beim Ruhemembranpotential einen bedeutenden Anteil an der Gesamt-Glutamatantwort haben.

Die Blockierung der NMDA-Rezeptoren verhinderte die Induktion einer Photostimulations-LTD. Es war lediglich eine statistisch nicht signifikante Reduktion der Amplitude der Glutamatantworten zu verzeichnen ($7 \pm 2 \%$, Mittelwert der Meßwerte der 16. - 20. Minute nach der 5 Hz-Stimulation, $n = 8$ Neurone, $p > 0,05$). Die anfängliche Reduktion der Glutamatsensitivität nach Durchführung des Induktions-Protokolls kann als Kurzzeitdepression (STD, "short-term depression") gedeutet werden (Abbildung 3.4).

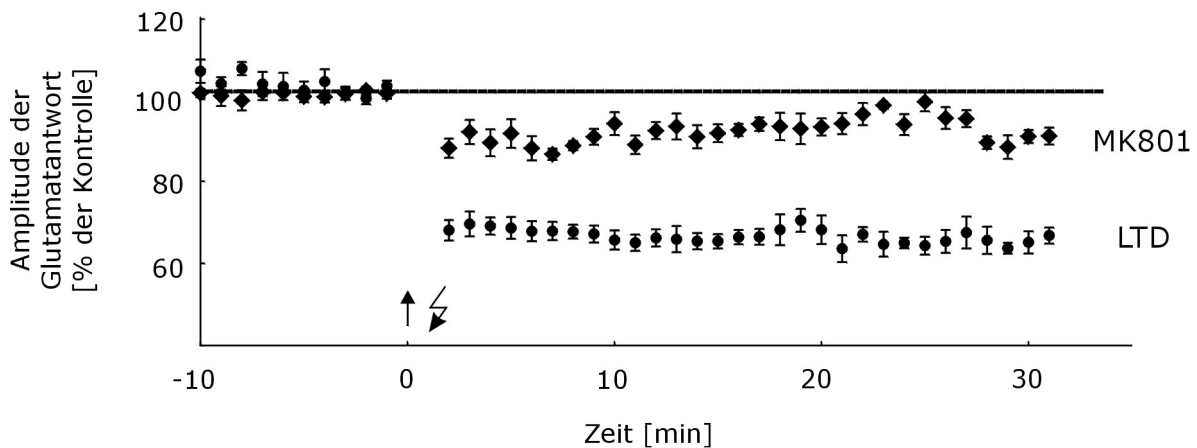


Abb. 3.4: Für die Induktion einer Photostimulations-LTD ist die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren nötig. Eine Applikation des NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 (20 μM) reduzierte die Depression der Glutamatantworten nach der 5 Hz-Stimulation auf ein statistisch nicht signifikantes Niveau ($n = 8$ Neurone).

Postsynaptische Ca^{2+} -Pufferung

Um eine Ca^{2+} -Abhängigkeit der Photostimulations-LTD zu untersuchen, wurden die abgeleiteten Neurone über die Pipettenlösung mit 10 mM BAPTA gefüllt. Dieser Ca^{2+} -Chelator besitzt zwar die selbe Affinität zu Ca^{2+} , ergibt aber eine weitaus höhere Reaktionsgeschwindigkeit als der Komplexbildner EGTA (Klingauf & Neher, 1997). Durch die Ca^{2+} -Pufferung wurden ein Anstieg der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration und eine Induktion einer Photostimulations-LTD durch die 5-Hz-Stimulation verhindert (Abbildung 3.5). Es konnte lediglich eine transiente, statistisch nicht signifikante Reduktion der Amplitude der Glutamatantworten beobachtet werden ($9 \pm 2 \%$, Mittelwert der Meßwerte der 16. - 20. Minute nach der 5 Hz-Stimulation, $n = 8$ Neurone, $p > 0.05$).

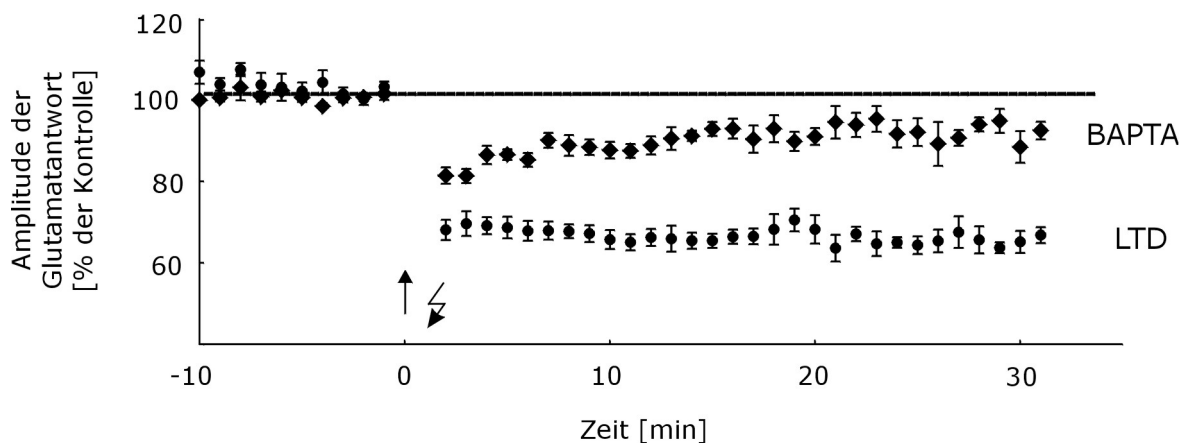


Abb. 3.5: Für die Induktion einer Photostimulations-LTD ist eine Erhöhung der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration nötig. Eine Zugabe des Ca^{2+} -Chelators BAPTA (10 mM) zur Pipettenlösung reduziert deutlich die Depression der Glutamatantworten nach der 5 Hz-Stimulation auf ein statistisch nicht signifikantes Niveau ($n = 8$ Neurone).

3.2.3.2 Kinetik der Glutamatantwort

Die Antwort neocorticaler Lamina V Neurone auf photolytisch freigesetztes Glutamat setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, die nach ihrer Pharmakologie und Kinetik unterschieden werden können. In Kontrolllösung zeigt die Depolarisation eine schnelle Anstiegsphase, der eine langsamere Abfallsphase folgt. Durch die Zugabe des spezifischen AMPA-Rezeptor-Antagonisten NBQX (1 μ M) kann die schnelle Depolarisation blockiert werden. Dies führt zu einer starken Abschwächung der Antwort. Übrig bleibt eine Depolarisation mit langsamerer Kinetik. Diese langsame Komponente kann durch den spezifischen NMDA-Rezeptor-Antagonisten D-APV (100 μ M) eliminiert werden. Demnach resultiert die Antwort aus der Aktivierung von ionotropen Glutamatrezeptoren (Frick et al., zur Publikation eingereicht).

Um aufzuklären, ob vor und nach einer Induktion der Photostimulations-LTD die NMDA- und AMPA-Rezeptoren in gleicher Relation zur Gesamt-Depolarisation beitragen, wurden die Kinetiken der Glutamatantworten analysiert. Weder für die Anstiegszeit (20 - 80 %) noch für die Abfalls-Zeitkonstante konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und LTD festgestellt werden (Abbildung 3.6). Die Anstiegszeit betrug vor der LTD-Induktion 13 ± 2 ms und nach der LTD-Induktion 11 ± 1 ms (Mittelwert der letzten 5 min Kontrolle beziehungsweise 21. - 25. Minute nach der 5 Hz-Stimulation, $n = 6$ Neurone, $p > 0,05$). Für die Kontrolle wurde eine Abfalls-Zeitkonstante von 75 ± 8 ms bestimmt. Während der LTD betrug sie 81 ± 11 ms ($p > 0,1$). Dieser Befund deutet darauf hin, daß durch die 5 Hz-Stimulation die NMDA- und AMPA-Rezeptor vermittelte Depolarisation jeweils in gleichem Maß herabgesetzt wird.

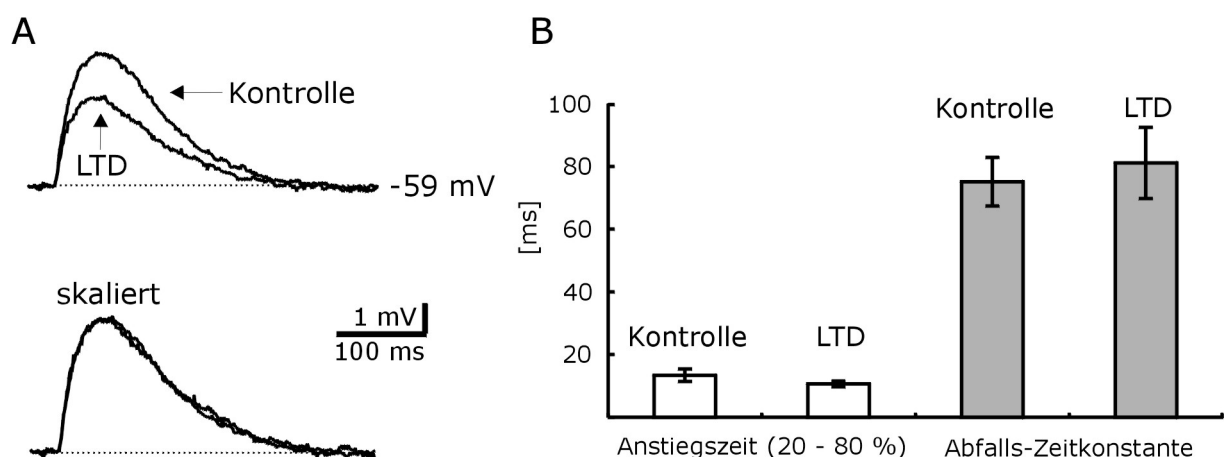


Abb. 3.6: Die Kinetik der Glutamatantwort wird durch die Photostimulations-LTD nicht verändert. (A) Die Glutamatantwort besitzt während einer LTD die gleiche Kinetik wie bei der Kontrollstimulation. Dies wird besonders deutlich, wenn eine während der LTD ausgelöste Depolarisation auf den Wert der Kontroll-Amplitude skaliert wird. (B) Mittelwerte der Anstiegszeit und Abfalls-Zeitkonstante vor und nach LTD-Induktion ($n = 6$ Neurone).

3.2.4 Räumliche Spezifität der Photostimulations-LTD

3.2.4.1 Räumliche Spezifität der Infrarot-gelenkten Photostimulation

Die lokalisierte Photolyse von caged Glutamat kann dazu benutzt werden, räumliche Unterschiede in der Glutamatsensitivität neuronaler Strukturen zu untersuchen (Dodt et al., 1998). Um eine Aussage über die räumliche Spezifität der Photostimulations-LTD machen zu können, wurden Experimente durchgeführt, durch die die Ausdehnung der photolytischen Glutamatapplikation quantifiziert werden konnte. Dazu wurde der Abfall der Antwort-Amplituden gemessen, der entsteht, wenn man den UV-Lichtpunkt von einem dendritischen Reizort aus horizontal verschiebt (Abbildung 3.7). Die Beziehung zwischen der Amplitude der Glutamatantworten und der Position des UV-Lichtpunktes wurde durch eine Gauss-Funktion beschrieben, deren Halb-Breiten (HWFM, "half width full maximum) als Maß für die Auflösung verwendet wurden (Pettit et al., 1997). Im Mittel war die Amplitude bei $4 \pm 1 \mu\text{m}$ ($n = 6$ Neurone) um 50 % reduziert, das heißt die HWFM für die laterale Auflösung betrug ungefähr $4 \mu\text{m}$. Der Durchmesser des Ortes, an dem Glutamat freigesetzt wird, kann deshalb mit ungefähr $10 \mu\text{m}$ angegeben werden. Durch Verschiebung des UV-Lichtpunktes entlang der Z-Achse wurde weiterhin die axiale Auflösung des Verfahrens mit ungefähr $18 \mu\text{m}$ bestimmt ($18 \pm 2 \mu\text{m}$, $n = 4$ Neurone).

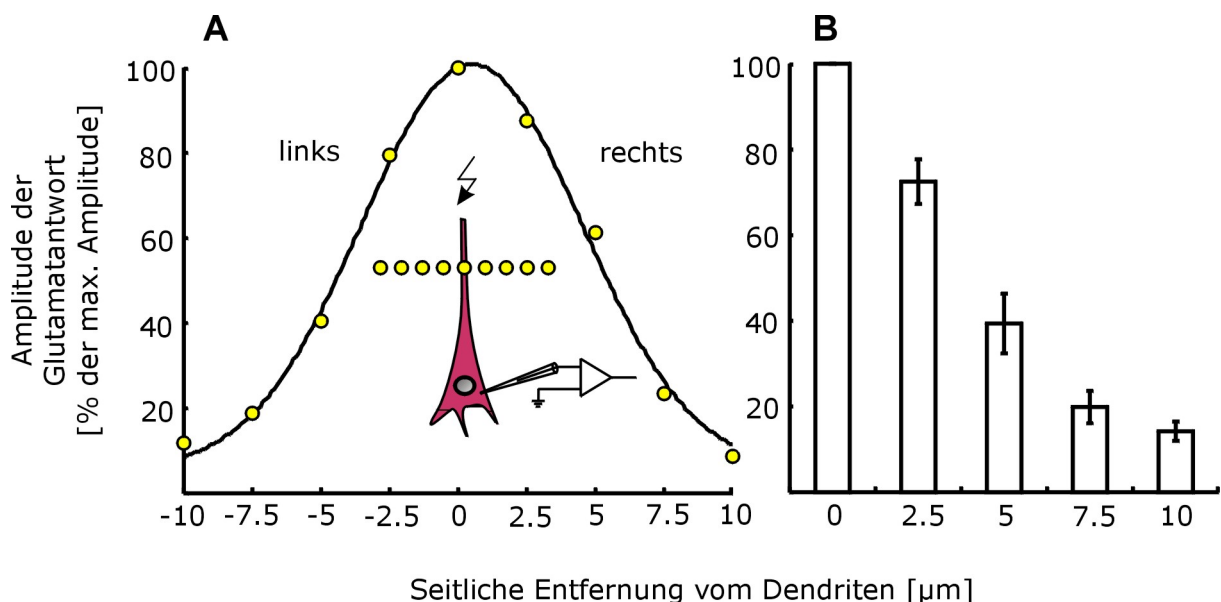


Abb. 3.7: Räumliche Auflösung der Infrarot-gelenkten Photostimulation. (A) Der UV-Lichtpunkt wurde in Schritten von $2,5 \mu\text{m}$ seitlich von einem dendritischen Reizort aus verschoben. Die Abnahme der Antwort-Amplituden ist als Funktion der Entfernung aufgetragen. Die Abbildung zeigt die Daten eines einzelnen Experimentes. **(B)** Mittelwert der Ergebnisse von 6 Neuronen. Da die Gaussche Form des Abfalls häufig verzerrt war (wahrscheinlich durch sekundäre dendritische Verzweigungen), wurden die Meßwerte der Seite mit dem stärksten Amplitudenabfall gemittelt. Die Stimulationen erfolgten in einer Entfernung von $100 - 250 \mu\text{m}$ vom Soma. Die Amplituden sind auf die Werte bei direkter Stimulation des Dendriten normalisiert. Die halb-maximale Amplitude der Antwort wurde erreicht, wenn der Lichtpunkt $4 \pm 1 \mu\text{m}$ vom Dendriten entfernt war.

3.2.4.2 Photostimulations-LTD ist räumlich hoch spezifisch

In den im folgenden dargestellten Experimenten wurde die Frage untersucht, wie groß die räumliche Spezifität der Photostimulations-LTD ist. Hierzu wurde an 7 dendritischen Stimulationsorten eines Neurons Glutamat appliziert. Im vorhergehenden Abschnitt wurde beschrieben, daß Glutamat in einer Region mit 10 μm Durchmesser freigesetzt wird. Aus diesem Grund wurde ein Abstand von 10 μm zwischen den Stimulationsorten gewählt. Nach einer Kontrollstimulation, bei der jeder dieser Orte fünfmal stimuliert wurde, erfolgte die 5 Hz-Stimulation lediglich an dem zentralen Stimulationsort (Abbildung 3.8, schwarzes Symbol). Die Mittelwerte von 5 Stimulationen für jedes Neuron (jeweils 10 - 20 min nach der 5 Hz-Stimulation gemessen) zeigen deutlich, daß nur an dem Ort, an dem die Tetanisierung durchgeführt wurde, eine statistisch signifikante LTD von $29 \pm 4 \%$ auftrat ($n = 9$ Neurone, $p < 0,001$). An allen anderen Stimulationsorten trat keine statistisch signifikante Reduktion der Antwort-Amplituden auf ($p > 0,05$). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Photostimulations-LTD eine räumliche Spezifität von mindestens 10 μm besitzt. Eine genauere Quantifizierung wurde durch die räumliche Auflösung der Infrarot-gelenkten Photostimulation limitiert.

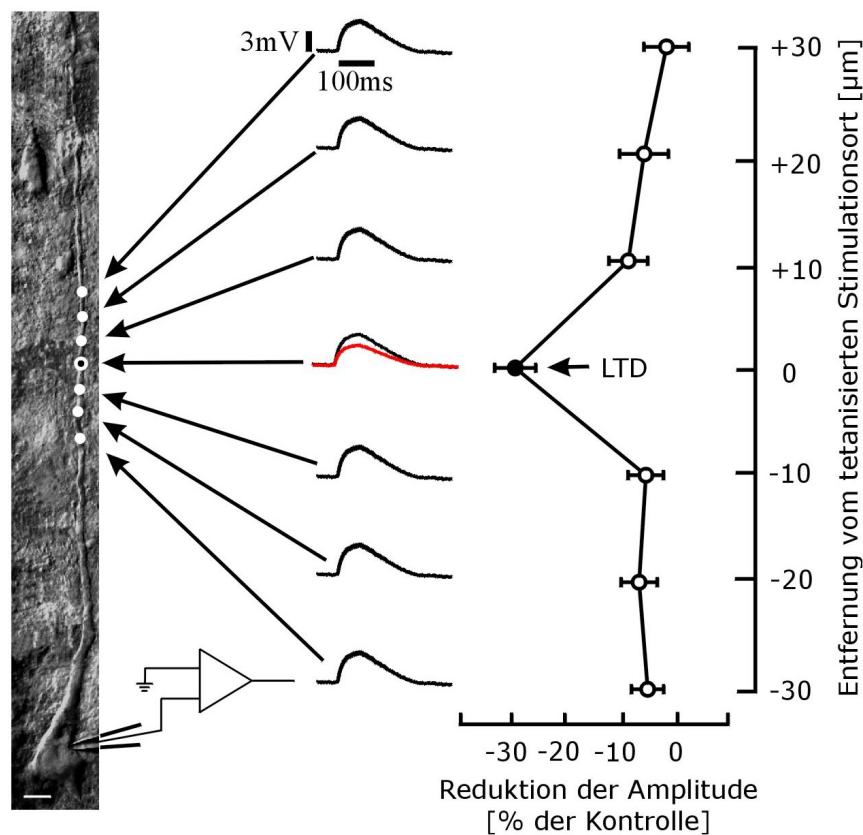


Abb. 3.8: Photostimulations-LTD ist räumlich hoch spezifisch. Beispiel eines neocorticalen Lamina V Pyramidenneurons, das an 7 unterschiedlichen Orten am apikalen Dendriten stimuliert wurde (der Skalierungsbalken entspricht 10 μm). Die Mittelwerte der auf den Kontrollwert normalisierten Amplituden zeigen deutlich, daß nur am mittleren Stimulationsort (schwarzes Symbol), an dem die 5 Hz-Stimulation durchgeführt wurde, eine LTD auftrat ($n = 9$ Neurone).

3.2.5 Synaptische Langzeitdepression ist mit einer Abnahme der dendritischen Glutamatsensitivität assoziiert

Die beschriebenen Befunde zeigen, daß durch Applikation von Glutamat am Dendriten mittels Infrarot-gelenkter Photostimulation eine LTD der Glutamatrezeptoren ausgelöst werden kann. Diese Form der Langzeit-Plastizität ist NMDA-Rezeptor- und Ca^{2+} -abhängig. Eine solche Abhängigkeit weist darauf hin, daß dieselben Mechanismen für die Induktion der Photostimulations-LTD verantwortlich sind wie für die Auslösung einer synaptischen LTD. Es war daher von Interesse, folgende Fragestellungen zu untersuchen: **(1)** Kann durch eine synaptische 5 Hz-Stimulation synaptische LTD induziert werden? **(2)** Wenn ja, ist diese LTD mit einer Abnahme der dendritischen Glutamatsensitivität assoziiert?

Experimentelles Design

Zur Klärung dieser Fragen wurden Experimente durchgeführt, bei denen durch elektrische Stimulation synaptische EPSPs ausgelöst wurden. Hierzu wurde eine bipolare, konzentrische Wolfram-Stimulationselektrode in der weißen Substanz unter dem am Soma abgeleiteten Neuron plaziert. Durch Spannungspulse können so Axone präsynaptischer Neurone überschwellig erregt werden. Das postsynaptische Neuron wird dabei orthodrom stimuliert (Ichinose & Murakoshi, 1996; Shao & Burkhalter, 1996). Da bei Experimenten mit synaptischer Stimulation die Reizweiterleitung nicht blockiert werden darf, wurde ohne Zusatz von TTX gearbeitet. Die Stimulationsdauer betrug 0,2 ms. Die Stimulationsintensität ($< 10 \text{ V}$) wurde so eingestellt, daß EPSPs mit einer Amplitude von 3 - 5 mV ausgelöst wurden.

Um gegebenenfalls eine Abnahme der dendritischen Glutamatsensitivität detektieren zu können, die mit einer synaptischen LTD assoziiert ist, wurde am apikalen Dendriten des untersuchten Neurons zusätzlich Glutamat appliziert. Dies geschah mittels Infrarot-gelenkter Photostimulation wiederum in einer Entfernung von 100 - 150 μm vom Soma (siehe Abschnitt 3.2.1). Ein Vergleich der photolytisch ausgelösten Glutamatantworten mit den synaptischen EPSPs zeigte deutliche Unterschiede in der Kinetik. Die Anstiegszeit (0 - 100 %) der Photostimulations-Antworten war ungefähr dreimal so lang wie die der synaptischen Antworten ($62 \pm 3 \text{ ms}$ für die Photostimulations-Antworten und $20 \pm 2 \text{ ms}$ für die EPSPs, $n = 7$, siehe Abbildung 3.9A).

Induktions-Protokoll

Für die Kontrollstimulation (10 min) wurde sowohl die Photostimulation, als auch die synaptische Stimulation alle 20 s durchgeführt. Das Intervall zwischen diesen beiden Arten der Reizerzeugung betrug 10 s. Im Anschluß an die Kontrollstimulation wurde eine synaptische 5 Hz-Stimulation für 1 min durchgeführt. Um möglichst viele glutamaterge Synapsen zu aktivieren, wurde für das Induktions-Protokoll die Stimulationsintensität auf den doppelten Betrag des Wertes erhöht, bei dem das postsynaptische Neuron auf einen einzelnen Stimulus ein Aktionspotential generierte.

Synaptische 5 Hz-Stimulation induziert eine LTD der EPSPs

Abbildung 3.9 zeigt, daß durch die synaptische 5 Hz-Stimulation reproduzierbar eine LTD der EPSPs induziert werden konnte (offene Kreise in Abbildung 3.9C). Die statistisch signifikante Reduktion der Amplitude trat unmittelbar nach der Tetanisierung ein und betrug $32 \pm 6 \%$ (weiße Säule in Abbildung 3.9B, Mittelwert der Daten der 46. - 50. Minute nach der Tetanisierung, $n = 14$ Neurone, $p < 0,01$).

Synaptische LTD ist mit einer Abnahme der dendritischen Glutamatsensitivität assoziiert

Neben der synaptischen LTD bewirkte die elektrische LTD-Induktion eine Abnahme der dendritischen Glutamatsensitivität (geschlossene Rauten in Abbildung 3.9C). Die statistisch signifikante Reduktion der Amplitude betrug 48 min nach der Induktion $31 \pm 3 \%$ (schwarze Säule in Abbildung 3.9B, Mittelwert der Daten der 46. - 50. Minute nach der Tetanisierung, $n = 8$ Neurone, $p < 0,01$). Die Entwicklung der Glutamatsensitivität und die der EPSP-Amplituden zeigten in den ersten Minuten nach der synaptischen Tetanisierung einen jeweils deutlich verschiedenen Zeitverlauf. Die Abnahme der Glutamatsensitivität entwickelte sich weitaus langsamer, als die synaptische LTD. Erst 35 min nach der Induktion war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der synaptischen LTD und der Reduktion der Glutamatsensitivität mehr festzustellen ($p > 0,5$).

Ausschluß-Experimente

Die beobachtete Koinzidenz der synaptischen LTD und der Reduktion der dendritischen Glutamatsensitivität weist darauf hin, daß einer neocorticalen LTD eine Abnahme der postsynaptischen Glutamatsensitivität zugrunde liegt. Weitere Evidenz hierfür lieferten die Ergebnisse sogenannter Ausschluß-Experimente. Hierzu wurde bei 6 Neuronen 40

min nach der synaptischen Tetanisierung zusätzlich die 5 Hz-Photostimulation durchgeführt. Es trat jedoch keine weitere statistisch signifikante Reduktion der Glutamatantwort-Amplituden auf (gelbe Rauten in Abbildung 3.9C, $p > 0,1$). Die Abnahme der Glutamatsensitivität betrug 48 min nach der synaptischen Tetanisierung $31 \pm 2\%$ (gelbe Säule in Abbildung 3.9B, Mittelwert der Daten der 46. - 50. Minute nach der elektrischen LTD-Induktion). Dieser Befund zeigt deutlich, daß die synaptisch induzierte LTD eine Photostimulations-LTD ausschließt.

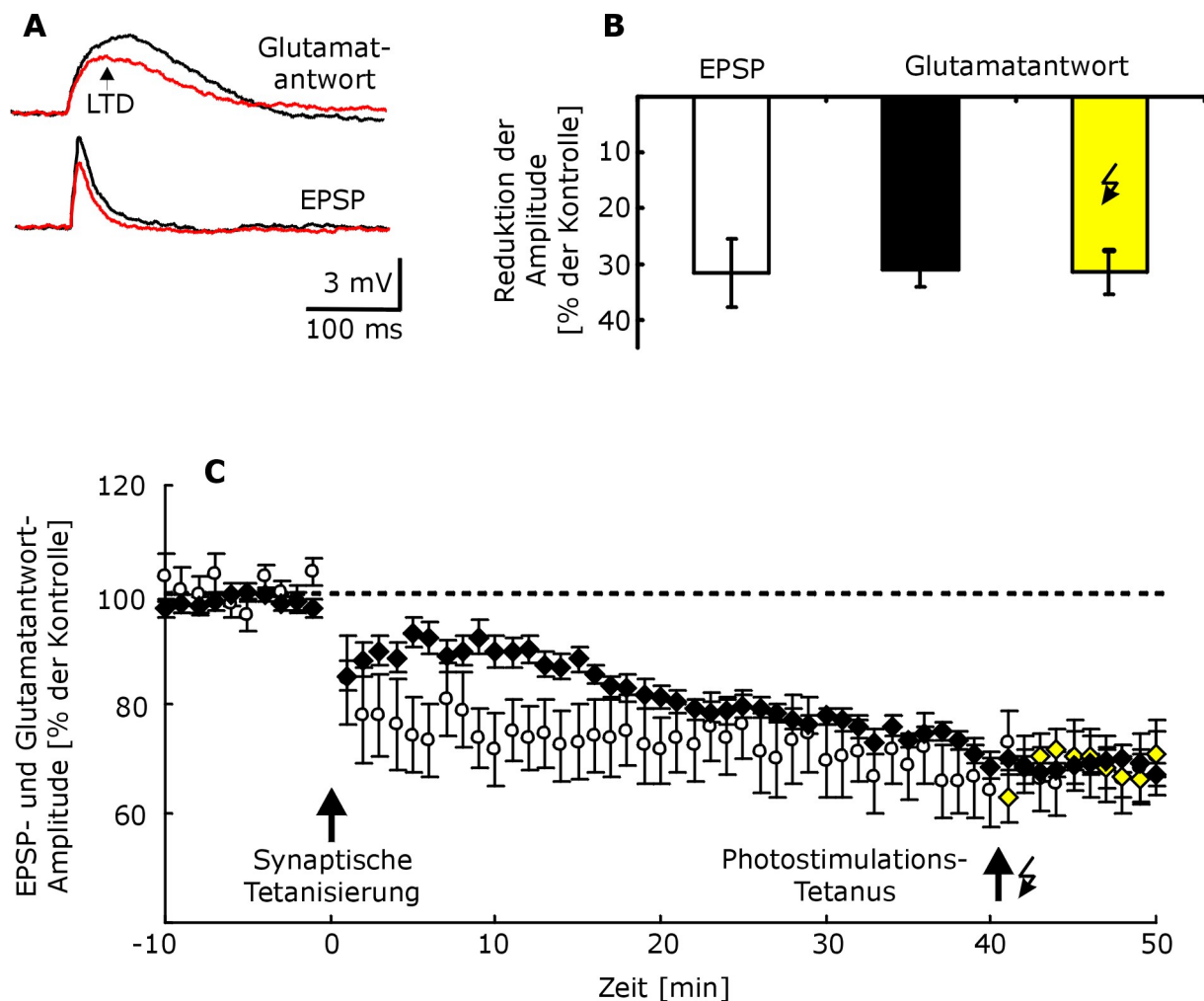


Abb. 3.9: Synaptische LTD ist mit einer Abnahme der dendritischen Glutamatsensitivität assoziiert. (A) Photostimulations-Antwort (Glutamatantwort) und EPSP vor und 35 min nach der synaptischen Tetanisierung. **(B)** Vergleich der LTD von EPSPs ($n = 14$ Neurone) und Glutamatantworten ($n = 8$ Neurone) 48 min nach elektrischer LTD-Induktion (Mittelwert der Daten der 46. - 50. Minute). Zu diesem Zeitpunkt zeigten die LTDs beider Potentiale keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p > 0,5$). Die gelbe Säule zeigt die Abnahme der Glutamatantwort von 6 der 14 Zellen, bei denen 40 min nach der elektrischen LTD-Induktion der Photostimulations-Tetanus durchgeführt wurde (Mittelwert der Daten der 46. - 50. Minute). Eine zusätzliche Verkleinerung der Glutamatantworten wurde dadurch nicht induziert ($p > 0,1$). **(C)** Zeitverlauf der LTD von EPSPs (offene Kreise) und Glutamatantworten (geschlossene Rauten). Eine halbe Stunde nach der elektrischen 5 Hz-Stimulation waren die LTDs der EPSPs und die der Glutamatantworten nahezu gleich. Ein bei 6 Neuronen durchgeführter zusätzlicher Photostimulations-Tetanus induzierte keine weitere LTD (gelbe Rauten).

3.2.6 Eigenschaften der synaptischen LTD

3.2.6.1 NMDA-Rezeptor-Abhängigkeit der synaptischen LTD

Im Neocortex wurden zwei Formen von synaptischer LTD beobachtet. Die eine ist von der Aktivierung der NMDA-Rezeptoren abhängig (Kirkwood et al., 1993), die andere D-APV-insensitive Form kann durch intrazellulär applizierte Ca^{2+} -Chelatoren blockiert werden (Bröcher et al., 1992; Hirsch & Crepel, 1992). In Analogie zur Photostimulations-LTD wurde deshalb untersucht, ob die beobachtete synaptische LTD und die mit ihr assoziierte Reduktion der dendritischen Glutamatsensitivität eine NMDA-Abhängigkeit zeigt. Hierzu wurden die NMDA-Rezeptoren wiederum durch MK-801 (20 μM) und eine Erhöhung der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration von 1 mM auf 4 mM blockiert (siehe Abschnitt 3.2.3.1).

Abbildung 3.10 zeigt, daß durch Blockierung der NMDA-Rezeptoren sowohl die Induktion einer synaptischen LTD, als auch die mit ihr assoziierte Reduktion der dendritischen Glutamatsensitivität verhindert wurde. Es war lediglich eine statistisch nicht signifikante Reduktion der Amplituden der EPSPs von $8 \pm 3 \%$ ($p > 0,05$) und der Glutamatantworten von $0 \pm 4 \%$ ($p > 0,5$) zu verzeichnen (Mittelwerte der Meßwerte der 16. - 20. Minute nach der 5 Hz-Stimulation, $n = 7$ Neurone).

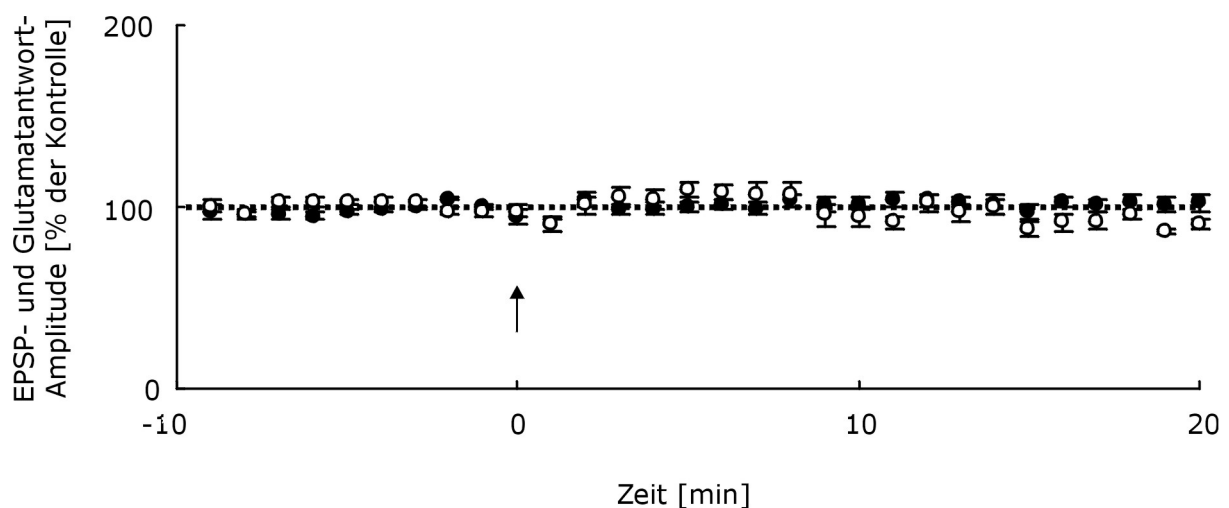


Abb. 3.10: Synaptische Langzeitdepression und die mit ihr assoziierte Reduktion der Glutamatsensitivität ist NMDA-Rezeptor-abhängig. Der NMDA-Rezeptor-Antagonist MK-801 (20 μM) und eine extrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration von 4 mM verhinderten die Induktion einer synaptischen LTD und einer Reduktion der dendritischen Glutamatsensitivität. Die normalisierten EPSPs sind durch die offenen Kreise, die photolytisch ausgelösten Glutamatantworten durch die geschlossenen Kreise dargestellt.

3.2.6.2 Kinetik der Glutamatantwort

In Analogie zur Photostimulations-LTD (siehe Abschnitt 3.2.3.2) wurde untersucht, ob durch die synaptische 5 Hz-Stimulation die Kinetik der photolytisch ausgelösten Glutamatantwort verändert wurde. Wie für die Glutamatantwort nach dem Photostimulations-Tetanus konnten jedoch keine statistisch signifikanten Änderungen der Anstiegszeit (20 - 80 %) und Abfalls-Zeitkonstante festgestellt werden (Abbildung 3.11). Die Anstiegszeit betrug vor der LTD-Induktion 19 ± 2 ms und nach der LTD-Induktion 17 ± 2 ms (Mittelwert der letzten 5 min Kontrolle beziehungsweise 26. - 30. Minute nach der 5 Hz-Stimulation, $n = 8$ Neurone, $p > 0,1$). Für die Kontrolle wurde eine Abfalls-Zeitkonstante von 91 ± 10 ms bestimmt. Während der LTD betrug sie 88 ± 12 ms ($p > 0,5$). Dieser Befund deutet darauf hin, daß auch die synaptische 5 Hz-Stimulation die NMDA- und AMPA-Rezeptor vermittelte Depolarisation im gleichen Verhältnis herabsetzt.

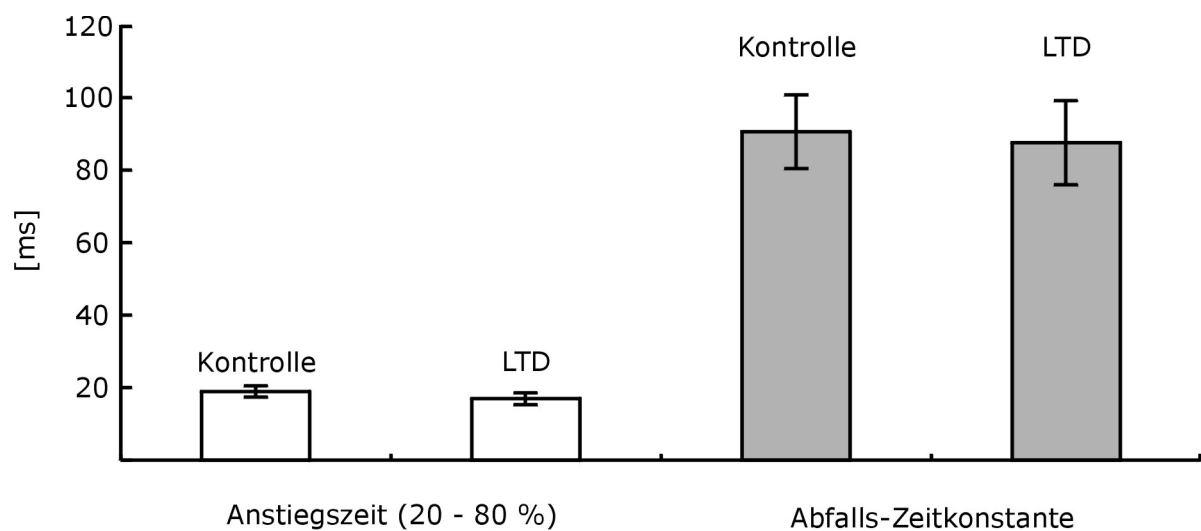


Abb. 3.11: Die Kinetik der Glutamatantwort wird durch die synaptische 5 Hz-Stimulation nicht verändert. Mittelwerte der Anstiegszeit und Abfalls-Zeitkonstante vor und nach synaptischer LTD-Induktion ($n = 8$ Neurone).

3.3 Differentielle Verteilung der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren

Im zweiten Teil der vorliegenden Dissertation sollte die differentielle Verteilung von GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren entlang des apikalen Dendriten von Lamina V Pyramidenneuronen untersucht werden. Hierzu wurde GABA mittels Infrarot-gelenkter Photostimulation (3 ms Stimulationsdauer) an verschiedenen Stellen des apikalen Dendriten und am Soma appliziert. Die eingesetzte Konzentration von caged GABA betrug 1 mM. Die Intensität des Lasers wurde vor Beginn des Experimentes so eingestellt, daß die Amplituden der GABA-Antworten 3 - 6 mV betragen. Die Zugabe von TTX (1 µM) isolierte die abgeleiteten Neurone von synaptischen Eingängen. Die GABA-Rezeptor-vermittelten Antworten wurden am Soma oder Dendriten beim RMP abgeleitet. An allen neuronalen Strukturen, an denen GABA appliziert wurde, konnten sowohl GABA_A-, als auch GABA_B-Rezeptor-vermittelte Antworten ausgelöst werden.

3.3.1 Eigenschaften der GABA-Antworten

3.3.1.1 Pharmakologische Isolierung reiner GABA_A- oder GABA_B-Antworten

Die Antworten neocorticaler Lamina V Pyramidenneurone auf photolytisch freigesetztes GABA setzten sich aus zwei Komponenten zusammen, die pharmakologisch und zeitlich unterscheidbar waren. In Kontrollösung folgte auf eine schnelle eine zusätzliche langsame Hyperpolarisation (Abbildung 3.12A). Die schnelle Hyperpolarisation konnte durch Zugabe des spezifischen GABA_B-Rezeptor-Antagonisten CGP35348 (200 µM) isoliert und durch den GABA_A-Rezeptor-Blocker Picrotoxin (75 µM) eliminiert werden (n = 3 Neurone). Die umgekehrte pharmakologische Behandlung isolierte und blockierte reine GABA_B-Antworten (n = 3 Neurone, Abbildung 3.12B). Demnach resultierten die Antworten aus der Aktivierung von GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren.

3.3.1.2 Depolarisierende GABA_A-Antworten

Wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, wurde caged GABA im Anschluß an die Aufzeichnung der Strom-Spannungsbeziehung der ACSF zugesetzt. Es zeigte sich, daß die GABA_B-Antworten nach 10 min konstant in der Amplitude waren. Damit war ein vollständiges Einwaschen der caged Substanz bestätigt. Die Amplituden der GABA_A-Antworten hingegen waren erst nach ungefähr 15 min konstant. Da das Umkehrpotential für Cl⁻

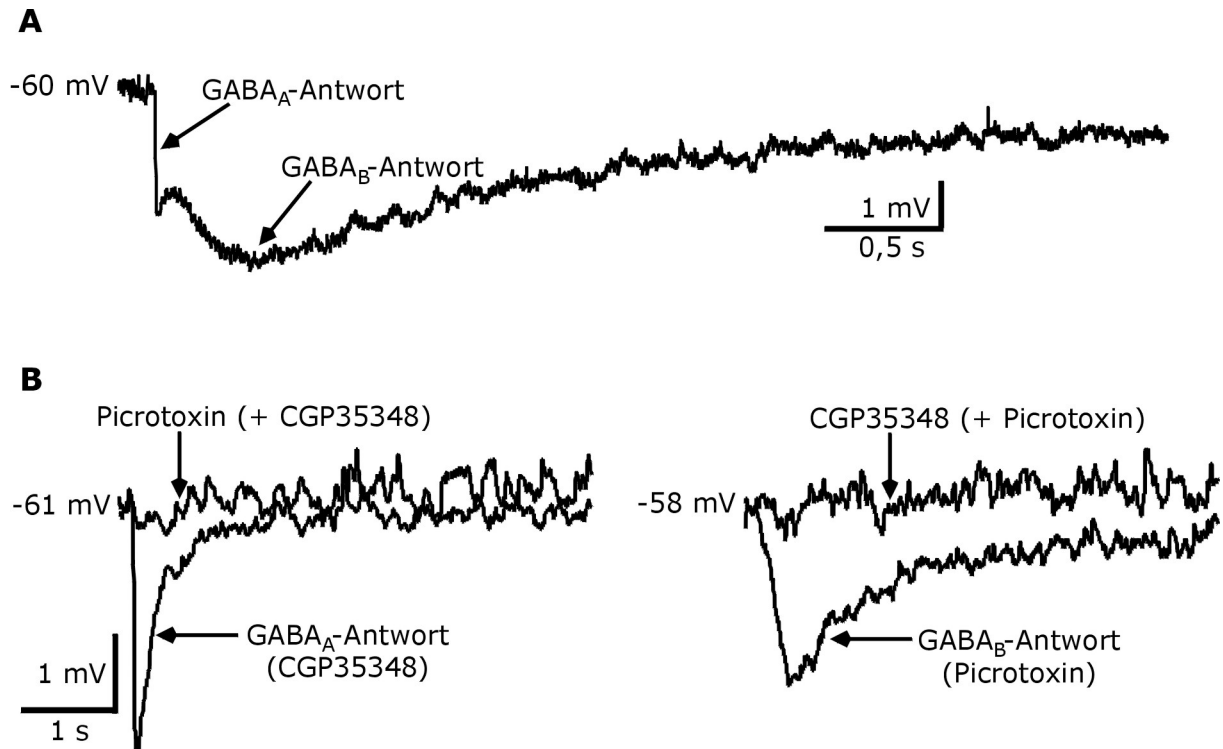


Abb. 3.12: Pharmakologische Isolierung reiner GABA_A- oder GABA_B-Antworten. (A) Die Antworten neocorticaler Lamina V Neurone auf photolytisch freigesetztes GABA setzten sich aus einer schnellen GABA_A- und einer späten, langsamen GABA_B-Komponente zusammen. (B) Durch eine Applikation des spezifischen GABA_B-Rezeptor-Antagonisten CGP35348 konnten reine GABA_A-Antworten isoliert und durch den GABA_A-Rezeptor-Blocker Picrotoxin eliminiert werden. Die umgekehrte pharmakologische Behandlung isolierte und blockierte GABA_B-Antworten. GABA wurde in unmittelbarer Nähe einer am Soma plazierten Elektrode photolytisch freigesetzt. Die gezeigten Ableitspuren stammen von unterschiedlichen Neuronen.

Ionen (E_{Cl}) nahe beim RMP liegt, könnte eine starke Amplitudenschwankung einer beim RMP abgeleiteten GABA_A-Antwort auch von einer geringfügigen Veränderung der intrazellulären Cl^- -Konzentration herrühren. Die Untersuchung der folgenden Fragen sollte eine Unterscheidung erlauben: (1) Führt die Dialyse der Zelle durch die Pipettenlösung zu einer Reduktion der intrazellulären Cl^- -Konzentration? Dieser diffusionsbedingte Prozess könnte über eine Verschiebung von E_{Cl} zu der beobachteten kontinuierlichen Amplitudenvergrößerung der hyperpolarisierenden GABA_A-Antworten führen. (2) Werden gegebenenfalls durch GABA bei natürlicher intrazellulärer Cl^- -Konzentration depolarisierende GABA_A-Antworten beim RMP ausgelöst? Depolarisierende GABA_A-Rezeptor-vermittelte IPSPs wurden bei jungen Tieren in allen Regionen des ZNS beobachtet (siehe Abschnitt 1.1.2.4).

Zur Klärung wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Neurone am Soma im "Voltage-Clamp"-Modus abgeleitet wurden. Dadurch konnte das Membranpotential konstant gehalten werden. Caged GABA, TTX und CGP35348 wurden der ACSF 15 min vor Beginn der Ableitung zugesetzt. Bei einem Haltepotential von -60 mV wurde GABA

kurz nach dem Durchbrechen der Zellmembran ("break in") photolytisch freigesetzt. Es zeigte sich, daß sowohl die somatische, als auch die dendritische Applikation von GABA Einwärtsströme auslöste (Abbildung 3.13A). Da ein Einwärtsstrom als Strom positiv geladener Ionen in die Zelle definiert ist, bedeutet dies, daß Cl^- -Ionen aus der Zelle ausströmten und das Neuron depolarisierten. Bei wiederholter Stimulation (alle 20 s) wurden die Einwärtsströme kontinuierlich kleiner (Abbildung 3.13A) und kehrten sich dann in Auswärtsströme um. Die Amplitude dieser Auswärtströme wurde dabei kontinuierlich größer, bis sie nach einiger Zeit konstant blieb. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, daß die intrazelluläre Cl^- -Konzentration von Lamina V Pyramidenneuronen des somatosensorischen Neocortex der 14 - 21 Tage alten Ratte deutlich höher ist, als die Cl^- -Konzentration der verwendeten Pipettenlösung (5 mM). Für GABA_A -Antworten, die am apikalen Dendriten 300 μm vom Soma entfernt ausgelöst wurden, dauerte die Equilibrierung der Cl^- -Ionen ungefähr 20 min ($n = 8$ Neurone, Abbildung 3.13B). Aus diesem Grund wurden alle Experimente, bei denen GABA_A -Rezeptor-vermittelte Antworten untersucht wurden, frühestens 30 min nach dem "break in" begonnen. Dies gilt auch für die in Abschnitt 3.3.1.1 beschriebenen Versuche.

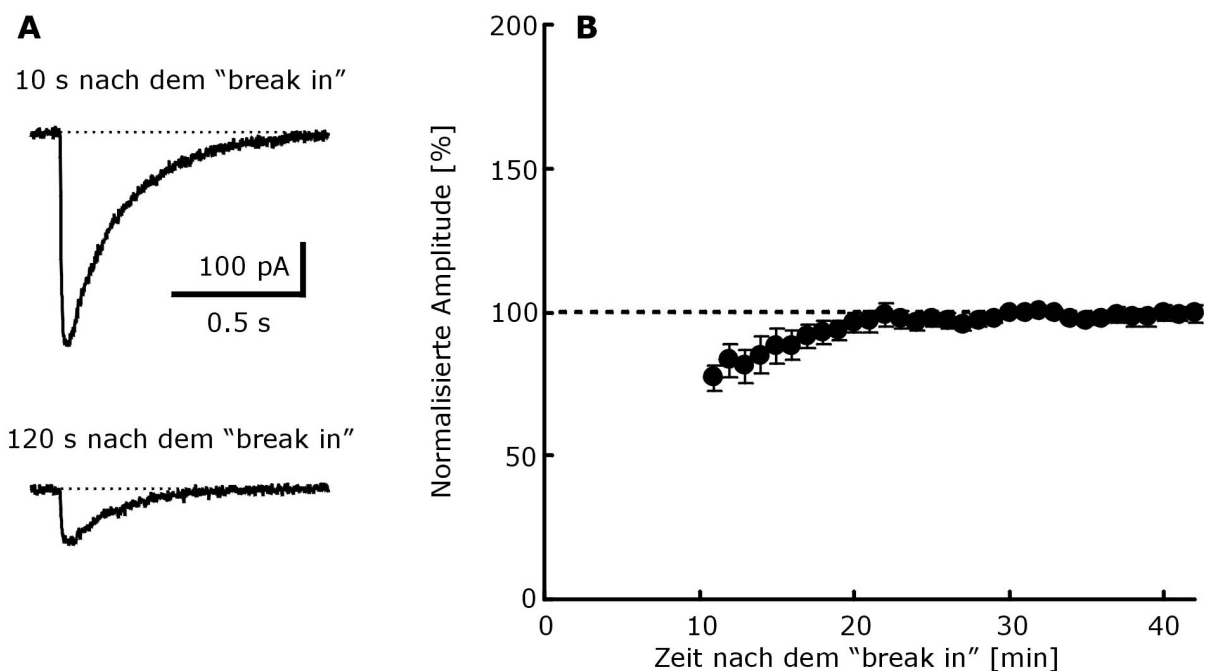


Abb. 3.13: GABA_A -Antworten sind kurz nach dem "break in" depolarisierend. (A) "Voltage-Clamp"-Ableitung eines Lamina V Pyramidenneurons. 10 s nach dem "break in" löste photolytisch appliziertes GABA einen einwärtsgerichteten Cl^- -Strom aus. Auf Grund der Dialyse der Zelle durch die Pipettenlösung war die Amplitude des Cl^- -Stroms 110 s später deutlich reduziert. Die GABA_B -Rezeptoren wurden durch CGP35348 (200 μM) blockiert. Das Membranpotential betrug -60 mV. GABA wurde in unmittelbarer Nähe der am Soma plazierten Elektrode appliziert. **(B)** 20 min nach dem "break in" war die Cl^- -Konzentration im apikalen Dendriten (300 μm vom Soma entfernt) mit der Cl^- -Konzentration der Pipettenlösung im Gleichgewicht. Nach dieser Zeit blieb die Amplitude der am Dendriten ausgelösten Cl^- -Auswärtsströme konstant. GABA wurde alle 20 s appliziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte über jeweils 1 min. Der 100 % Wert repräsentiert den Mittelwert der 30. - 34. Minute ($n = 8$ Neurone).

3.3.1.3 Umkehrpotentiale

Zur Bestimmung der Umkehrpotentiale wurden die Neurone durch Strominjektion sowohl hyper- als auch depolarisiert. Die photolytische Applikation von GABA erfolgte am Plateauwert der Membranpotentialauslenkung. Durch Stimulation der Nervenzellen in unmittelbarer Nähe der Ableitelektrode wurden die Umkehrpotentiale für GABA_A- und GABA_B-Antworten sowohl bei Ableitungen am Soma als auch am apikalen Dendriten (200 µm vom Soma entfernt) bestimmt. Das Umkehrpotential für die am Soma ausgelösten und abgeleiteten GABA_A-Hyperpolarisationen betrug -70 ± 1 mV ($n = 13$ Neurone, Abbildung 3.14A). Der Wert für die GABA_B-Antworten lag bei $-92 \pm 0,6$ mV ($n = 8$ Neurone, Abbildung 3.14B). Das am Dendriten gemessene Umkehrpotential betrug im Mittel $-70 \pm 0,2$ mV für die GABA_A-Antworten ($n = 3$ Neurone, Abbildung 3.14A) und -92 ± 1 mV für die GABA_B-Hyperpolarisationen ($n = 3$ Neurone, Abbildung 3.14B). Somit konnten keine Unterschiede zwischen den somatischen und dendritischen Umkehrpotentialen festgestellt werden. Dies bestätigte zusätzlich die vollständige intrazelluläre Equilibrierung der Cl⁻-Ionen.

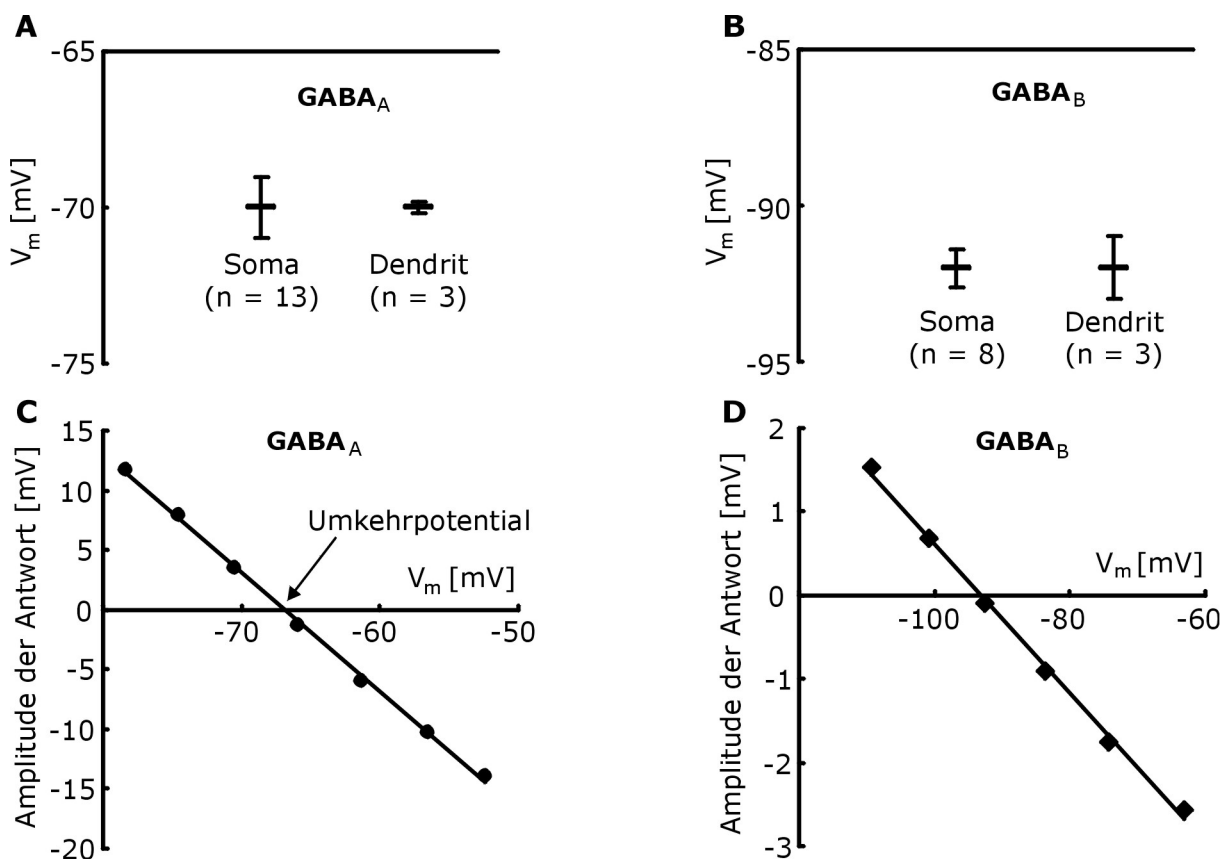


Abb. 3.14: Umkehrpotentiale von GABA_A- und GABA_B-Antworten. (A) und (B) Mittelwerte der Umkehrpotentiale für am Soma beziehungsweise am Dendriten ausgelöste und abgeleitete GABA_A- und GABA_B-Antworten. (C) Bestimmung der Umkehrpotentiale. Die Amplitude einzelner GABA_A-Antworten ist gegen das Membranpotential (V_m) aufgetragen. Die lineare Regressionsgerade zeigt, daß das Umkehrpotential der GABA_A-Antwort bei -67 mV liegt. (D) Das Umkehrpotential der GABA_B-Antwort beträgt -92 mV. Die Abbildungen (C) und (D) zeigen die Daten von zwei Einzelexperimenten.

3.3.1.4 Kinetiken der GABA-Antworten

GABA_A-Rezeptoren, die sich in ihrem Aufbau aus Untereinheiten unterscheiden, verhalten sich oft verschieden bezüglich ihrer Leitfähigkeit und Kinetik. Sehr wahrscheinlich korreliert auch die Kinetik von GABA_B-Antworten mit der molekularen Struktur der sie vermittelnden Rezeptoren. Um bei GABA-Rezeptoren eventuelle Unterschiede im Aufbau aus Untereinheiten in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Lokalisation am Neuron zu bestimmen, wurde die Kinetik der GABA-Antwort an Soma und Dendrit vergleichend gemessen. Da die Anstiegszeit weitgehend von Inaktivierungsmechanismen, wie Diffusion oder Wiederaufnahme, unabhängig ist, war dieser Kinetikparameter für den angestrebten Vergleich besser geeignet, als die Abfalls-Zeitkonstante. Weder für die GABA_A-, noch für die GABA_B-Antworten konnten statistisch signifikante Unterschiede für die Anstiegszeit (0 - 100 %) zwischen dendritisch und somatisch ausgelösten GABA-Antworten festgestellt werden ($p > 0,5$). GABA wurde in unmittelbarer Nähe einer am Soma oder am apikalen Dendriten (200 μm vom Soma entfernt) platzierten Elektrode freigesetzt. Eine elektrotonische Verlangsamung der Anstiegszeit kann daher ausgeschlossen werden (siehe Abschnitt 3.3.2.1). Die mittlere Anstiegszeit betrug 35 ± 2 ms für die somatischen ($n = 13$ Neurone) und 38 ± 4 ms für die dendritischen GABA_A-Antworten ($n = 6$ Neurone). Die Werte für die GABA_B-Antworten lagen bei 327 ± 11 ms am Soma ($n = 11$ Neurone) und 317 ± 12 ms am Dendriten ($n = 7$ Neurone, Abbildung 3.15). Diese Befunde deuten darauf hin, daß beim Aufbau aus Untereinheiten weder für die GABA_A-, noch für die GABA_B-Rezeptoren Unterschiede zwischen somatisch und dendritisch lokalisierten Rezeptoren bestehen.

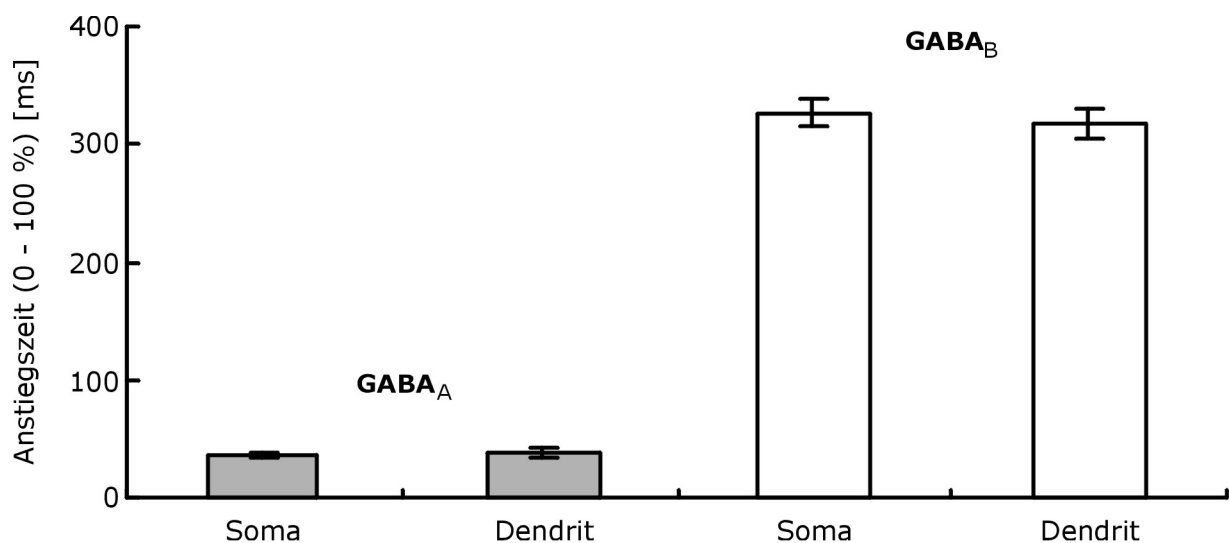


Abb. 3.15: Mittelwerte der Anstiegszeit somatisch und dendritisch ausgelöster GABA_A- und GABA_B-Antworten.

3.3.2 GABA-Sensitivität des apikalen Dendriten

Ziel der folgenden Versuchsserie war es, die differentielle Verteilung der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren entlang des apikalen Dendriten aufzuklären. Hierzu wurde GABA am Dendriten in Abständen von 20 µm bis zu einer Entfernung von 340 µm vom Soma appliziert. Bei somatischer Applikation wird im Vergleich zum Dendriten eine größere Membranfläche stimuliert. Um Effekte auszuschließen, die aus diesem Unterschied resultieren könnten, erfolgte die erste Stimulation in einem Abstand von 40 µm vom Mittelpunkt des Zellkörpers, da die Verjüngung des Somas zum apikalen Dendriten ungefähr in dieser Entfernung endet. Die Ableitung von pharmakologisch isolierten reinen GABA_A- oder GABA_B-Antworten (siehe Abschnitt 3.3.1.1) erfolgte am Soma in unmittelbarer Nähe des ersten Stimulationsortes.

3.3.2.1 Abhängigkeit der Amplitude vom Stimulationsort

Sowohl die Amplituden der GABA_A-, als auch die der GABA_B-Antworten zeigten einen statistisch identischen, linearen Abfall in Richtung des distalen Dendriten ($n = 13$ Neurone für GABA_A und $n = 11$ Neurone für GABA_B, Abbildung 3.16). Dies bedeutet, daß das Soma von jedem dendritischen Stimulationsort die GABA_A- und GABA_B-Antworten im selben Amplitudenverhältnis empfängt. Die Amplituden der hyperpolarisierenden Antworten wurden auf den Amplitudenwert der Soma-nächsten Stimulation (40 µm vom Zentrum des Somas entfernt) normalisiert. Für keinen Stimulationsort konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den GABA_A- und GABA_B-Antwort-Amplituden festgestellt werden ($p > 0,05$). Im Anschluß an die Kartierung der GABA-Sensitivität wurde am ersten Stimulationsort erneut GABA appliziert. Die Daten der Kartierung gingen nur dann in die Gesamtauswertung ein, wenn sich kein Unterschied in der Amplitude gegenüber der ersten Stimulation zeigte.

Da ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Größe der Antwort-Amplitude und der Anzahl der aktivierten Rezeptoren besteht, deuten die Ergebnisse der Kartierungsexperimente ohne eine weitere Analyse darauf hin, daß es keinen Unterschied zwischen der differentiellen Verteilung der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren gibt. Dies ist allerdings nicht mehr der Fall, wenn man die sogenannte Kabel-Theorie berücksichtigt (Rall, 1977; Rall & Segev, 1985; Spruston et al., 1993, 1994). Diese Theorie besagt, daß entfernt vom Ableitort auftretende Potentialänderungen und Ströme durch die passive Weiterleitung im Dendriten eine Abschwächung der Amplitude und eine Verlangsamung der Kinetiken erfahren. Die Stärke dieses elektrotonischen Effektes hängt proportional von der Entfernung vom Ableitort und dem Längswiderstand (R_i), und umgekehrt

proportional vom Radius (a) des Dendriten (Kabel) und dem spezifischen Membranwiderstand (R_m) ab. Weiterhin werden schnelle Signale stärker durch die "Elektrotonik" beeinflusst, als langsame Signale. GABA_A-Antworten mit schnellerer Kinetik müßten dementsprechend stärker in der Amplitude abgeschwächt werden, als GABA_B-Antworten mit langsamerer Kinetik. Der statistisch identische Abfall der Amplituden der GABA_A- und GABA_B-Antworten deutet deshalb darauf hin, daß das relative Verhältnis der GABA_A- zu GABA_B-Rezeptoren am Dendriten größer als am Soma ist. Der Begriff "relatives Verhältnis" beruht auf der Normalisierung der Daten auf den Wert der Amplitude am ersten Stimulationsort (40 μm vom Zentrum des Somas entfernt). Der Wert für das relative Verhältnis der GABA_A- zu GABA_B-Rezeptoren am ersten Stimulationsort ist demnach 1 und drückt nicht den realen Wert der Anzahl der aktivierten GABA_A- zu GABA_B-Rezeptoren aus.

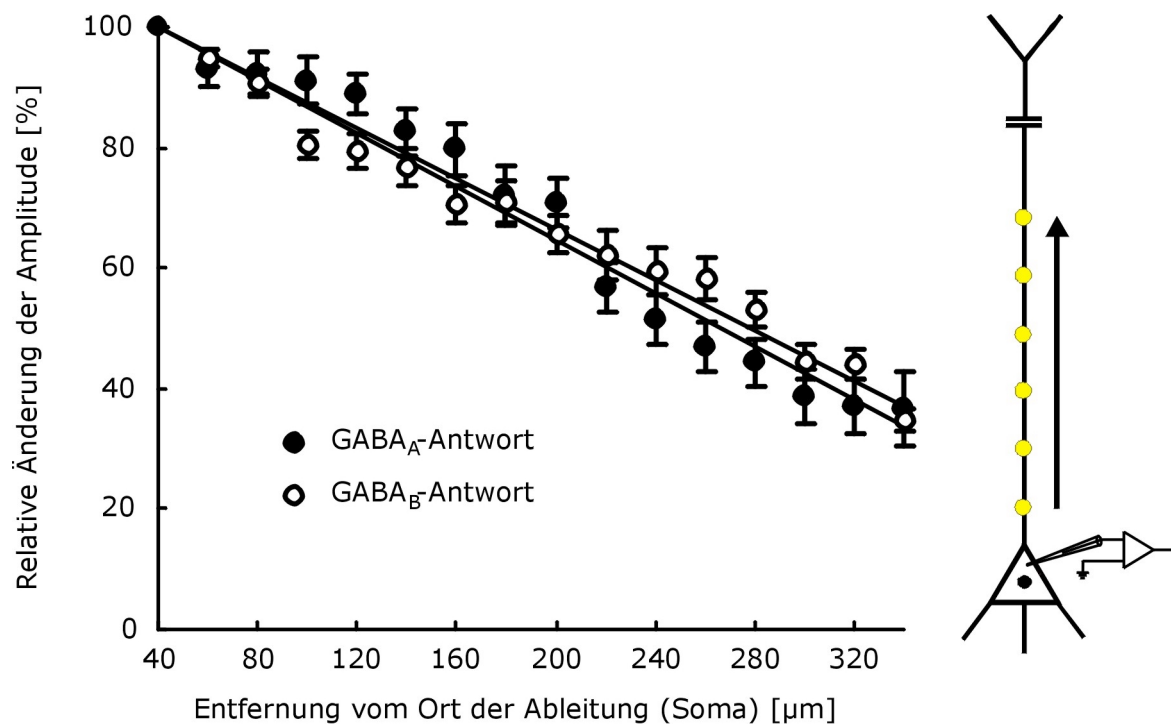


Abb. 3.16: Abhängigkeit der Amplitude vom Stimulationsort. Die untersuchten Neurone wurden am Soma abgeleitet. GABA wurde in Abständen von 20 μm am apikalen Dendriten photolytisch appliziert. Sowohl die normalisierten Amplituden der GABA_A-, als auch der GABA_B-Antworten zeigen einen statistisch identischen, linearen Abfall in Richtung des distalen Dendriten ($n = 13$ Neurone für GABA_A und $n = 11$ Neurone für GABA_B). R^2 für die linearen Regressionsgeraden ist 0,96 für GABA_A und 0,97 für GABA_B.

3.3.2.2 Abhängigkeit der Anstiegszeit vom Stimulationsort

Nach der Kabel-Theorie erfahren die Kinetiken von schnellen Potentialänderungen eine stärkere elektrotonische Verlangsamung als die Kinetiken von langsamen Signalen. Die Anstiegszeit ist von der Amplitude unabhängig und der elektrotonische Einfluß auf diesen Kinetikparameter kann deshalb nicht durch eine erhöhte Anzahl der Rezeptoren

kompensiert werden. Deshalb war zu erwarten, daß die Anstiegszeit der schnellen GABA_A-Antworten stärker verlängert wird, als die Anstiegszeit der langsameren GABA_B-Antworten. Dies war tatsächlich der Fall und bestätigte den unterschiedlichen elektrotonischen Einfluß auf die GABA_A- und GABA_B-Antworten. Die normalisierte Anstiegszeit (20 - 80 %) der GABA_A-Antworten war deutlich verlängert (bis zu 241 ± 19 % bei $320 \mu\text{m}$). Für die GABA_B-Hyperpolarisationen konnte keine Veränderung beobachtet werden (96 ± 9 % bei $320 \mu\text{m}$, $n = 11$ Neurone für GABA_A und GABA_B, Abbildung 3.17). Die absolute Anstiegszeit (20 - 80 %) der nahe der Ableitelektrode ausgelösten Hyperpolarisationen betrug im Mittel $5,1 \pm 0,3$ ms für die GABA_A- ($n = 13$ Neurone) und 171 ± 9 ms für die GABA_B-Antworten ($n = 11$ Neurone).

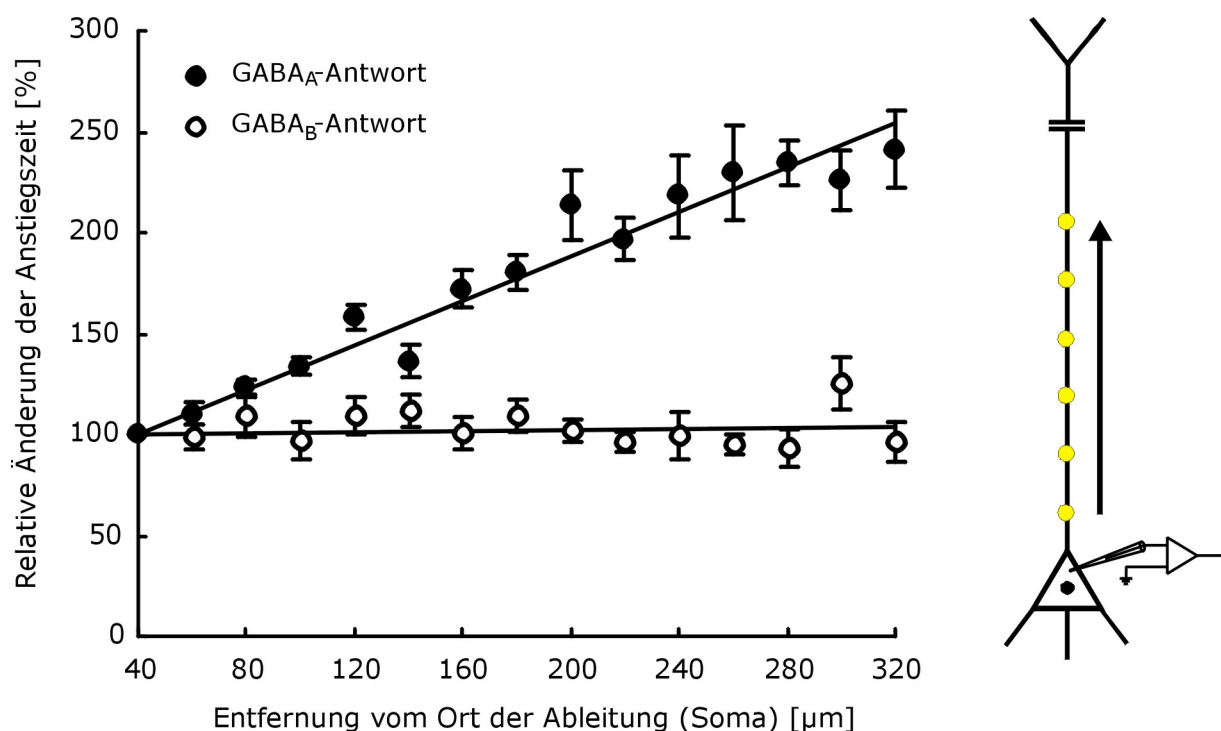


Abb. 3.17: Abhängigkeit der Anstiegszeit vom Stimulationsort. Die Anstiegszeiten der schnellen GABA_A-Antworten wurden durch den elektrotonischen Einfluß deutlich verlängert, während für die GABA_B-Hyperpolarisationen keine Veränderung dieses Kinetikparameters beobachtet werden konnte ($n = 11$ Neurone für GABA_A und GABA_B). R^2 für die linearen Regressionsgeraden ist 0,94 für GABA_A und 0,96 für GABA_B.

3.3.3 Numerische Simulationen der elektrotonischen Amplitudenabschwächung

3.3.3.1 Das äquivalente Zylinder Modell

Zur Quantifizierung der elektrotonischen Amplitudenabschwächung wurden numerische Simulationen durchgeführt. Hierzu wurde das von Rall & Segev (1985) entwickelte äquivalente Zylinder Modell angewendet. In diesem Modell wird der Dendrit als einzelner

Zylinder betrachtet. Er ist durch seine elektrotonische Länge (L) charakterisiert, die durch folgende Gleichung berechnet werden kann:

$$L = l/\lambda \quad (1)$$

wobei l die Länge des äquivalenten Zylinders (in cm) und λ die Längskonstante (ebenfalls in cm) ist. Die Längskonstante ist als Distanz entlang eines unendlichen Zylinders definiert, bei der die Amplitude einer "steady state" Potentialänderung auf 37 % ($1/e$) ihres Anfangswertes abfällt. Sie kann durch folgende Formel berechnet werden:

$$\lambda = \sqrt{\frac{aR_m}{2R_i}} \quad (2)$$

wobei a (in cm) der Radius des Kabels (Zylinders), R_m (in Ωcm^2) der spezifische Membranwiderstand und R_i (in Ωcm) der Längswiderstand ist.

3.3.3.2 Berechnung der elektrotonischen Amplitudenabschwächung

Zur Berechnung der elektrotonischen Amplitudenabschwächung der GABA_A- und GABA_B-Antworten in Abhängigkeit von der Entfernung zum Ableitort wurde Gleichung 14 von Rall & Segev (1985) verwendet. Diese Gleichung ist eine analytische Lösung der Differentialgleichung für das äquivalente Zylinder Modell. Sie beschreibt die Attenuierung von sinuswellenförmigen Spannungsänderungen:

$$\frac{V_x}{V_0} = \sqrt{\frac{\cosh(2aY) + \cos(2bY)}{\cosh(2aL) + \cos(2bL)}} \quad (3)$$

wobei V_0 die Amplitude einer Spannungsänderung am Entstehungsort, V_x die Amplitude dieser Spannungsänderung an einem Ort X und $Y = L-X$ ist. Die Terme in Gleichung (3) bedeuten:

$$a = \sqrt{r} \cos(\Phi/2) \quad (4)$$

$$b = \sqrt{r} \sin(\Phi/2) \quad (5)$$

$$\omega = 2\pi f \quad (6)$$

$$r = \sqrt{(1 + \omega^2 \tau_m^2)} \quad (7)$$

$$\Phi = \arctan(\omega \tau_m) \quad (8)$$

wobei f die Frequenz der Spannungsänderung (in kHz) und τ_m die Membranzeitkonstante (in s) ist (Spruston et al., 1993). Für f wurde die Anstiegszeit (0 – 100 %) der in geringster Entfernung vom Soma ausgelösten GABA_A- und GABA_B-Antworten gewählt. Sie betrug 35 ± 2 ms für die GABA_A-Antworten ($n = 13$ Neurone) und 327 ± 11 ms für die GABA_B-Hyperpolarisationen ($n = 11$ Neurone, siehe Abschnitt 3.3.1.4). Dies ergab Frequenzen von 29 Hz und 3 Hz. Mit Hilfe der Infrarot-Videomikroskopie konnte die Länge der apikalen Dendriten mit ungefähr 1000 μm und der Radius in dem Bereich, in dem GABA appliziert wurde, mit 1 μm bestimmt werden. Die Membranzeitkonstante (τ_m) wurde durch Injektion 160 ms langer, negativer Rechteckstimpulse in das Neuron bestimmt. Sie ist als die Zeit definiert, nach der die Zellmembran durch die Strominjektion zu 63 % umgeladen worden ist. Nach Zugabe von caged GABA, TTX und CGP35348 betrug sie 27 ± 9 ms und in Anwesenheit von caged GABA, TTX und Picrotoxin 20 ± 2 ms ($n =$ jeweils 10 Neurone). Nach der Formel $\tau_m = R_m C_m$ konnte zusätzlich der spezifische Membranwiderstand für die unterschiedlichen pharmakologischen Bedingungen berechnet werden, wobei für die spezifische Membrankapazität C_m der allgemein akzeptierte Wert von 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ verwendet wurde (Spruston et al., 1993). Für die mit CGP35348 beziehungsweise mit Picrotoxin behandelten Neurone betrug R_m 27 ± 3 $\text{k}\Omega\text{cm}^2$ beziehungsweise 20 ± 1 $\text{k}\Omega\text{cm}^2$ ($n =$ jeweils 10 Neurone). Zur Berechnung der Amplitudenabschwächung mußte weiterhin die elektrotonische Länge des apikalen Dendriten abgeschätzt werden. Dies erfolgte durch Einsetzen der gegebenen Werte in die Gleichungen (1) und (2). Für R_i wurde der von Stuart & Spruston (1998) für Lamina V Pyramidenneurone bestimmte Wert von 100 Ωcm verwendet. Daraus ergab sich für L ein Wert von 1. In Tabelle 3.1 sind die für die numerischen Simulationen verwendeten Werte der Parameter zusammengefaßt.

Parameter	Symbol	Einheit	Wert
Elektrotonische Länge	L	-	1
Frequenz der GABA _A -Antworten	f	kHz	0,029
Frequenz der GABA _B -Antworten	f	kHz	0,003
Länge des apikalen Dendriten	l	cm	0,1
Längskonstante	λ	cm	0,1
Längswiderstand	R_i	Ωcm	100
Radius des apikalen Dendriten	a	cm	0,0001
Spezifischer Membranwiderstand (GABA _A)	R_m	Ωcm^2	27000
Spezifischer Membranwiderstand (GABA _B)	R_m	Ωcm^2	20000
Membranzeitkonstante (GABA _A)	τ_m	s	0,027
Membranzeitkonstante (GABA _B)	τ_m	s	0,020

0 – 100 % Anstiegszeit (GABA _A)	-	s	0,035
0 – 100 % Anstiegszeit (GABA _B)	-	s	0,327
Spezifische Membrankapazität	C_m	$\mu\text{F}/\text{cm}^2$	1

Tab. 3.1: Symbole, Einheiten und Werte der für die numerischen Simulationen verwendeten Parameter.

Die aus den gegebenen Werten berechneten Attenuierungskurven bestätigten eine deutlich stärkere Abschwächung der Amplituden der GABA_A-Antworten (Abbildung 3.18). Der Wert der Abschwächung für eine in einer Entfernung von 340 μm vom Soma ausgelöste Antwort lag bei 38 % für eine GABA_A- und bei 19 % für eine GABA_B-Rezeptor-vermittelte Hyperpolarisation.

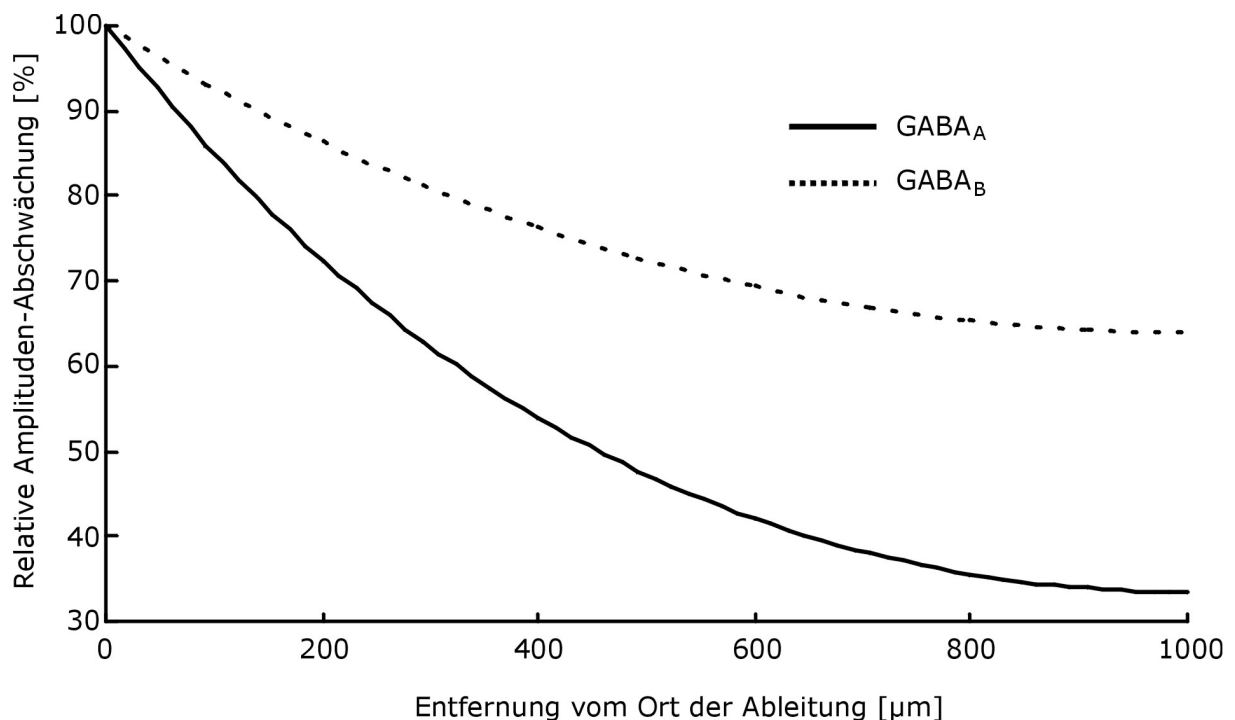


Abb. 3.18: Numerische Simulation der elektrotonischen Abschwächung von GABA_A- und GABA_B-Antworten in Abhängigkeit von der Entfernung vom Ableitort. Für die Berechnung der Attenuierungskurven wurde ein äquivalentes Zylinder Modell verwendet. Der Wert der Abschwächung für eine in einer Entfernung von 340 μm vom Soma ausgelöste Antwort lag bei 38 % für eine GABA_A- und bei 19 % für eine GABA_B-Rezeptor-vermittelte Hyperpolarisation. Bis zu dieser Entfernung wurde GABA photolytisch appliziert.

3.3.4 Dendritische Ganzzelleableitungen

Die bei den somatischen Ableitungen beobachtete statistisch identische Abnahme der GABA_A- und GABA_B-Antwort-Amplituden weist in Kombination mit der unterschiedlichen

elektrotonischen Beeinflußung der Anstiegszeit und den numerischen Simulationen stark darauf hin, daß das relative Verhältnis der GABA_A- zu den GABA_B-Rezeptoren am Dendriten größer ist als am Soma. Zur Bestätigung dieser Verteilung wurde eine Art "inverses" Experiment durchgeführt. Hierbei wurden die Pyramidenneurone in einer Entfernung von 200 µm vom Mittelpunkt des Somas am apikalen Dendriten abgeleitet (Abbildung 3.19A). Nach Etablierung der dendritischen Ganzzelleableitung erfolgte die Aufzeichnung der Strom-Spannungsbeziehung. Hierdurch konnten am Soma generierte Aktionspotentiale ausgelöst werden, die in den Dendriten "zurückkamen" (Stuart & Sakmann, 1994). Ihre Amplituden wurden dadurch elektrotonisch attenuiert und die Kinetiken wurden verlangsamt. Dies wird durch die Überlagerung eines somatisch und eines dendritisch abgeleiteten AP's besonders deutlich (Abbildung 3.19B).

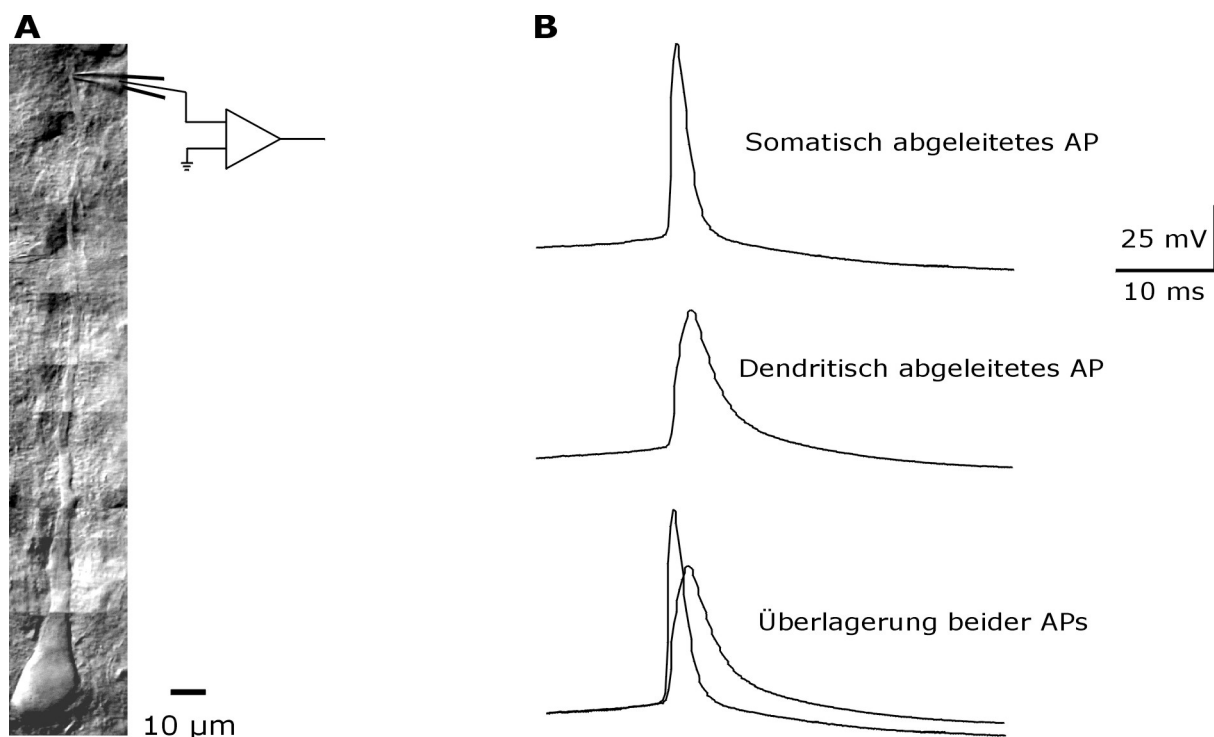


Abb. 3.19: Dendritische Ganzzelleableitung. (A) Infrarot-Videomikroskopiebild eines Lamina V Pyramidenneurons des somatosensorischen Neocortex der Ratte. Im oberen Teil der aus Einzelbildern zusammengesetzten Montage ist die Elektrode zu sehen, mit der die Nervenzelle in einer Entfernung von 200 µm vom Soma am apikalen Dendriten abgeleitet wurde. **(B)** Ein Vergleich von somatisch und dendritisch abgeleiteten Aktionspotentialen zeigt deutlich, daß die Amplitude des im Dendriten zurücklaufenden APs elektrotonisch attenuiert wird und die Kinetiken verlangsamt werden. Die gezeigten Ableitungen stammen von unterschiedlichen Neuronen.

Die photolytische Applikation von GABA erfolgte in 20 beziehungsweise 50 µm Schritten in Richtung des Zellkörpers. Die Ergebnisse dieser Kartierung wurden mit theoretischen Voraussagen verglichen. Die theoretischen Graphen für die dendritischen Ableitungen basierten auf den Ergebnissen der somatischen Ableitungen und wurden folgendermaßen

berechnet: **(1)** Die Gleichungen der Regressionsgeraden für die durch somatische Ableitungen gemessenen Werte (siehe Abbildung 3.16) wurden durch die entsprechenden Gleichungen der simulierten elektrotonischen Attenuierung (siehe Abbildung 3.18) geteilt. Hierdurch konnte der elektrotonische Effekt auf die gemessenen Amplituden der GABA_A- und GABA_B-Antworten mathematisch eliminiert werden. Da die Amplituden direkt proportional zur Anzahl der aktivierten Rezeptoren sind, beschreiben die aus der Division resultierenden Gleichungen die relative Anzahl der aktivierten GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren. **(2)** Die Steigungen der so erhaltenen Gleichungen wurden invertiert. Dieser mathematische Schritt war nötig, weil durch die dendritischen Ableitungen die Verteilung der GABA-Rezeptoren entlang des Dendriten aus der entgegengesetzten Richtung untersucht wurde. **(3)** Die durch dendritische Ableitungen gemessenen Amplituden der GABA-Antworten werden ebenfalls elektrotonisch abgeschwächt. Aus diesem Grund wurden die Gleichungen, nach Invertierung der Steigung, mit den entsprechenden Gleichungen der simulierten elektrotonischen Attenuierung (siehe Abbildung 3.18) multipliziert.

Abbildung 3.20 zeigt die Ergebnisse der dendritischen Ableitungen ($n = 6$ Neurone für die GABA_A-Antworten und 7 Neurone für die GABA_B-Hyperpolarisationen). Die linearen Regressionsgeraden (durchgezogene Linien) zeigten eine hohe Übereinstimmung mit dem theoretisch vorhergesagten Verlauf (gestrichelte Linien). Dies bestätigt, daß die numerischen Simulationen korrekt durchgeführt wurden und das relative Verhältnis der GABA_A- zu den GABA_B-Rezeptoren am Dendriten größer ist als am Soma.

3.3.5 Quantifizierung des relativen Verhältnisses der GABA_A- zu den GABA_B-Rezeptoren

Wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben, konnte durch eine Division der Gleichungen der Regressionsgeraden für die bei den somatischen Ableitungen gemessenen Werte (siehe Abbildung 3.16) durch die entsprechenden Gleichungen der simulierten elektrotonischen Attenuierung (siehe Abbildung 3.18) der elektrotonische Effekt auf die gemessenen Amplituden der GABA_A- und GABA_B-Antworten mathematisch eliminiert werden. Die daraus resultierenden Gleichungen beschreiben die relative Anzahl der aktivierten GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren. Teilt man diese Gleichungen durcheinander, dann erhält man das relative Verhältnis der GABA_A- zu den GABA_B-Rezeptoren in Abhängigkeit von der Entfernung vom Ableitort. Dieses Verhältnis betrug am Soma-nächsten Stimulationsort (40 μm vom Zentrum des Zellkörpers entfernt) 1 und am apikalen Dendriten (bei einer Distanz von 340 μm) 1,25.

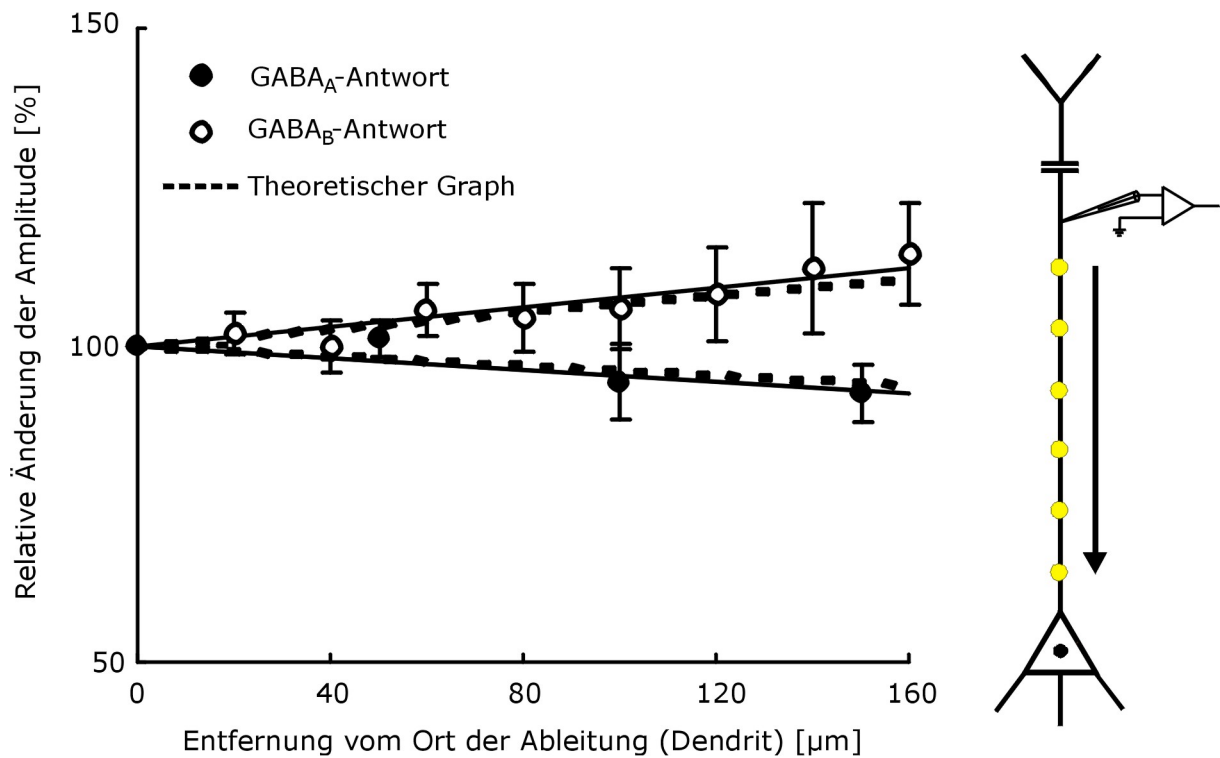


Abb. 3.20: Dendritische Ganzzelleableitungen. Durch eine Art "inverses Experiment" wurden die Ergebnisse der somatischen Ableitungen und der numerischen Simulationen überprüft. Hierzu wurden pharmakologisch isolierte GABA_A- und GABA_B-Antworten in einer Entfernung von 200 µm vom Soma am apikalen Dendriten abgeleitet (n = 6 Neurone für GABA_A und 7 Neurone für GABA_B). Die photolytische Applikation von GABA in Richtung Soma erfolgte in 20 beziehungsweise 50 µm Schritten. Die durchgezogenen Linien repräsentieren lineare Regressionsgeraden für die Meßwerte. R² betrug 0,96 für die GABA_A-Hyperpolarisationen und 0,87 für die GABA_B-Antworten. Die auf den Meßwerten der somatischen Ableitungen und den numerischen Simulationen beruhenden (theoretischen) Graphen werden durch die gestrichelten Linien repräsentiert. Sie zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den Regressionsgeraden.

4 Diskussion

4.1 Elektrophysiologische Eigenschaften der untersuchten Neurone

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Infrarot-Videomikroskopie identifizierte Lamina V Pyramidenneurone entweder am Soma oder am apikalen Dendriten abgeleitet. Eine elektrophysiologische Charakterisierung der Nervenzellen erfolgte anhand des RMP's, der AP-Amplitude, des Eingangswiderstandes und der anomalen Rektifizierung. Die Mittelwerte dieser Parameter (siehe Abschnitt 3.1) entsprechen den Ergebnissen anderer Studien (Burgard & Hablitz, 1993a; Stuart et al., 1993; Frick, 1994, 1999; Stuart & Sakmann, 1994, 1995; Stuart & Spruston, 1998; Frick, 1999). Das am apikalen Dendriten (200 μm vom Mittelpunkt des Zellkörpers entfernt) gemessene mittlere RMP (-61 mV) unterschied sich nicht vom durchschnittlichen somatischen RMP (-61 mV). Diese Beobachtung weist darauf hin, daß die untersuchten Neurone isopotential sind und steht im Einklang mit den Arbeiten von Stuart & Sakmann (1995) und Stuart & Spruston (1998), bei denen die Neurone simultan am Soma und am Dendriten abgeleitet wurden.

Alle untersuchten Neurone zeigten das typische Entladungsverhalten von sogenannten RS ("regular spiking")-Neuronen (Connors & Gutnick, 1990). Sie antworteten auf lang anhaltende, überschwellige Strompulse mit einer Serie von APs, die schnell akkomodierten. Kein einziges der abgeleiteten Pyramidenneurone konnte als IB ("intrinsically bursting")-Neuron identifiziert werden. Hierfür sind folgende Erklärungen möglich: **(1)** Alle abgeleiteten Neurone waren vom RS-Typ. **(2)** Der für die IB-Neurone typische "Burst" wurde durch die Zusammensetzung der verwendeten ACSF verhindert. **(3)** Die intrinsischen Eigenschaften der Lamina V Pyramidenneurone von 14 – 21 Tage alten Ratten entsprechen nicht vollständig denen von adulten Nervenzellen (Frick, 1999).

Neocorticale Pyramidenneurone besitzen spannungsabhängige, für Na^+ - und K^+ -Ionen permeable Ionenkanäle, die durch eine Hyperpolarisation aktiviert werden. Diese einwärts-gleichrichtenden Membrankanäle vermitteln den sogenannten I_h -Strom ("hyperpolarization-activated current"), der depolarisierend wirkt und somit das Neuron repolarisiert (als Übersicht siehe Pape, 1996). Interessanterweise konnte bei der Auslenkung des Membranpotentials durch Injektion von negativem Strom der für den I_h -Strom typische "Sag" bei nur wenigen Neuronen beobachtet werden. Wenn überhaupt, dann trat der I_h -Strom erst ab einem Membranpotential von ungefähr -70 mV auf. Diese Beobachtung steht mit den Ergebnissen der Arbeiten von Frick (1994, 1999) im Einklang.

Für die Experimente dieser Studien wurden ebenfalls 2 - 3 Wochen alte Ratten verwendet; die Ableitung der Neurone erfolgte bei Raumtemperatur. Im Gegensatz dazu zeigten Stuart & Spruston (1998), daß die durch den I_h -Strom vermittelte Repolarisation neocorticaler Lamina V Pyramidenneurone reproduzierbar bei einem Membranpotential von ungefähr -60 mV auftritt. Diese Versuche wurden allerdings an älteren Neuronen und bei einer höheren Temperatur durchgeführt. Die Stärke der Depolarisation durch den I_h -Strom scheint demnach vom Alter der Nervenzellen und/oder der Temperatur abhängig zu sein.

4.2 Räumliche Spezifität neocorticaler LTD

Zu den elementaren Fähigkeiten selbst primitiver Nervensysteme gehört "Lernen", das heißt die Reaktionsweise des Systems kann sich abhängig von Erfahrungen ändern. Die prominentesten zellulären Modellvorstellungen von Lernvorgängen im ZNS von Vertebraten sind die Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD). Unter LTP versteht man die Verstärkung, unter LTD die Verminderung der Effizienz einer Synapse. Diese Formen der Langzeitplastizität wurden vor allem für glutamaterge Synapsen beschrieben.

4.2.1 Synaptischer Ort der LTP-/LTD-Expression

Im Gegensatz zur einhelligen Meinung, daß die Induktion von synaptischer Langzeitplastizität von einer Erhöhung der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration abhängt (siehe Abschnitt 1.2.1), wird der synaptische Ort der LTP-/LTD-Expression trotz intensiver Forschung kontrovers diskutiert. Bisher wurde die Beteiligung von post- und/oder präsynaptischen Mechanismen vor allem mit indirekten Methoden untersucht (siehe Abschnitt 1.2.3). Für einen postsynaptischen Mechanismus sprechen folgende Beobachtungen: **(1)** LTP wird von einer Vergrößerung und LTD von einer Verkleinerung der Amplitude von "Minis" (mEPSCs, "miniature EPSCs") begleitet (Manabe et al., 1992; Oliet et al., 1996). **(2)** LTP bewirkt eine Potenzierung und LTD eine Abnahme der Antwort von hippocampalen CA1 Pyramidenneuronen auf exogen applizierte Agonisten (Davies et al., 1989; Kandler et al., 1998). **(3)** LTP führt zu einer Erhöhung der Einzelkanalleitfähigkeit von AMPA-Rezeptoren (Benke et al., 1998). **(4)** LTP bewirkt eine Phosphorylierung und LTD eine Dephosphorylierung bestimmter Untereinheiten von AMPA-Rezeptoren (Barria et al., 1997; Lee et al., 1998). **(5)** Die späte Phase von LTP wird von einer PKA (Proteinkinase A)-abhängigen Verstärkung der Synthese von AMPA-Rezeptoren begleitet (Nayak et al., 1998). **(6)** LTD in hippocampalen Zellkulturen ist mit

einer schnellen Umverteilung von postsynaptischen Glutamatrezeptoren assoziiert (Carroll et al., 1999).

Obwohl diese Ergebnisse stark auf die Beteiligung postsynaptischer Modifikationen bei der LTP und LTD hinweisen, existieren auch Untersuchungen, die für präsynaptische Veränderungen der Transmitterausschüttung sprechen. Man nimmt an, daß der hierfür notwendige Informationsaustausch zwischen dem postsynaptischen Induktions- und dem präsynaptischen Expressionsort über sogenannte "retrograde Messengers" erfolgt. Als prominenteste Vertreter gelten hierbei die Arachidonsäure sowie das Stickstoff- und Kohlenmonoxid (als Übersicht siehe Jodar & Kaneto, 1995). Im folgenden seien einige Hinweise auf eine präsynaptische Expression von Langzeitplastizität angeführt: **(1)** LTP wird von einer Erhöhung und LTD von einer Reduktion der Häufigkeit synaptischer "Failures" begleitet (Malinow & Tsien, 1990; Kullmann & Nicoll, 1992; Stevens & Wang, 1994; Bolshakov & Siegelbaum, 1995; Isaac et al., 1996). **(2)** LTP ist mit einer Erhöhung und LTD mit einer Abnahme der Frequenz von "Minis" assoziiert (Malgaroli & Tsien, 1992; Goda & Stevens, 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, daß durch Applikation von Glutamat mittels Infrarot-gelenkter Photostimulation an Lamina V Pyramidenneuronen des Neocortex reproduzierbar ein LTD-ähnlicher Effekt induziert werden kann (siehe Abbildung 3.2). Die Imitation von synaptischer Transmission mit Hilfe der verwendeten Technik ist ein ausgesprochen reduktionistischer experimenteller Ansatz. Aus diesem Grund wurde bei den Versuchen auf eine möglichst "physiologische" Durchführung geachtet: **(1)** Die Ableitung der Neurone erfolgte beim RMP im Brückenmodus. Somit wurden Potentialänderungen gemessen, die dem natürlichen Verhalten von Nervenzellen entsprechen. **(2)** Glutamat wurde am apikalen Dendriten in einer Entfernung von 100 – 150 µm vom Soma appliziert. In dieser Region (Lamina IV) bilden viele thalamocorticale Afferenzen mit den apikalen Dendriten der Lamina V Pyramidenneurone glutamaterge Synapsen aus (Peters, 1987). Thalamocorticale Synapsen zeigen sowohl LTP als auch LTD (Feldman et al., 1998). Glutamat wurde somit in einer Region des Dendriten appliziert, in der glutamaterge synaptische Transmission stattfindet und in der sich plastische Vorgänge abspielen. **(3)** Für die Photostimulation wurde eine veresterte Glutamatverbindung verwendet, die keine durch eine spontane Spaltung bedingte Desensibilisierung der Glutamatrezeptoren bewirkt (siehe Abschnitt 2.2.3). **(4)** Es wurde die kürzeste technisch mögliche Applikationsdauer (3 ms) gewählt und die Intensität des Lasers für die Kontrollstimulation so eingestellt, daß die Amplituden der Glutamatantworten ungefähr denen von "unitary" EPSPs entsprachen (siehe Abschnitt 3.2.1.1). Hierdurch konnten synaptische EPSPs relativ gut imitiert werden (siehe Abbildung 3.9A).

Nach dem derzeitigen Stand der Technik erlaubt die Methode der Infrarot-gelenkten Photostimulation noch keine selektive Stimulation einzelner synaptischer Kontakte. Folgende methodische Limitationen sind hierfür verantwortlich: **(1)** Die derzeit maximal mögliche Kontrastverstärkung des Infrarot-Videomikroskopie-Verfahrens reicht für die Visualisierung einzelner Synapsen nicht aus. **(2)** Die räumliche Auflösung der Laser-Photostimulation ist nicht groß genug (die HWFM betrug im Mittel 4 μm , siehe Abschnitt 3.2.4.1). Da corticale Neurone sowohl synaptisch als auch extrasynaptisch lokalisierte Glutamatrezeptoren besitzen (Craig et al., 1994; Baude et al., 1995), muß davon ausgegangen werden, daß die photolytisch ausgelösten Glutamatantworten aus der Aktivierung von synaptischen und extrasynaptischen Rezeptoren resultierten. Eine Beteiligung der extrasynaptischen Glutamatrezeptoren bei der Induktion und/oder Expression der Photostimulations-LTD kann daher nicht ausgeschlossen werden. Die Aufklärung des synaptischen Ortes der LTD-Expression im Neocortex setzt deshalb voraus, daß die Photostimulations-LTD einer synaptischen LTD entspricht. Die im folgenden aufgeführten Punkte zeigen klar, daß es sich bei der Photostimulations-LTD nicht um ein Artefakt handelt, sondern um eine Form von Langzeitplastizität, die die selben Eigenschaften und Induktions- und Expressionsmechanismen wie synaptische LTD besitzt: **(1)** Der beobachteten Reduktion der Amplitude der Glutamatantwort lag keine Schädigung der Neurone durch das UV-Licht zugrunde (siehe Abschnitt 3.2.1.2). **(2)** In Analogie zur synaptischen LTD tritt die Photostimulations-LTD unmittelbar nach der Durchführung des Induktions-Protokolls auf und hält für die gesamte Dauer der Ableitung (60 min) an (siehe Abbildung 3.2 und 3.9C). **(3)** Eine Stimulation von 1 min mit einer Frequenz von 5 Hz induziert sowohl eine synaptische LTD als auch eine Photostimulations-LTD. Zur Induktion einer synaptischen LTD wurden von anderen Arbeitsgruppen ähnliche Protokolle verwendet (Staubli & Lynch, 1990; Dudek & Bear, 1992; Goda & Stevens, 1996; Fitzsimonds et al., 1997; Oliet et al., 1997; Carrol et al., 1999). **(4)** Synaptische LTD ist mit einer Abnahme der dendritischen Glutamatsensitivität assoziiert (siehe Abbildung 3.9C). **(5)** Im Hippocampus und Neocortex erfolgt die für die Induktion von LTP beziehungsweise LTD notwendige Erhöhung der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration durch eine starke Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, spannungsabhängigen Ca^{2+} -Leitfähigkeiten (VDCCs, "L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels") oder metabotropen Glutamatrezeptoren (als Übersicht siehe Malenka, 1995). Sowohl die Photostimulations-LTD als auch die synaptische LTD und die mit ihr assoziierte Reduktion der dendritischen Glutamatsensitivität zeigten eine NMDA-Rezeptor-Abhängigkeit (siehe Abbildung 3.4 und 3.10). In Analogie zu synaptischer LTD im visuellen Cortex (Bröcher et al., 1992) und in der CA1-Region des Hippocampus (Mulkey & Malenka, 1992) wurde für die Photostimulations-LTD ebenfalls eine Ca^{2+} -Abhängigkeit nachgewiesen (siehe Abbildung 3.5). Die hierfür eingesetzten Konzentrationen des NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 und des Ca^{2+} -Chelators

BAPTA entsprechen den Angaben anderer Studien (Coan et al., 1987; Swartzwelder et al., 1989; Mulkey & Malenka, 1992; Cormier et al., 1993; Kombian & Malenka, 1994; Carrol et al., 1999). **(6)** Die Amplitude der Glutamatantworten beziehungsweise der EPSPs wurde sowohl bei der Photostimulations-LTD als auch bei der synaptischen LTD und der mit ihr assoziierten Abnahme der dendritischen Glutamatsensitivität um ungefähr 30 % reduziert (siehe Abschnitt 3.2.1.1 und Abbildung 3.9B). **(7)** Weder die Photostimulations-LTD noch die synaptische LTD und die mit ihr assoziierte Reduktion der dendritischen Glutamatsensitivität wurde von einer Veränderung der Anstiegszeit (20 - 80 %) sowie der Abfallszeitkonstante der Glutamatantwort begleitet (siehe Abbildung 3.6 und 3.11). **(8)** Die synaptische LTD und die mit ihr assoziierte Reduktion der dendritischen Glutamatsensitivität schließt eine Photostimulations-LTD aus (siehe Abbildung 3.9B und C). **(9)** Kandler et al. (1998) konnten an den Dendriten hippocampaler CA1 Pyramidenneurone ebenfalls eine Photostimulations-LTD von Glutamatrezeptoren induzieren. Auch diese Form der Langzeitplastizität war NMDA-Rezeptor-abhängig und zeigte eine ähnlich starke Reduktion der Amplitude der Glutamatantworten wie die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Photostimulations-LTD. Auch für die synaptische LTD im somatosensorischen Neocortex und Hippocampus scheint eine Amplitudenabschwächung um ungefähr 30 - 40 % charakteristisch zu sein (zum Beispiel Mulkey & Malenka, 1992; Markram et al., 1997).

Mit Ausnahme der Versuche mit synaptischer Stimulation wurden alle Experimente in Anwesenheit von TTX durchgeführt. Dies bedeutet, daß die Photostimulations-LTD ein rein postsynaptischer Effekt ist. Dieser Befund deutet in Kombination mit den im vorhergehenden Absatz aufgeführten Punkten (6) und (8) stark darauf hin, daß auch die Expression synaptischer LTD im Neocortex rein postsynaptisch erfolgt.

4.2.2 Induktion von Photostimulations-LTP

Die "sliding threshold theory" (Bienenstock et al., 1982; Bear, 1995) besagt, daß eine LTP aus einer starken, und eine LTD aus einer im Vergleich dazu geringeren Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration resultiert (siehe Abschnitt 1.2.2). Trotz verschiedener experimenteller Modifikationen, die einen stärkeren Ca^{2+} -Einstrom in die Nervenzelle bewirkten, konnte bei keinem der untersuchten Neurone eine Erhöhung der dendritischen Glutamatsensitivität (Photostimulations-LTP) induziert werden (siehe Abschnitt 3.2.2). Folgende Erklärungen sind hierfür möglich: **(1)** Neocorticale LTP wird präsynaptisch exprimiert. Arbeiten, die darauf hinweisen, sind in Abschnitt 4.2.1 aufgeführt. **(2)** An extrasynaptischen Membranabschnitten fehlen intrazelluläre Proteine (zum Beispiel die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, siehe Abschnitt 1.2.2), die

für die Induktion von LTP essentiell sind. Die Methode der Infrarot-gelenkten Photostimulation erlaubt noch keine selektive Stimulation einzelner synaptischer Kontakte (siehe Abschnitt 4.2.1). Aus diesem Grund muß davon ausgegangen werden, daß das mit dieser Technik photolytisch applizierte Glutamat sowohl synaptische als auch extrasynaptische Rezeptoren aktiviert, und daß deshalb die Induktion von Photostimulations-Langzeitplastizität auch an extrasynaptischen Membranabschnitten erfolgt. **(3)** Trotz der experimentellen Modifikationen, die einen stärkeren Ca^{2+} -Einstrom in das Neuron bewirkten, wurde die für eine Induktion von Photostimulations-LTP notwendige intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nicht erreicht. Folgende Ursachen sind hierfür vorstellbar: **(a)** Das durch die Photolyse von caged Glutamat freigesetzte Glutamat (ungefähr 50 μM , siehe Abschnitt 2.2.3) aktiviert die NMDA-Rezeptoren nicht in ausreichendem Maß (Kandler et al., 1998). Im Vergleich dazu liegt bei synaptischer Transmission Glutamat im synaptischen Spalt in millimolaren Konzentrationen vor (Clements et al., 1992). **(b)** An extrasynaptischen Membranabschnitten sind im Vergleich zur postsynaptischen Dichte (PSD) weniger NMDA-Rezeptoren lokalisiert (Craig et al., 1994). **(c)** Glutamat wurde am Schaft des apikalen Dendriten appliziert. In dieser relativ "offenen" neuronalen Struktur könnten die Ca^{2+} -Ionen eventuell schneller vom Ort der LTP-Induktion wegdiffundieren, als in den Dornfortsätzen, die eine starke postsynaptische Kompartimentierung darstellen.

4.2.3 Molekularer Mechanismus neocorticaler LTD

Bei der am besten charakterisierten Form von Langzeitplastizität, nämlich der LTP an der glutamatergen Schaffer-Kollateral-Synapse, unterscheidet man zwischen einer "frühen" und einer "späten" Form der Langzeitpotenzierung. Im Gegensatz zur frühen LTP ist die späte LTP von einer mRNA- und Proteinsynthese abhängig. Dieser genomische Effekt scheint für die Expression einer Langzeitpotenzierung verantwortlich zu sein, die länger als vier Stunden anhält. Für die Aufrechterhaltung der Eingangsspezifität (siehe Abschnitt 1.2.4) während der späten LTP existieren mehrere Hypothesen. Eine davon, die "synaptic tag"-Hypothese, besagt, daß Synapsen, an denen eine LTP induziert wurde, als Folge davon eine molekulare "Adresse" besitzen. An diese Adresse werden die am Soma exprimierten Proteine "geschickt" und sind dann dort an der Expression der späten LTP beteiligt (als Übersicht siehe Frey & Morris, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse bezüglich neocorticaler LTD aber bereits innerhalb der ersten Stunde nach Durchführung des Induktions-Protokolls gewonnen. Aus diesem Grund können keine Aussagen über die potentielle Beteiligung einer Neusynthese von Proteinen bei dieser Form von Langzeitplastizität gemacht werden. Im folgenden werden deshalb molekulare

Mechanismen diskutiert, die ohne Beteiligung einer Genexpression für die Ausbildung der beobachteten Photostimulations- und synaptischen LTD zuständig sein könnten.

Die Induktion von Photostimulations- und synaptischer LTD erfolgt überaus schnell. Eine Reduktion der Amplitude der Glutamatantworten und EPSPs trat schon 1 Minute nach Durchführung des Induktions-Protokolls auf (siehe Abbildung 3.2 und 3.9C). Dies spricht für einen lokalen, membrangebundenen Prozess. Zahlreiche Arbeiten weisen darauf hin, daß schnelle Modifikationen postsynaptischer AMPA-Rezeptoren an der Expression NMDA-Rezeptor-abhängiger LTP und LTD beteiligt sind. Die Ergebnisse einiger dieser Studien liefern zwei mögliche postsynaptische Mechanismen von Langzeitplastizität: **(1)** LTP führt zu einer Erhöhung der Einzelkanalleitfähigkeit von AMPA-Rezeptoren. Einer solchen Modulation liegt wahrscheinlich eine Phosphorylierung der AMPA-Rezeptoren zugrunde (Benke et al., 1998). Dies steht mit der Beobachtung im Einklang, daß im Hippocampus LTP eine Phosphorylierung und LTD eine Dephosphorylierung bestimmter Untereinheiten von AMPA-Rezeptoren bewirkt (Barria et al., 1997; Lee et al., 1998). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Photostimulations-LTD als auch die in Abschnitt 3.2.5 beschriebene synaptische LTD könnten demnach aus einer Dephosphorylierung und einer dadurch bedingten Verringerung der Einzelkanalleitfähigkeit von AMPA-Rezeptoren resultieren. Die von Kandler et al. (1998) an der Expression von hippocampaler Photostimulations-LTD beobachtete Beteiligung von Proteinphosphatasen stützt diese Hypothese. **(2)** LTD in hippocampalen Zellkulturen ist mit einer Reduktion der Anzahl synaptischer AMPA-Rezeptoren assoziiert (Carroll et al., 1999). In Analogie zu dem in Punkt (1) behandelten Mechanismus ist auch bei dieser Art der Amplitudenmodulation keine Veränderung der Kanalkinetiken zu erwarten. Da weder die Photostimulations-LTD noch die synaptische LTD und die mit ihr assoziierte Reduktion der dendritischen Glutamatsensitivität von einer Veränderung der Anstiegszeit (20 - 80 %) sowie der Abfallszeitkonstante der Glutamatantwort begleitet wurde (siehe Abbildung 3.6 und 3.11), könnte auch der neocorticalen LTD ein solcher Mechanismus zugrunde liegen.

Abbildung 3.9C zeigt, daß die synaptische LTD an neocorticalen Lamina V Pyramidenneuronen mit einer Abnahme der dendritischen Glutamatsensitivität assoziiert ist. Die Entwicklung der Glutamatsensitivität und die der EPSP-Amplituden zeigten allerdings in den ersten Minuten nach der synaptischen Tetanisierung einen jeweils deutlich verschiedenen Zeitverlauf. Die Abnahme der Glutamatsensitivität entwickelte sich weitaus langsamer, als die synaptische LTD. Erst 35 min nach der Induktion war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der synaptischen LTD und der Reduktion der Glutamatsensitivität mehr festzustellen. Zur Erklärung der langsamen Abnahme der Glutamatsensitivität sei darauf hingewiesen, daß synaptisch freigesetztes Glutamat

hauptsächlich an Glutamatrezeptoren der PSD bindet. Im Gegensatz dazu aktiviert das photolytisch freigesetzte Glutamat die synaptischen und extrasynaptischen Rezeptoren einer größeren Membranfläche (siehe Abschnitt 4.2.1). Die für (CNB)-caged Glutamat experimentell bestimmte HWFM betrug im Mittel 4 μm (siehe Abschnitt 3.2.4.1). Der Durchmesser des Ortes, an dem caged Glutamat photolytisch gespalten wurde, kann deshalb mit ungefähr 10 μm angegeben werden. Aus den genannten Gründen wäre es vorstellbar, daß sich die synaptische LTD mit einer zeitlichen Verzögerung auf extrasynaptische Membranabschnitte ausbreitet. Für die dendritische Glutamatsensitivität würde dies bedeuten, daß sie ebenfalls zeitlich verzögert abnimmt.

4.2.4 Neocorticale LTD besitzt eine hohe räumliche Spezifität

Die Frage nach der räumlichen Spezifität von Langzeitplastizität auf der Ebene einzelner oder weniger Synapsen konnte bis heute mangels geeigneter Untersuchungstechniken nicht befriedigend beantwortet werden (siehe Abschnitt 1.2.4). Die hohe räumliche Auflösung der Infrarot-gelenkten Photostimulation ermöglichte es nun im Rahmen der vorliegenden Dissertation, die räumliche Spezifität der beobachteten Photostimulations-LTD zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Photostimulations-LTD eine räumliche Spezifität von mindestens 10 μm besitzt. Eine genauere Quantifizierung wurde durch die räumliche Auflösung der Infrarot-gelenkten Photostimulation limitiert (siehe Abschnitt 3.2.4.2). Da die Photostimulations-LTD in Bezug auf ihre Eigenschaften sowie ihre Induktions- und Expressionsmechanismen einer synaptischen LTD gleichgesetzt werden kann (siehe Abschnitt 4.2.1), scheint eine derart hohe räumliche Spezifität auch für eine synaptische LTD zu gelten. Dieses Ergebnis steht mit der Beobachtung im Einklang, daß eine synaptische Stimulation zu einer transienten Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration an einzelnen Dornfortsätzen von Pyramidenneuronen der hippocampalen CA1-Region führt (Yuste & Denk, 1995). Die hohe räumliche Spezifität liefert in Kombination mit den Befunden, die überzeugend für die rein postsynaptische Expression neocorticaler LTD sprechen (siehe Abschnitt 4.2.1), weiterhin einen Hinweis dafür, daß bei dieser Form von Langzeitplastizität keine "retrograden Messengers" beteiligt sind.

LTP und LTD sind die prominentesten zellulären Modellvorstellungen von Lernvorgängen im ZNS der Vertebraten. Die Speicherdichte für Information hängt demnach sowohl von der Anzahl der synaptischen Kontakte als auch von der räumlichen Spezifität synaptischer Langzeitplastizität ab. Die hohe räumliche Spezifität der Photostimulations-LTD weist darauf hin, daß eine Feinabstimmung der Transmissionsstärke in Abhängigkeit von der synaptischen Aktivität auf der Ebene

einzelner Synapsen stattfindet. Ein solch hochspezifischer Mechanismus wäre für die Erklärung einer "high-density" Speicherung von Information äußerst attraktiv.

4.3 Differentielle Verteilung der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren

Eine Vielzahl morphologisch äußerst heterogener Interneurone bildet mit neocorticalen Pyramidenneuronen GABAerge Synapsen aus. Die sogenannten Kandelaberzellen innervieren vor allem das Initialsegment des Axons, die Korbzellen das Soma und die proximalen Dendriten, und die "Double-Bouquet"-Zellen mehr distal gelegene dendritische Regionen (Thomson et al., 1996). Die präsynaptische Ausschüttung von GABA bewirkt über die Aktivierung von postsynaptisch lokalisierten GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren für gewöhnlich eine Hyperpolarisation des Neurons. Dadurch kann die Initiierung von APs, das aktive Zurücklaufen von APs in die Dendriten und ein durch spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle vermittelter Ca²⁺-Einstrom am Dendriten verhindert werden. Die Aktivierung der GABA-Rezeptoren bewirkt über eine lokale Reduktion des spezifischen Membranwiderstandes weiterhin ein "Shunting" von exzitatorischen synaptischen Eingängen (Nusser et al., 1998).

Die Verteilung der GABA-Rezeptoren im Neocortex der Ratte wurde bisher mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden untersucht. Generell zeigte sich dabei eine inhomogene Verteilung in den verschiedenen Laminae (siehe Abschnitt 1.1.2.3). Die erwähnten Studien erlauben aber noch keine eindeutige Aussage über die differentielle Verteilung von funktionellen GABA-Rezeptorsubtypen auf einzelnen corticalen Neuronen. Die Kenntnis einer solchen Verteilung wäre jedoch für das Verständnis des GABAergen Innervationsmusters, der von GABA bewirkten postsynaptischen Effekte sowie der dendritischen Integration von IPSPs von großer Bedeutung. Die hohe räumliche und zeitliche Auflösung der Infrarot-gelenkten Photostimulation ermöglichte es nun im Rahmen der vorliegenden Dissertation die differentielle Verteilung funktioneller GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren am apikalen Dendriten neocorticaler Lamina V Pyramidenneurone zu untersuchen. Im folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse dieser Studie und eine mögliche physiologische Bedeutung der differentiellen Verteilung der GABA-Rezeptorsubtypen diskutiert.

4.3.1 Somatische und dendritische Kolokalisation von GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren

In der vorliegenden Arbeit wurde GABA am Soma und am apikalen Dendriten bis zu einer

Entfernung von 340 μm vom Mittelpunkt des Zellkörpers photolytisch appliziert. Bis zu dieser Entfernung war bei allen untersuchten Neuronen eine Visualisierung des apikalen Dendriten möglich. An allen Stimulationsorten konnten sowohl PicROTOXIN-sensitive GABA_A-Antworten mit einer schnellen Kinetik als auch CGP35348-sensitive GABA_B-Antworten mit einer deutlich langsameren Kinetik ausgelöst werden (siehe Abbildung 3.12). Es sei noch einmal darauf hingewiesen, daß nach dem derzeitigen Stand der Technik die Methode der Infrarot-gelenkten Photostimulation noch keine selektive Stimulation einzelner synaptischer Kontakte erlaubt (siehe Abschnitt 4.2.1). Da corticale Neurone sowohl synaptisch als auch extrasynaptisch lokalisierte GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren besitzen (Somogyi et al., 1998; Thomson & Destexhe, 1999), muß davon ausgegangen werden, daß die photolytisch ausgelösten GABA-Antworten aus der Aktivierung von synaptischen und extrasynaptischen Rezeptoren resultierten. Dies wirft die Frage auf, ob die an allen somatischen und dendritischen Stimulationsorten beobachtete Kollokalisierung von GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren mit einer Kollokalisierung und Koaktivierung dieser GABA-Rezeptorsubtypen an der PSD von GABAergen Synapsen korreliert.

Nach dem heutigen Stand der Forschung kann diese Frage nicht eindeutig beantwortet werden. Dies liegt vor allem daran, daß mit molekularbiologischen Methoden bis heute keine derartige synaptische Kollokalisierung nachgewiesen wurde. Einen indirekten Hinweis, jeweils gegen und für eine Kollokalisierung von GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren an der PSD, liefert die "Spillover"- beziehungsweise die "G-Protein"-Hypothese. Diese Hypothesen erklären die Beobachtung, daß für die Induktion von GABA_B-IPSPs eine starke interneuronale Aktivierung nötig ist. Sie beruhen auf folgenden elektrophysiologischen Befunden: **(1)** Zur Auslösung von GABA_B-IPSPs ist eine stärkere extrazelluläre, elektrische Stimulation und eine damit einhergehende Aktivierung der GABAergen Afferenzen nötig, als für die Induktion von GABA_A-IPSPs (Dutar & Nicoll, 1988). **(2)** Spontane GABA_B-IPSPs treten erst nach Applikation von 4-Aminopyridin auf, das wahrscheinlich eine verstärkte Entladung von Interneuronen induziert (Otis & Mody, 1992; Jarolimek & Misgeld, 1993).

Die "Spillover"-Hypothese (Dutar & Nicoll, 1988) postuliert eine extrasynaptische Lokalisation der GABA_B-Rezeptoren. Sie erklärt die eben beschriebenen Phänomene dadurch, daß eine starke synaptische Aktivität die Diffusion des Neurotransmitters aus dem synaptischen Spalt erhöht und daß die daraus resultierende extrasynaptische Konzentration von GABA einen Wert erreichen kann, der die Aktivierung von extrasynaptisch lokalisierten GABA_B-Rezeptoren ermöglicht. Durch einen "Spillover" des Neurotransmitters erhalten extrasynaptische Rezeptoren eine physiologische Relevanz für die synaptische Transmission.

Im Gegensatz dazu geht die "G-Protein"-Hypothese (Destexhe & Sejnowski, 1995) von einer synaptischen Lokalisation der GABA_B-Rezeptoren aus und postuliert, daß die nicht linearen Aktivierungseigenschaften der GABA_B-IPSPs auf intrazellulären Mechanismen beruhen, welche für die Aktivierung der die GABA_B-IPSPs vermittelnden K⁺-Kanäle verantwortlich sind. Einen starken Hinweis auf eine Kollokalisierung von GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren an der PSD liefert weiterhin eine vor kurzem erschienene Arbeit von Thomson & Destexhe (1999). In dieser Studie konnte durch Doppelableitungen an Pyramiden- und Interneuronen gezeigt werden, daß sowohl im Hippocampus als auch im Neocortex ein einzelnes Interneuron gemischte GABA_A-/GABA_B-IPSPs generieren kann. Die dafür nötige neuronale Aktivität wurde experimentell gemessen und weist zusammen mit den Ergebnissen numerischer Simulationen darauf hin, daß eine mäßig starke Entladung eines Interneurons (≥ 3 APs, bei einer Frequenz von $\geq 50 - 100$ Hz) den GABA_B-Rezeptor-Mechanismus sättigen kann und daß hierfür ein "Spillover" nicht zwingend notwendig ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sowohl in der vorliegenden als auch in der von Thomson & Destexhe (1999) durchgeführten Studie wesentlich direktere methodische Ansätze verwendet wurden als in den der "Spillover"- und "G-Protein"-Hypothese zugrunde liegenden Arbeiten. Dies weist stark auf die Existenz von somatischen und dendritischen Interneuron-Pyramidenneuron-Synapsen hin, an deren PSD sowohl GABA_A- als auch GABA_B-Rezeptoren lokalisiert sind und folglich koaktiviert werden. Durch einen "Spillover" des Neurotransmitters ist eine Koaktivierung der GABA-Rezeptorsubtypen jedoch auch an Synapsen vorstellbar, an deren PSD entweder nur GABA_A- oder nur GABA_B-Rezeptoren lokalisiert sind. Hinweise auf die Existenz solcher Synapsen im Neocortex liefern die Arbeiten von Benardo (1994) und Thomson & Destexhe (1999). Eine Koaktivierung der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren an einer einzelnen Synapse (und eventuell an der unmittelbar daran angrenzenden extrasynaptischen Membran) ist die Grundlage für die im folgenden Abschnitt postulierte physiologische Bedeutung der differentiellen Verteilung der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren am apikalen Dendriten.

4.3.2 Relatives Verhältnis der GABA_A- zu den GABA_B-Rezeptoren

4.3.2.1 GABA-Sensitivität des apikalen Dendriten

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß das relative Verhältnis der GABA_A- zu den GABA_B-Rezeptoren am apikalen Dendriten von Lamina V Pyramidenneuronen

größer ist als am Soma. Die Grundlage hierfür lieferten die Ergebnisse von Experimenten, bei denen die GABA-Sensitivität des apikalen Dendriten untersucht wurde. Hierzu wurde GABA am Dendriten in Abständen von 20 μm bis zu einer Entfernung von 340 μm vom Mittelpunkt des Somas appliziert. Der Abstand von 20 μm zwischen den einzelnen Stimulationsorten wurde aus folgenden Gründen gewählt: **(1)** In Vorexperimenten, bei denen die Applikation von GABA in Abständen von 10 μm erfolgte, konnten weder "hot spots" noch "cold spots" der GABA-Sensitivität beobachtet werden. Bei der Kartierung mit einem Abstand von 20 μm zwischen den Stimulationsorten ging somit keine derartige Information verloren. **(2)** Die für (CNB)-caged Glutamat experimentell bestimmte HWFM betrug im Mittel 4 μm (siehe Abschnitt 3.2.4.1). Da ein ähnlicher Wert für (CNB)-caged GABA zu erwarten ist, kann der Durchmesser des Ortes, an dem caged GABA photolytisch gespalten wurde mit ungefähr 10 μm angegeben werden. Eine Überschneidung benachbarter Applikationsorte kann daher bei einem Abstand von 20 μm ausgeschlossen werden.

Bei somatischer Applikation wird im Vergleich zum Dendriten eine größere Membranfläche stimuliert. Effekte, die aus diesem Unterschied resultieren könnten, wurden dadurch ausgeschlossen, daß die erste Stimulation in einem Abstand von 40 μm vom Mittelpunkt des Zellkörpers erfolgte. Ungefähr in dieser Entfernung endet die Verjüngung des Somas zum apikalen Dendriten. Die pharmakologisch isolierten reinen GABA_A- oder GABA_B-Antworten (siehe Abschnitt 3.3.1.1) wurden am Soma in unmittelbarer Nähe des ersten Stimulationsortes abgeleitet. Die Konzentrationen der Antagonisten, die zur vollständigen Blockierung der GABA_A- oder GABA_B-Rezeptoren eingesetzt werden mußten, entsprechen den Angaben anderer Studien (Benardo, 1994; Rammes et al., 1998).

Bei der Kartierung der GABA-Sensitivität zeigten sowohl die Amplituden der GABA_A- als auch die der GABA_B-Antworten einen statistisch identischen, linearen Abfall in Richtung des distalen Dendriten (siehe Abbildung 3.16). Nimmt man einen direkt proportionalen Zusammenhang zwischen der Größe der Antwort-Amplitude und der Anzahl der aktivierten Rezeptoren an, dann deuten die Ergebnisse der Kartierungsexperimente ohne eine weitere Analyse darauf hin, daß es keinen Unterschied zwischen der differentiellen Verteilung der GABA_A- und der GABA_B-Rezeptoren gibt. Ein für alle Stimulationsorte geltender direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Größe der Antwort-Amplitude und der Anzahl der aktivierten Rezeptoren kann aus folgenden Gründen angenommen werden: **(1)** Die Applikation von TTX verhinderte eine Beeinflussung der Antwort-Amplituden durch präsynaptische Aktivität. **(2)** Bei der Auslenkung des Membranpotentials durch Injektion von negativem Strom konnte der für den I_h-Strom typische "Sag" bei nur wenigen Neuronen, und auch erst ab einem

Membranpotential von ungefähr -70 mV beobachtet werden (siehe Abschnitt 4.2). Da das RMP im Mittel -61 mV und die Amplituden der GABA-Hyperpolarisationen $3 - 6$ mV betragen, ist eine durch den I_h -Strom bedingte Reduktion der Antwort-Amplituden äußerst unwahrscheinlich. **(3)** Die untersuchten Neurone waren isopotential (siehe Abschnitt 4.2). Regionale Unterschiede des elektrischen Gradienten für die Cl^- - und die K^+ -Ionen können daher ausgeschlossen werden. **(4)** Alle Kartierungsexperimente wurden frühestens 30 min nach dem "break in" begonnen. Nach dieser Zeit war die Cl^- -Konzentration im apikalen Dendriten ($300 \mu\text{m}$ vom Soma entfernt) mit der Cl^- -Konzentration der Pipettenlösung im Gleichgewicht (siehe Abschnitt 3.3.1.2). An allen Stimulationsorten lag deshalb der gleiche chemische Gradient für die Cl^- -Ionen vor. Die vollständige Equilibrierung der Cl^- -Ionen wurde weiterhin dadurch bestätigt, daß die sowohl am Soma als auch am Dendriten abgeleiteten und in unmittelbarer Nähe der Pipette ausgelösten GABA_A -Antworten das gleiche Umkehrpotential besaßen (siehe Abschnitt 3.3.1.3). Der hierfür gemessene Wert von im Mittel -70 mV entspricht den Angaben anderer Studien. Dies gilt ebenso für das Umkehrpotential der GABA_B -Antworten (im Mittel -92 mV, als Übersicht siehe Benardo & Wong 1995). **(5)** GABA_A -Rezeptoren, die sich in ihrem Aufbau aus Untereinheiten unterscheiden, verhalten sich oft verschieden bezüglich ihrer Leitfähigkeit und Kinetik. Sehr wahrscheinlich korreliert auch die Kinetik von GABA_B -Antworten mit der molekularen Struktur der sie vermittelnden Rezeptoren. Weder für die GABA_A -, noch für die GABA_B -Antworten konnten statistisch signifikante Unterschiede für die Anstiegszeit ($0 - 100 \%$) zwischen dendritisch und somatisch ausgelösten GABA-Antworten festgestellt werden. GABA wurde in unmittelbarer Nähe einer am Soma oder am apikalen Dendriten platzierten Elektrode freigesetzt (siehe Abschnitt 3.3.1.4). Aus diesem Grund kann eine elektrotonische Beeinflussung der Antworten ausgeschlossen werden. Diese Befunde deuten darauf hin, daß beim Aufbau aus Untereinheiten und bei der damit korrelierten Leitfähigkeit weder für die GABA_A -, noch für die GABA_B -Rezeptoren Unterschiede zwischen somatisch und dendritisch lokalisierten Rezeptoren bestehen.

An den Dendriten generierte synaptische und regenerative Potentiale werden in Richtung des Somas und des Axons weitergeleitet. Auf Grund der passiven elektrotonischen Eigenschaften der Dendriten wird hierbei die Amplitude der Potentialänderungen vermindert und die Kinetik verlangsamt (Kabel-Theorie). Die Stärke dieses elektrotonischen Effektes hängt unter anderem proportional von der Laufstrecke und umgekehrt proportional von der Dauer des elektrischen Signals ab. Schnelle Potentialänderungen werden demnach stärker durch die "Elektrotonik" beeinflusst als langsame Signale (Rall, 1977; Rall & Segev, 1985; Spruston et al., 1993, 1994; Stuart & Spruston, 1998). Bei gleicher Laufstrecke müßten deshalb die GABA_A -Antworten mit schnellerer Kinetik stärker in der Amplitude abgeschwächt werden, als die GABA_B -

Antworten mit langsamerer Kinetik. Unter Berücksichtigung der Kabel-Theorie deutet deshalb der statistisch identische Abfall der Amplituden der GABA_A- und GABA_B-Antworten darauf hin, daß das relative Verhältnis der GABA_A- zu den GABA_B-Rezeptoren am Dendriten größer ist als am Soma. Es sei noch einmal darauf verwiesen, daß der Begriff "relatives Verhältnis" auf der Normalisierung der Daten auf den Wert der Amplitude am ersten Stimulationsort (40 µm vom Zentrum des Somas entfernt) beruht. Der Wert für das relative Verhältnis der GABA_A- zu den GABA_B-Rezeptoren am ersten Stimulationsort ist demnach 1 und drückt nicht den realen Wert der Anzahl der aktivierten GABA_A- zu GABA_B-Rezeptoren aus.

Wie schon oben erwähnt, erfahren die Kinetiken von schnellen Potentialänderungen eine stärkere elektrotonische Verlangsamung als die Kinetiken von langsamen Signalen. Da die Anstiegszeit von der Amplitude unabhängig ist, kann der elektrotonische Einfluß auf diesen Kinetikparameter nicht durch eine erhöhte Anzahl der Rezeptoren kompensiert werden. Eine Analyse der Anstiegszeit (20 - 80 %) der GABA-Antworten zeigte, daß die schnellen GABA_A-Hyperpolarisationen in der Tat stärker verlängert werden, als die langsameren GABA_B-Antworten (siehe Abschnitt 3.3.2.2). Dieser Befund bestätigt, daß die GABA_A- und GABA_B-Antworten unterschiedlich stark elektrotonisch beeinflusst werden und auf Grund des statistisch identischen Abfalls der Amplituden der GABA_A- und GABA_B-Antworten das relative Verhältnis der GABA_A- zu den GABA_B-Rezeptoren am Dendriten größer als am Soma ist.

4.3.2.2 Numerische Simulationen der elektrotonischen Amplitudenabschwächung

Zur Berechnung des relativen Verhältnisses der GABA_A- zu den GABA_B-Rezeptoren wurde die elektrotonische Amplitudenabschwächung der GABA-Antworten durch numerische Simulationen quantifiziert. In dem hierfür verwendeten äquivalenten Zylinder Modell von Rall & Segev (1985) wird der Dendrit als einzelner Zylinder betrachtet, der durch seine elektrotonische Länge (L) charakterisiert ist. Neben dem äquivalenten Zylinder Modell existieren für die Beschreibung der elektrotonischen Struktur eines Neurons zahlreiche andere Modelle. Als Beispiele seien das Kompartiment- und das multiple äquivalente Zylinder Modell, Dendrogramme sowie morphotonische und morphoelektrotonische Transformationen genannt (Spruston et al., 1994). Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten numerischen Simulationen wurde aus folgenden Gründen das relativ "einfache" äquivalente Zylinder Modell verwendet: **(1)** Die Region des apikalen Dendriten, die hinsichtlich der differentiellen Verteilung der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren untersucht wurde, weist nur wenige Verzweigungen auf und wird dadurch am besten durch einen einzelnen Zylinder repräsentiert. **(2)** Komplexere Modelle, wie das

Kompartiment-Modell, enthalten wesentlich mehr Variablen. Auch bei einer genauen morphologischen Rekonstruktion der untersuchten Neurone steigt dadurch die Wahrscheinlichkeit für Fehler bei den Berechnungen. Die Eignung des äquivalenten Zylinder Modells für die in der vorliegenden Dissertation bearbeitete Fragestellung sowie die korrekte Durchführung der numerischen Simulationen wird durch die hohe Übereinstimmung der theoretisch erhaltenen Graphen mit den Ergebnissen der dendritischen Ableitungen bestätigt (siehe Abbildung 3.20).

Mit der Entwicklung der Hirnschnittechnik sind vor allem hippocampale Pyramidenneurone hinsichtlich ihrer passiven elektrotonischen Eigenschaften untersucht worden. Es zeigte sich, daß diese Nervenzellen "elektrisch kompakt" sind, das heißt eine elektrotonische Länge deutlich unter 1 besitzen (Spruston et al., 1994; Johnston et al., 1996). Generell scheinen neocorticale Pyramidenneurone ähnliche dendritische Eigenschaften wie hippocampale Pyramidenneurone zu besitzen (Johnston et al., 1996). Aus diesem Grund wird für die elektrotonische Länge von Lamina V Pyramidenneuronen ein vergleichbarer Wert angenommen. Dies steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu dem in der vorliegenden Arbeit für L bestimmten Wert von 1 (siehe Abschnitt 3.3.3.2). Eine plausible Erklärung für diesen "zu hohen" Wert ergibt sich aus der Tatsache, daß die zur Bestimmung von τ_m durchgeführten Strominjektionen in Gegenwart von Tetrodotoxin erfolgten (siehe Abschnitt 3.3.3.2). Dieser Na^+ -Kanalblocker bewirkt eine Reduktion des Eingangswiderstandes (R_N) der Nervenzelle (eigene Beobachtung; Frick, persönliche Mitteilung; Müller & Somjen, 2000). Da sich R_m proportional zu R_N verhält, bewirkt TTX nach den im Abschnitt 3.3.3.1 dargestellten Gleichungen (1) und (2) indirekt eine Vergrößerung der elektrotonischen Länge.

Die Ergebnisse der numerischen Simulationen zeigen, daß die Amplitude einer GABA_A -Antwort bei einer Laufstrecke von 340 μm um 38 % und die einer GABA_B -Hyperpolarisation um 19 % abgeschwächt wird. Die Kenntnis der Stärke der elektrotonischen Amplitudenabschwächung ermöglichte die Berechnung des relativen Verhältnisses der GABA_A - zu den GABA_B -Rezeptoren (siehe Abschnitt 3.3.5). Dieses Verhältnis betrug am Soma-nächsten Stimulationsort (40 μm vom Zentrum des Zellkörpers entfernt) 1 und am apikalen Dendriten (bei einer Distanz von 340 μm) 1,25. Es sei darauf hingewiesen, daß die vorliegenden Ergebnisse keine Aussage über die tatsächliche Dichte der GABA_A - und GABA_B -Rezeptoren an den einzelnen Stimulationsorten erlauben. Hierfür wäre unter anderem die genaue Kenntnis der stimulierten Membranfläche erforderlich. Obwohl mit der Infrarot-Videomikroskopie der Durchmesser des Dendriten bestimmt werden kann, ist eine exakte Berechnung der stimulierten Membranfläche nicht möglich. Dies liegt daran, daß Dornfortsätze, die teilweise eine extreme Oberflächenvergrößerung der dendritischen Membran bewirken,

mit der Infrarot-Videomikroskopie noch nicht visualisiert werden können (siehe Abschnitt 4.4.1). Aus diesem Grund kann auch die Ursache für den experimentell bestimmten stärkeren Abfall der Antwort-Amplituden ($> 60\%$, maximal 38% bei den numerischen Simulationen) nicht eindeutig beantwortet werden. Zwei mögliche Ursachen sind vorstellbar: **(1)** Die Dichte der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren nimmt mit der Entfernung vom Soma ab und/oder **(2)** die stimulierte Membranfläche wird nach distal kleiner. In beiden Fällen hätte das photolytisch applizierte GABA an weiter distal gelegenen dendritischen Regionen weniger Rezeptoren aktiviert als an Soma-nahen Stimulationsorten.

4.3.2.3 Dendritische Ganzzelleableitungen

Die bei den somatischen Ableitungen beobachtete statistisch identische Abnahme der GABA_A- und GABA_B-Antwort-Amplituden weist in Kombination mit der unterschiedlichen elektrotonischen Beeinflussung der Anstiegszeit und den numerischen Simulationen deutlich darauf hin, daß das relative Verhältnis der GABA_A- zu den GABA_B-Rezeptoren am Dendriten größer ist als am Soma. Diese Verteilung konnte durch die Kombination eines "inversen" Experimentes mit theoretischen Voraussagen bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.3.4). Hierbei wurden die Pyramidenneurone in einer Entfernung von $200\ \mu\text{m}$ vom Mittelpunkt des Somas am apikalen Dendriten abgeleitet und GABA schrittweise in Richtung des Somas appliziert. Die sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse dieser Kartierung mit den theoretischen Graphen (siehe Abbildung 3.20) bestätigt, daß die numerischen Simulationen korrekt durchgeführt wurden und das relative Verhältnis der GABA_A- zu den GABA_B-Rezeptoren am Dendriten größer als am Soma ist. Es sei darauf hingewiesen, daß zur Berechnung der theoretischen Graphen die Gleichungen der simulierten elektrotonischen Attenuierung zweimal angewendet wurden (siehe Abschnitt 3.3.4 Punkt (1) und (3)). Ein Fehler bei den numerischen Simulationen hätte sich demnach multiplizieren müssen.

4.3.2.4 Physiologische Bedeutung der differentiellen Verteilung der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren

Die Vorstellung vom Dendriten als rein passives "Kabel" wurde in den letzten Jahren durch zahlreiche Studien revidiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß in der dendritischen Membran spannungsabhängige Ionenkanäle lokalisiert sind, die unter anderem die Weiterleitung von elektrischen Signalen aktiv modulieren. Zur Funktion dieser spannungsaktivierten Kanäle bei der synaptischen Integration gibt es zahlreiche

Hypothesen (als Übersicht siehe Mel, 1994). Berücksichtigt man nur die passiven Kabeleigenschaften eines Dendriten, so hängt der Effekt, den eine Synapse auf das Soma ausübt, von ihrer Position am Dendriten ab. Man spricht auch von ortsabhängiger Variabilität des synaptischen Einganges. De Schutter & Bower (1994) konnten zeigen, daß an den Dendriten von Purkinjezellen lokalisierte Ca^{2+} -Kanäle vom P-Typ die elektrotonische Amplitudenabschwächung von exzitatorischen Eingängen ausgleichen. Diese Leitfähigkeiten wirken somit den passiven Kabeleigenschaften entgegen. Als Folge davon sind alle Synapsen elektrotonisch gleich weit vom Soma entfernt. Weitere Beispiele für eine Kompensation der passiven Kabeleigenschaften durch spannungsaktivierte Ionenkanäle liefern die Arbeiten von Stuart & Sakmann (1994), Cash & Yuste (1998) und Stuart & Spruston (1998) (siehe Abschnitt 1.4.2).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kartierung der GABA-Sensitivität des apikalen Dendriten durchgeführt. Dabei zeigten sowohl die Amplituden der GABA_A - als auch die der GABA_B -Antworten einen statistisch identischen Abfall in Richtung des distalen Dendriten (siehe Abbildung 3.16). Dies bedeutet, daß das Soma von jedem dendritischen Stimulationsort die GABA_A - und GABA_B -Antworten im selben Amplitudenverhältnis empfängt, obwohl GABA_A -Antworten mit einer schnellen Kinetik stärker elektrotonisch in der Amplitude abgeschwächt werden, als GABA_B -Antworten mit einer langsameren Kinetik. Das in Richtung des distalen Dendriten kontinuierlich zunehmende relative Verhältnis der GABA_A - zu den GABA_B -Rezeptoren scheint demnach Unterschiede in der elektrotonischen Amplitudenabschwächung zwischen GABA_A - und GABA_B -Antworten zu kompensieren. Physiologisch wäre ein derartiger Kompensationsmechanismus vor allem für solche Synapsen relevant, an denen GABA_A - und GABA_B -Rezeptoren koaktiviert werden. Für eine derartige Koaktivierung existieren zahlreiche Hinweise (siehe Abschnitt 4.4.1). Interessanterweise fanden Dodt et al. (1998) an neocorticalen Lamina V Pyramidenneuronen eine ähnliche Verteilung von "schnellen" und "langsamen" Glutamatrezeptor-Subtypen. In der zitierten Arbeit konnte gezeigt werden, daß am apikalen Dendriten relativ mehr AMPA-Rezeptoren mit einer schnellen Kinetik als NMDA-Rezeptoren mit einer langsameren Kinetik lokalisiert sind. Neben der Lokalisation von spannungsabhängigen Leitfähigkeiten am Dendriten scheint deshalb die differentielle Verteilung von ligandenabhängigen Ionenkanälen ein weiterer grundlegender Mechanismus bei Neuronen zu sein, um den passiven Kabeleigenschaften entgegenzuwirken.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- (1) Kann durch Applikation von Glutamat am apikalen Dendriten von neocorticalen Pyramidenneuronen ein LTP- und/oder LTD-ähnlicher Effekt induziert werden?
- (2) Wie groß ist gegebenenfalls die räumliche Spezifität dieses Effektes?
- (3) Ist synaptisch induzierte LTD im Neocortex mit einer Reduktion der postsynaptischen Glutamatsensitivität assoziiert?
- (4) Wie sind GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren relativ zueinander auf der Membran des apikalen Dendriten von Pyramidenneuronen verteilt?

Die Experimente zur Klärung dieser Fragen wurden an Lamina V Pyramidenneuronen in Hirnschnitten des somatosensorischen Neocortex der Ratte durchgeführt. Für die gezielte Stimulation mit Neurotransmittern wurden die Neurone mit der Infrarotvideomikroskopie visualisiert und ihre elektrische Aktivität am Soma oder apikalen Dendriten mit "Patch"-Pipetten in der Ganzzellkonfiguration abgeleitet. Die Applikation des Neurotransmitters (Glutamat, GABA) erfolgte durch die photolytische Freisetzung desselben aus einer durch Veresterung inaktivierten Verbindung ("caged" Verbindung). Durch die sehr große räumliche und zeitliche Auflösung dieser Technik, der sogenannten "Infrarot-gelenkten Photostimulation", kann synaptische Transmission imitiert und die Verteilung funktioneller Neurotransmitterrezeptoren auf einzelnen Neuronen studiert werden.

Räumliche Spezifität neocorticaler LTD

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, daß durch Applikation von Glutamat am apikalen Dendriten von Lamina V Pyramidenneuronen eine Reduktion der Glutamatantwort-Amplitude ausgelöst werden kann. Als verlässliches Protokoll zur Induktion dieser "Photostimulations-LTD" erwies sich eine Stimulation von 1 min mit einer Frequenz von 5 Hz. Trotz verschiedener experimenteller Modifikationen, die einen stärkeren Ca²⁺-Einstrom in die Nervenzelle bewirkten, konnte bei keinem der untersuchten Neurone eine Erhöhung der dendritischen Glutamatsensitivität ("Photostimulations-LTP") induziert werden. Die im folgenden aufgeführten Befunde weisen eindeutig darauf hin, daß es sich bei der Photostimulations-LTD um eine Form von

Langzeitplastizität handelt, die die selben Eigenschaften und Induktions- und Expressionsmechanismen wie synaptische LTD im Neocortex besitzt: **(1)** Eine synaptische Stimulation von 1 min mit einer Frequenz von 5 Hz induzierte reproduzierbar eine synaptische LTD. **(2)** In Analogie zur synaptischen LTD trat die Photostimulations-LTD unmittelbar nach der Durchführung des Induktions-Protokolls auf und hielt für die gesamte Dauer der Ableitung (1 h) an. **(3)** Die synaptische LTD war mit einer Abnahme der dendritischen Glutamatsensitivität assoziiert. **(4)** Sowohl die Photostimulations-LTD als auch die synaptische LTD und die mit ihr assoziierte Reduktion der dendritischen Glutamatsensitivität zeigten eine NMDA-Rezeptor-Abhängigkeit. Für die Photostimulations-LTD wurde zusätzlich eine Ca^{2+} -Abhängigkeit nachgewiesen. **(5)** Die Amplitude der Glutamatantworten beziehungsweise der EPSPs wurde sowohl bei der Photostimulations-LTD als auch bei der synaptischen LTD und der mit ihr assoziierten Abnahme der dendritischen Glutamatsensitivität um ungefähr 30 % reduziert. **(6)** Weder die Photostimulations-LTD noch die synaptische LTD und die mit ihr assoziierte Reduktion der dendritischen Glutamatsensitivität wurde von einer Veränderung der Anstiegszeit sowie der Abfallszeitkonstante der Glutamatantwort begleitet. **(7)** Die synaptische LTD und die mit ihr assoziierte Abnahme der dendritischen Glutamatsensitivität schloß eine Photostimulations-LTD aus.

Mit Ausnahme der Versuche mit synaptischer Stimulation wurden alle Experimente in Anwesenheit von TTX durchgeführt. Dies zeigt klar, daß die Photostimulations-LTD ein rein postsynaptischer Effekt ist. Dieser Befund deutet in Kombination mit den im vorhergehenden Absatz aufgeführten Punkten (5) und (7) stark darauf hin, daß auch die Expression synaptischer LTD im Neocortex rein postsynaptisch erfolgt.

LTP und LTD sind die prominentesten zellulären Modellvorstellungen von Lernvorgängen im ZNS der Vertebraten. Die Speicherdichte für Information hängt sowohl von der Anzahl der synaptischen Kontakte als auch von der räumlichen Spezifität synaptischer Langzeitplastizität ab. Die hohe räumliche Auflösung der Infrarot-gelenkten Photostimulation ermöglichte es die räumliche Spezifität der Photostimulations-LTD zu untersuchen. Sie betrug mindestens 10 μm . Dies weist darauf hin, daß eine Feinabstimmung der Transmissionsstärke in Abhängigkeit von der synaptischen Aktivität auf der Ebene einzelner Synapsen stattfindet. Ein solch hochspezifischer Mechanismus würde sich für eine "high-density" Speicherung von Information gut eignen.

Differentielle Verteilung der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren

Im zweiten Teil der vorliegenden Dissertation wurde die differentielle Verteilung von GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren entlang des apikalen Dendriten von Lamina V

Pyramidenneuronen untersucht. Hierzu wurde GABA an verschiedenen Stellen des apikalen Dendriten und am Soma appliziert. Bei dieser Kartierung der GABA-Sensitivität konnten an allen neuronalen Strukturen sowohl "schnelle" GABA_A-, als auch "langsame" GABA_B-Rezeptor-vermittelte Antworten ausgelöst werden. Dieser Befund weist stark auf die Existenz von somatischen und dendritischen Interneuron-Pyramidenneuron-Synapsen hin, an deren PSD sowohl GABA_A- als auch GABA_B-Rezeptoren lokalisiert sind und folglich koaktiviert werden.

Bei der Kartierung der GABA-Sensitivität, bei der die Neurone am Soma abgeleitet wurden, zeigten sowohl die Amplituden der GABA_A- als auch die der GABA_B-Antworten einen statistisch identischen, linearen Abfall in Richtung des distalen Dendriten. Da ein für alle Stimulationsorte geltender direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Größe der Antwort-Amplitude und der Anzahl der aktivierten Rezeptoren angenommen werden kann, deutet dieser Befund unter Berücksichtigung der "Kabel-Theorie" darauf hin, daß das relative Verhältnis der GABA_A- zu den GABA_B-Rezeptoren am Dendriten größer als am Soma ist. Die Kabel-Theorie besagt, daß die schnellen GABA_A-Antworten elektrotonisch stärker in der Amplitude abgeschwächt wurden, als die langsamen GABA_B-Antworten. Diese unterschiedlich starke elektrotonische Beeinflussung der GABA_A- und GABA_B-Antworten konnte durch eine Kinetikanalyse bestätigt und durch numerische Simulationen quantifiziert werden. Durch eine Art "inverses" Experiment wurde die Anwendbarkeit der numerischen Simulationen überprüft. Hierzu wurden die Neurone am apikalen Dendriten abgeleitet und GABA schrittweise in Richtung des Somas appliziert. Die Ergebnisse dieser Kartierung wurden mit theoretischen Voraussagen verglichen, die auf den Ergebnissen der somatischen Ableitungen und den numerischen Simulationen der elektrotonischen Amplitudenabschwächung basierten. Es zeigte sich eine hohe Übereinstimmung. Dies bestätigt, daß die numerischen Simulationen korrekt durchgeführt wurden und daß das relative Verhältnis der GABA_A- zu den GABA_B-Rezeptoren am Dendriten größer als am Soma ist.

Der bei den somatischen Ableitungen beobachtete statistisch identische Abfall der Amplituden der GABA_A- und GABA_B-Antworten zeigt, daß das Soma von jedem dendritischen Stimulationsort die GABA_A- und GABA_B-Antworten im selben Amplitudenverhältnis empfängt. Das in Richtung des distalen Dendriten kontinuierlich zunehmende relative Verhältnis der GABA_A- zu den GABA_B-Rezeptoren scheint demnach Unterschiede in der elektrotonischen Amplitudenabschwächung zwischen GABA_A- und GABA_B-Antworten zu kompensieren. Dies weist stark darauf hin, daß die differentielle Verteilung von ligandenabhängigen Ionenkanälen ein grundlegender Mechanismus bei Neuronen ist, um den passiven Kabeleigenschaften entgegenzuwirken.

6 Literaturverzeichnis

- ADAMS, S.R. & TSIEN, R.Y. (1993). Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annual Review of Physiology* 55, 755-784.
- ALGER, B.E., DHANJAL, S.S., DINGLEDINE, R., GARTHWAITE, J., HENDERSON, G., KING, G.L., LIPTON, P., NORTH, A., SCHWARTZKROIN, P.A., SEARS, T.A., SEGAL, M., WHITTINGHAM, T.S. & WILLIAMS, J. (1984). Appendix: Brain Slice Methods. In *Brain Slices*, ed. DINGLEDINE, R., pp. 381-432. Cambridge: Perseus Books.
- ANDREASEN, M. & HABLITZ, J.J. (1994). Paired-pulse facilitation in the dentate gyrus: a patch-clamp study in rat hippocampus in vitro. *Journal of Neurophysiology* 72, 326-336.
- ARTOLA, A. & SINGER, W. (1993). Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation. *Trends in Neurosciences* 16, 480-487.
- BARNARD, E.A. (1995). The molecular biology of GABA_A receptors and their structural determinants. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 48, 1-16.
- BARRIA, A., MULLER, D., DERKACH, V., GRIFFITH, L.C. & SODERLING, T.R. (1997). Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 276, 2042-2045.
- BAUDE, A., NUSSER, Z., MOLNAR, E., MCILHINNEY, R.A. & SOMOGYI, P. (1995). High-resolution immunogold localization of AMPA type glutamate receptor subunits at synaptic and non-synaptic sites in rat hippocampus. *Neuroscience* 69, 1031-1055.
- BEAR, M.F. & MALENKA, R.C. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current Opinion in Neurobiology* 4, 389-399.
- BEAR, M.F. (1995). Mechanism for a sliding synaptic modification threshold. *Neuron* 15, 1-4.
- BEKKERS, J.M. & STEVENS, C.F. (1989). NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus. *Nature* 341, 230-233.
- 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.
- BEN-ARI, Y., KHAZIPOV, R., LEINEKUGEL, X., CAILLARD, O. & GAIARSA, J.L. (1997). GABA_A, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends in Neurosciences* 20, 523-529.
- BENARDO, L.S. (1994). Separate activation of fast and slow inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortex in vitro. *Journal of Physiology* 476, 203-215.
- BENARDO, L.S. & WONG, R.K.S. (1995). Inhibition in the cortical network. In *The Cortical Neuron*, eds. GUTNICK, M.J. & MODY, I., pp. 141-155. New York: Oxford University Press, Inc.
- BENKE, T.A., LUTHI, A., ISAAC, J.T. & COLLINGRIDGE, G.L. (1998). Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* 393, 793-797.
- BENVENISTE, M. & MAYER, M.L. (1993). Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *Journal of Physiology* 464, 131-163.
- BIENENSTOCK, E.L., COOPER, L.N. & MUNRO, P.W. (1982). Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. *Journal of Neuroscience* 2, 32-48.

- BLANTON, M.G., LO, T.J. & KRIEGSTEIN, A.R. (1989). Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Methods* 30, 203-210.
- BLISS, T.V. & LOMO, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology* 232, 331-356.
- BLISS, T.V. & COLLINGRIDGE, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
- BLISS, T.V. & FAZELI, M.S. (1996). The locus of expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus. In *Cortical Plasticity*, eds. FAZELI, M.S. & COLLINGRIDGE, G.L., pp. 61-82. Oxford: BIOS Scientific.
- BOLSHAKOV, V.Y. & SIEGELBAUM, S.A. (1995). Regulation of hippocampal transmitter release during development and long-term potentiation. *Science* 269, 1730-1734.
- BOULTER, J., HOLLMANN, M., O'SHEA-GREENFIELD, A., HARTLEY, M., DENERIS, E., MARON & HEINEMANN, S. (1990). Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science* 249, 1033-1037.
- BOWERY, N.G., HUDSON, A.L. & PRICE, G.W. (1987). GABA_A and GABA_B receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 20, 365-383.
- BRÖCHER, S., ARTOLA, A. & SINGER, W. (1992). Intracellular injection of Ca²⁺ chelators blocks induction of long-term depression in rat visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 123-127.
- BRODMAN, K. (1909). *Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde*. Leipzig: Barth.
- BURGARD, E.C. & HABLITZ, J.J. (1993a). NMDA receptor-mediated components of miniature excitatory synaptic currents in developing rat neocortex. *Journal of Neurophysiology* 70, 1841-1852.
- BURGARD, E.C. & HABLITZ, J.J. (1993b). Developmental changes in NMDA and non-NMDA receptor-mediated synaptic potentials in rat neocortex. *Journal of Neurophysiology* 69, 230-240.
- CALLAWAY, E.M. & KATZ, L.C. (1993). Photostimulation using caged glutamate reveals functional circuitry in living brain slices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7661-7665.
- CARROLL, R.C., LISSIN, D.V., VON ZASTROW, M., NICOLL, R.A. & MALENKA, R.C. (1999). Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nature Neuroscience* 2, 454-460.
- CASH, S. & YUSTE, R. (1998). Input summation by cultured pyramidal neurons is linear and position-independent. *Journal of Neuroscience* 18, 10-15.
- CHEN, L. & HUANG, L.Y. (1992). Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 356, 521-523.
- CHRISTINE, C.W. & CHOI, D.W. (1990). Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *Journal of Neuroscience* 10, 108-116.
- CHU, D.C., ALBIN, R.L., YOUNG, A.B. & PENNEY, J.B. (1990). Distribution and kinetics of GABA_B binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* 34, 341-357.
- CLEMENTS, J.D., LESTER, R.A., TONG, G., JAHR, C.E. & WESTBROOK, G.L. (1992). The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258, 1498-1501.

- COAN, E.J., SAYWOOD, W. & COLLINGRIDGE, G.L. (1987). MK-801 blocks NMDA receptor-mediated synaptic transmission and long term potentiation in rat hippocampal slices. *Neuroscience Letters* 80, 111-114.
- CONNOR, J.A., TSENG, H.Y. & HOCKBERGER, P.E. (1987). Depolarization- and transmitter-induced changes in intracellular Ca^{2+} of rat cerebellar granule cells in explant cultures. *Journal of Neuroscience* 7, 1384-1400.
- CONNORS, B.W., GUTNICK, M.J. & PRINCE, D.A. (1982). Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro. *Journal of Neurophysiology* 48, 1302-1320.
- CONNORS, B.W. & GUTNICK, M.J. (1990). Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends in Neurosciences* 13, 99-104.
- CONNORS, B.W. & AMITAI, Y. (1995). Functions of local circuits in neocortex: synchrony and laminae. In *The Cortical Neuron*, eds. GUTNICK, M.J. & MODY, I., pp. 123-140. New York: Oxford University Press, Inc.
- CORMIER, R.J., MAUK, M.D. & KELLY, P.T. (1993). Glutamate iontophoresis induces long-term potentiation in the absence of evoked presynaptic activity. *Neuron* 10, 907-919.
- CRAIG, A.M., BLACKSTONE, C.D., HUGANIR, R.L. & BANKER, G. (1994). Selective clustering of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors opposite terminals releasing the corresponding neurotransmitters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12373-12377.
- CREUTZFELDT, O. (1983). *Cortex Cerebri*. Berlin: Springer.
- DAVIES, S.N., LESTER, R.A., REYMAN, K.G. & COLLINGRIDGE, G.L. (1989). Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation. *Nature* 338, 500-503.
- DE KONINCK, Y. & MODY, I. (1997). Endogenous GABA activates small-conductance K^+ channels underlying slow IPSCs in rat hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology* 77, 2202-2208.
- DE SCHUTTER, E. & BOWER, J.M. (1994). Simulated responses of cerebellar Purkinje cells are independent of the dendritic location of granule cell synaptic inputs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 4736-4740.
- DEISZ, R.A. & PRINCE, D.A. (1989). Frequency-dependent depression of inhibition in guinea-pig neocortex in vitro by $GABA_B$ receptor feed-back on GABA release. *Journal of Physiology* 412, 513-541.
- DEISZ, R.A., FORTIN, G. & ZIEGLÄNSBERGER, W. (1991). Voltage dependence of excitatory postsynaptic potentials of rat neocortical neurons. *Journal of Neurophysiology* 65, 371-382.
- DEISZ, R.A., BILLARD, J.M. & ZIEGLÄNSBERGER, W. (1997). Presynaptic and postsynaptic $GABA_B$ receptors of neocortical neurons of the rat in vitro: differences in pharmacology and ionic mechanisms. *Synapse* 25, 62-72.
- DESTEXHE, A. & SEJNOWSKI, T.J. (1995). G protein activation kinetics and spillover of gamma-aminobutyric acid may account for differences between inhibitory responses in the hippocampus and thalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9515-9519.
- DINGLEDINE, R., BOLAND, L.M., CHAMBERLIN, N.L., KAWASAKI, K., KLECKNER, N.W., TRAYNELIS, S.F. & VERDOORN, T.A. (1988). Amino acid receptors and uptake systems in the mammalian central nervous system. *Critical Reviews in Neurobiology* 4, 1-96.
- DODT, H.U. & ZIEGLÄNSBERGER, W. (1990). Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-videomicroscopy. *Brain Research* 537, 333-336.

- DODT, H.U. & ZIEGLGÄNSBERGER, W. (1994). Infrared videomicroscopy: a new look at neuronal structure and function. *Trends in Neurosciences* 17, 453-458.
- DODT, H.U. & ZIEGLGÄNSBERGER, W. (1998). Visualization of Neuronal Form and Function in Brain Slices by Infrared Videomicroscopy. In *Modern Optics, Electronics, and High Precision Techniques in Cell Biology*, ed. ISENBERG, G., pp. 55-73. Berlin: Springer.
- DODT, H.U., FRICK, A., KAMPE, K. & ZIEGLGÄNSBERGER, W. (1998). NMDA and AMPA receptors on neocortical neurons are differentially distributed. *European Journal of Neuroscience* 10, 3351-3357.
- DODT, H.U., EDER, M., FRICK, A. & ZIEGLGÄNSBERGER, W. (1999). Precisely localized LTD in the neocortex revealed by infrared-guided laser stimulation. *Science* 286, 110-113.
- DONEVAN, S.D. & ROGAWSKI, M.A. (1993). GYKI 52466, a 2,3-benzodiazepine, is a highly selective, noncompetitive antagonist of AMPA/kainate receptor responses. *Neuron* 10, 51-59.
- DUDEK, S.M. & BEAR, M.F. (1992). Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4363-4367.
- DUTAR, P. & NICOLL, R.A. (1988). A physiological role for GABA_B receptors in the central nervous system. *Nature* 332, 156-158.
- EDWARDS, F.A., KONNERTH, A., SAKMANN, B. & TAKAHASHI, T. (1989). A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 414, 600-612.
- ENGERT, F. & BONHOEFFER, T. (1997). Synapse specificity of long-term potentiation breaks down at short distances. *Nature* 388, 279-284.
- ENNA, S.J. & BOWERY, N.G. (1996). *The GABA Receptors*. Totowa: Humana Press.
- FELDMAN, D.E., NICOLL, R.A., MALENKA, R.C. & ISAAC, J.T. (1998). Long-term depression at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex. *Neuron* 21, 347-357.
- FISZMAN, M.L., NOVOTNY, E.A., LANGE, G.D. & BARKER, J.L. (1990). Embryonic and early postnatal hippocampal cells respond to nanomolar concentrations of muscimol. *Brain Research Developmental Brain Research*. 53, 186-193.
- FITZSIMONDS, R.M., SONG, H.J. & POO, M.M. (1997). Propagation of activity-dependent synaptic depression in simple neural networks. *Nature* 388, 439-448.
- FREY, U. & MORRIS, R.G. (1998). Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends in Neurosciences* 21, 181-188.
- FRICK, A. (1994). Der apikale Dendrit: Elektrophysiologische Untersuchungen zur regionalen Verteilung von spezifischen Glutamaterezeptoren an neocorticalen Pyramidenneuronen der Lamina V. Technische Universität München, Diplomarbeit.
- FRICK, A. (1999). Untersuchungen zur glutamatergen Informationsübertragung an Pyramidenneuronen des Neocortex mit Hilfe infrarotgeleiteter Photostimulation. Technische Universität München, Doktorarbeit.
- FRICK, A., ZIEGLGÄNSBERGER, W. & DODT, H.U.: Glutamate receptors form hot spots on dendrites of neocortical pyramidal neurons. *Zur Publikation eingereicht*.
- FRITSCHY, J.M. & MÖHLER, H. (1995). GABA_A-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *Journal of Comparative Neurology* 359, 154-194.

- GODA, Y. & STEVENS, C.F. (1996). Long-term depression properties in a simple system. *Neuron* 16, 103-111.
- HAMMOND, C. (1996). The Chemical Synapses. In *Cellular and Molecular Neurobiology*, ed. HAMMOND, C., pp. 20-46. San Diego: Academic Press, Inc.
- HANSEL, C., ARTOLA, A. & SINGER, W. (1997). Relation between dendritic Ca^{2+} levels and the polarity of synaptic long-term modifications in rat visual cortex neurons. *European Journal of Neuroscience* 9, 2309-2322.
- HARA, M., INOUE, M., YASUKURA, T., OHNISHI, S., MIKAMI, Y. & INAGAKI, C. (1992). Uneven distribution of intracellular Cl^- in rat hippocampal neurons. *Neuroscience Letters* 143, 135-138.
- HEBB, D.O. (1949). *The Organization of Behaviour*. New York: John Wiley & Sons.
- HESS, G.P., NIU, L. & WIEBOLDT, R. (1995). Determination of the chemical mechanism of neurotransmitter receptor-mediated reactions by rapid chemical kinetic methods. *Annals of the New York Academy of Sciences* 757, 23-39.
- HIRSCH, J.C. & CREPEL, F. (1992). Postsynaptic calcium is necessary for the induction of LTP and LTD of monosynaptic EPSPs in prefrontal neurons: an in vitro study in the rat. *Synapse* 10, 173-175.
- HOFFMAN, D.A., MAGEE, J.C., COLBERT, C.M. & JOHNSTON, D. (1997). K^+ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387, 869-875.
- HOLLMANN, M. & HEINEMANN, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annual Review of Neuroscience* 17, 31-108.
- HOLLMANN, M., MARON, C. & HEINEMANN, S. (1994). N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron* 13, 1331-1343.
- HONORÉ, T., DAVIES, S.N., DREJER, J., FLETCHER, E.J., JACOBSEN, P., LODGE, D. & NIELSEN, F.E. (1988). Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science* 241, 701-703.
- HOWE, J.R., SUTOR, B. & ZIEGLGÄNSBERGER, W. (1987a). Baclofen reduces post-synaptic potentials of rat cortical neurones by an action other than its hyperpolarizing action. *Journal of Physiology* 384, 539-569.
- HOWE, J.R., SUTOR, B. & ZIEGLGÄNSBERGER, W. (1987b). Characteristics of long-duration inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortical neurons in vitro. *Cellular & Molecular Neurobiology* 7, 1-18.
- ICHINOSE, T. & MURAKOSHI, T. (1996). Electrophysiological elucidation of pathways of intrinsic horizontal connections in rat visual cortex. *Neuroscience* 73, 25-37.
- INOUE, M., HARA, M., ZENG, X.T., HIROSE, T., OHNISHI, S., YASUKURA, T., URIU, T., OMORI, K., MINATO, A. & INAGAKI, C. (1991). An ATP-driven Cl^- pump regulates Cl^- concentrations in rat hippocampal neurons. *Neuroscience Letters* 134, 75-78.
- ISAAC, J.T., HJELMSTAD, G.O., NICOLL, R.A. & MALENKA, R.C. (1996). Long-term potentiation at single fiber inputs to hippocampal CA1 pyramidal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8710-8715.
- ISHII, T., MORIYOSHI, K., SUGIHARA, H., SAKURADA, K., KADOTANI, H., YOKOI, M., AKAZAWA, C., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N. & MASU, M. (1993). Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *Journal of Biological Chemistry* 268, 2836-2843.

- JAROLIMEK, W. & MISGELD, U. (1993). 4-Aminopyridine-induced synaptic GABA_B currents in granule cells of the guinea-pig hippocampus. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 425, 491-498.
- JODAR, L. & KANETO, H. (1995). Synaptic plasticity: stairway to memory. *Japanese Journal of Pharmacology* 68, 359-387.
- JOHNSON, J.W. & ASCHER, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325, 529-531.
- JOHNSTON, D., MAGEE, J.C., COLBERT, C.M. & CRISTIE, B.R. (1996). Active properties of neuronal dendrites. *Annual Review of Neuroscience* 19, 165-186.
- JOHNSTON, G.A.R. (1996). Molecular Biology, Pharmacology, and Physiology of GABA_C Receptors. In *The GABA Receptors*, eds. ENNA, S.J. & BOWERY, N.G., pp. 297-323. Totowa: Humana Press.
- JONAS, P. & BURNASHEV, N. (1995). Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron* 15, 987-990.
- JONES, K.A. & BAUGHMAN, R.W. (1991). Both NMDA and non-NMDA subtypes of glutamate receptors are concentrated at synapses on cerebral cortical neurons in culture. *Neuron* 7, 593-603.
- KANDLER, K., KATZ, L.C. & KAUER, J.A. (1998). Focal photolysis of caged glutamate produces long-term depression of hippocampal glutamate receptors. *Nature Neuroscience* 1, 119-123.
- KEINÄNEN, K., WISDEN, W., SOMMER, B., WERNER, P., HERB, A., VERDOORN, T.A., SAKMANN & SEEBURG, P.H. (1990). A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249, 556-560.
- KIRKWOOD, A., DUDEK, S.M., GOLD, J.T., AIZENMAN, C.D. & BEAR, M.F. (1993). Common forms of synaptic plasticity in the hippocampus and neocortex in vitro. *Science* 260, 1518-1521.
- KLECKNER, N.W. & DINGLEDINE, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241, 835-837.
- KLINGAUF, J. & NEHER, E. (1997). Modeling buffered Ca²⁺ diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophysical Journal* 72, 674-690.
- KOMBIAN, S.B. & MALENKA, R.C. (1994). Simultaneous LTP of non-NMDA- and LTD of NMDA-receptor-mediated responses in the nucleus accumbens. *Nature* 368, 242-246.
- KULLMANN, D.M. & NICOLL, R.A. (1992). Long-term potentiation is associated with increases in quantal content and quantal amplitude. *Nature* 357, 240-244.
- LAND, P.W., DE BLAS, A.L. & REDDY, N. (1995). Immunocytochemical localization of GABA_A receptors in rat somatosensory cortex and effects of tactile deprivation. *Somatosensory & Motor Research* 12, 127-141.
- LEE, H.K., KAMEYAMA, K., HUGANIR, R.L. & BEAR, M.F. (1998). NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron* 21, 1151-1162.
- LEES, G.J. (1996). Therapeutic potential of AMPA receptor ligands in neurological disorders. *CNS Drugs* 5, 51-74.
- LEGENDRE, P. & WESTBROOK, G.L. (1990). The inhibition of single N-methyl-D-aspartate-activated channels by zinc ions on cultured rat neurones. *Journal of Physiology* 429, 429-449.

- LESTER, R.A., CLEMENTS, J.D., WESTBROOK, G.L. & JAHR, C.E. (1990). Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature* 346, 565-567.
- LINDEN, D.J. (1994). Long-term synaptic depression in the mammalian brain. *Neuron* 12, 457-472.
- 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.
- LÜDDENS, H., KORPI, E.R. & SEEBURG, P.H. (1995). GABA_A/benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications. *Neuropharmacology* 34, 245-254.
- LUHMANN, H.J. & PRINCE, D.A. (1991). Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *Journal of Neurophysiology* 65, 247-263.
- LYNCH, G.S., GRIBKOFF, V.K. & DEADWYLER, S.A. (1976). Long term potentiation is accompanied by a reduction in dendritic responsiveness to glutamic acid. *Nature* 263, 151-153.
- MACDERMOTT, A.B., MAYER, M.L., WESTBROOK, G.L., SMITH, S.J. & BARKER, J.L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321, 519-522.
- MACVICAR, B.A. (1984). Infrared video microscopy to visualize neurons in the in vitro brain slice preparation. *Journal of Neuroscience Methods* 12, 133-139.
- MAGEE, J., HOFFMAN, D., COLBERT, C. & JOHNSTON, D. (1998). Electrical and calcium signaling in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Annual Review of Physiology* 60, 327-346.
- MALENKA, R.C. & NICOLL, R.A. (1993). NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends in Neurosciences* 16, 521-527.
- MALENKA, R.C. (1995). Synaptic plasticity in hippocampus and neocortex: a comparison. In *The Cortical Neuron*, eds. GUTNICK, M.J. & MODY, I., pp. 98-108. New York: Oxford University Press, Inc.
- MALENKA, R.C. & NICOLL, R.A. (1999). Long-term potentiation-a decade of progress?. *Science* 285, 1870-1874.
- MALGAROLI, A. & TSIEN, R.W. (1992). Glutamate-induced long-term potentiation of the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *Nature* 357, 134-139.
- MALINOW, R. & TSIEN, R.W. (1990). Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature* 346, 177-180.
- MANABE, T., RENNER, P. & NICOLL, R.A. (1992). Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents. *Nature* 355, 50-55.
- MARIN-PADILLA, M. (1967). Number and distribution of the apical dendritic spines of the layer V pyramidal cells in man. *Journal of Comparative Neurology* 131, 475-490.
- MARKRAM, H., LUBKE, J., FROTSCHER, M. & SAKMANN, B. (1997). Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275, 213-215.
- MARSHALL, F.H., JONES, K.A., KAUPMANN, K. & BETTLER, B. (1999). GABA_B receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends in Pharmacological Sciences* 20, 396-399.
- MARTIN, J.H. (1991). The Collective Electrical Behaviour of Cortical Neurons: The Electroencephalogram and the Mechanisms of Epilepsy. In *Principles Of Neural Science*, eds. KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H. & JESSELL, T.M., pp. 777-791. Stamford: Appleton & Lange.

- MAYER, M.L. & WESTBROOK, G.L. (1987). The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Progress in Neurobiology* 28, 197-276.
- MCBAIN, C.J. & MAYER, M.L. (1994). N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiological Reviews* 74, 723-760.
- MCCARREN, M. & ALGER, B.E. (1985). Use-dependent depression of IPSPs in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *Journal of Neurophysiology* 53, 557-571.
- MCCORMICK, D.A. (1999). Membrane Potential and Action Potential. In *Fundamental Neuroscience*, eds. ZIGMOND, M.J., BLOOM, F.E., LANDIS, S.C., ROBERTS, J.L. & SQUIRE, L.R., pp. 129-154. San Diego: Academic Press.
- MCCRAY, J.A. & TRENTHAM, D.R. (1989). Properties and uses of photoreactive caged compounds. *Annual Review of Biophysics & Biophysical Chemistry* 18, 239-270.
- MCGURK, J.F., BENNETT, M.V. & ZUKIN, R.S. (1990). Polyamines potentiate responses of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in xenopus oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 9971-9974.
- MCKERNAN, R.M. & WHITING, P.J. (1996). Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain?. *Trends in Neurosciences* 19, 139-143.
- MEL, B.W. (1994). Information-processing in dendritic trees. *Neural Computation* 6, 1031-1085.
- MONAGHAN, D.T., BRIDGES, R.J. & COTMAN, C.W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* 29, 365-402.
- MONYER, H., BURNASHEV, N., LAURIE, D.J., SAKMANN, B. & SEEBURG, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529-540.
- MORI, H. & MISHINA, M. (1995). Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34, 1219-1237.
- MÖHLER, H., KNOFLACH, F., PAYSAN, J., MOTEJLEK, K., BENKE, D., LUSCHER, B. & FRITSCHY, J.M. (1995a). Heterogeneity of GABA_A-receptors: cell-specific expression, pharmacology, and regulation. *Neurochemical Research* 20, 631-636.
- MÖHLER, H., FRITSCHY, J.M., LÜSCHER, B., RUDOLPH, U., BENSON, J. & BENKE, D. (1995b). The GABA_A-receptors: from subunits to diverse functions. In *Ion Channels*, ed. NARAHASHI, T., pp. 89-113. New York: Plenum.
- MUELLER, A.L., TAUBE, J.S. & SCHWARTZKROIN, P.A. (1984). Development of hyperpolarizing inhibitory postsynaptic potentials and hyperpolarizing response to gamma-aminobutyric acid in rabbit hippocampus studied in vitro. *Journal of Neuroscience* 4, 860-867.
- MÜLLER, M. & SOMJEN, G.G. (2000). Na⁺ and K⁺ concentrations, extra- and intracellular voltages, and the effect of TTX in hypoxic rat hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology* 83, 735-745.
- MULKEY, R.M. & MALENKA, R.C. (1992). Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9, 967-975.
- NAKANISHI, N., SHNEIDER, N.A. & AXEL, R. (1990). A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties. *Neuron* 5, 569-581.
- NAKANISHI, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258, 597-603.

- NAYAK, A., ZASTROW, D.J., LICKTEIG, R., ZAHNISER, N.R. & BROWNING, M.D. (1998). Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis. *Nature* 394, 680-683.
- NEHER, E., SAKMANN, B. & STEINBACH, J.H. (1978). The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 375, 219-228.
- NUSSER, Z., SIEGHART, W. & SOMOGYI, P. (1998). Segregation of different GABA_A receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience* 18, 1693-1703.
- O'NEILL, S.C., MILL, J.G. & EISNER, D.A. (1990). Local activation of contraction in isolated rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology* 258, C1165-C1168
- OBRIETAN, K. & VAN DEN POL, A.N. (1995). GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca²⁺ elevating to depressing. *Journal of Neuroscience* 15, 5065-5077.
- OLIET, S.H., MALENKA, R.C. & NICOLL, R.A. (1996). Bidirectional control of quantal size by synaptic activity in the hippocampus. *Science* 271, 1294-1297.
- OLIET, S.H., MALENKA, R.C. & NICOLL, R.A. (1997). Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 18, 969-982.
- OLSEN, R.W. & TOBIN, A.J. (1990). Molecular biology of GABA_A receptors. *FASEB Journal* 4, 1469-1480.
- OTIS, T.S. & MODY, I. (1992). Differential activation of GABA_A and GABA_B receptors by spontaneously released transmitter. *Journal of Neurophysiology* 67, 227-235.
- 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.
- OZAWA, S., KAMIYA, H. & TSUZUKI, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* 54, 581-618.
- PAPE, H.C. (1996). Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annual Review of Physiology* 58, 299-327.
- PARSONS, C.G., GRUNER, R. & ROZENTAL, J. (1994). Comparative patch clamp studies on the kinetics and selectivity of glutamate receptor antagonism by 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline (NBQX) and 1-(4-amino-phenyl)-4-methyl-7,8-methylendioxy-5H-2,3-benzodiazepine (GYKI 52466). *Neuropharmacology* 33, 589-604.
- PARTIN, K.M., FLECK, M.W. & MAYER, M.L. (1996). AMPA receptor flip/flop mutants affecting deactivation, desensitization, and modulation by cyclothiazide, aniracetam, and thiocyanate. *Journal of Neuroscience* 16, 6634-6647.
- PATNEAU, D.K., VYKLICKY, L.J. & MAYER, M.L. (1993). Hippocampal neurons exhibit cyclothiazide-sensitive rapidly desensitizing responses to kainate. *Journal of Neuroscience* 13, 3496-3509.
- PETERS, A. & KIMERER, L.M. (1981). Bipolar neurons in rat visual cortex: a combined Golgi-electron microscope study. *Journal of Neurocytology* 10, 921-946.
- PETERS, A. (1987). Number of neurons and synapses in primary visual cortex. In *Cerebral cortex: further aspects of cortical function, including hippocampus*, eds. PETERS, A. & JONES, E.G., pp. 267-294. New York: Plenum.
- PETTIT, D.L., WANG, S.S., GEE, K.R. & AUGUSTINE, G.J. (1997). Chemical two-photon uncaging: a novel approach to mapping glutamate receptors. *Neuron* 19, 465-471.

- RALL, W. (1977). Core conductor theory and cable properties of neurons. In *Handbook of Physiology. The Nervous System*, ed. KANDEL, E.R., pp. 39-97. Bethesda: American Physiological Society.
- RALL, W. & SEGEV, I. (1985). Space-clamp problems when voltage clamping branched neurons with intracellular microelectrodes. In *Voltage and Patch-clamping with Microelectrodes*, eds. SMITH, T.G., LECAR, H. & REDMAN, S.J., pp. 191-215. Bethesda: American Physiological Society.
- RAMMES, G., SWANDULLA, D., SPIELMANN, P. & PARSONS, C.G. (1998). Interactions of GYKI 52466 and NBQX with cyclothiazide at AMPA receptors: experiments with outside-out patches and EPSCs in hippocampal neurones. *Neuropharmacology* 37, 1299-1320.
- ROHRBOUGH, J. & SPITZER, N.C. (1996). Regulation of intracellular Cl⁻ levels by Na⁺-dependent Cl⁻ cotransport distinguishes depolarizing from hyperpolarizing GABA_A receptor-mediated responses in spinal neurons. *Journal of Neuroscience* 16, 82-91.
- SAXENA, N.C. & MACDONALD, R.L. (1994). Assembly of GABA_A receptor subunits: role of the delta subunit. *Journal of Neuroscience* 14, 7077-7086.
- SCATTON, B. (1993). The NMDA receptor complex. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 7, 389-400.
- SCHILLER, J., HELMCHEN, F. & SAKMANN, B. (1995). Spatial profile of dendritic calcium transients evoked by action potentials in rat neocortical pyramidal neurones. *Journal of Physiology* 487, 583-600.
- SEEBURG, P.H. (1993). The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends in Neurosciences* 16, 359-365.
- SERAFINI, R., VALEYEV, A.Y., BARKER, J.L. & POULTER, M.O. (1995). Depolarizing GABA-activated Cl⁻ channels in embryonic rat spinal and olfactory bulb cells. *Journal of Physiology* 488, 371-386.
- SHAO, Z. & BURKHALTER, A. (1996). Different balance of excitation and inhibition in forward and feedback circuits of rat visual cortex. *Journal of Neuroscience* 16, 7353-7365.
- SHEARDOWN, M.J., NIELSEN, E.O., HANSEN, A.J., JACOBSEN, P. & HONORÉ, T. (1990). 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science* 247, 571-574.
- SHEPHERD, G.M. (1990). *The Synaptic Organization of the Brain*. New York: Oxford University Press, Inc.
- SIEGHART, W. (1995). Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacological Reviews* 47, 181-234.
- SMITH, G.B. & OLSEN, R.W. (1995). Functional domains of GABA_A receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 16, 162-168.
- SOMMER, B., KEINÄNEN, K., VERDOORN, T.A., WISDEN, W., BURNASHEV, N., HERB, A., KOHLER, M., TAKAGI, T., SAKMANN, B. & SEEBURG, P.H. (1990). Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 249, 1580-1585.
- SOMMER, B., KOHLER, M., SPRENGEL, R. & SEEBURG, P.H. (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67, 11-19.
- SOMOGYI, P., TAMAS, G., LUJAN, R. & BUHL, E.H. (1998). Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Research - Brain Research Reviews* 26, 113-135.
- SPRUSTON, N., JAFFE, D.B., WILLIAMS, S.H. & JOHNSTON, D. (1993). Voltage- and space-clamp errors associated with the measurement of electrotonically remote synaptic events. *Journal of Neurophysiology* 70, 781-802.

- SPRUSTON, N., JAFFE, D.B. & JOHNSTON, D. (1994). Dendritic attenuation of synaptic potentials and currents: the role of passive membrane properties. *Trends in Neurosciences* 17, 161-166.
- STALEY, K., SMITH, R., SCHAACK, J., WILCOX, C. & JENTSCH, T.J. (1996). Alteration of GABA_A receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. *Neuron* 17, 543-551.
- STAUBLI, U. & LYNCH, G. (1990). Stable depression of potentiated synaptic responses in the hippocampus with 1-5 Hz stimulation. *Brain Research* 513, 113-118.
- STEVENS, C.F. & WANG, Y. (1994). Changes in reliability of synaptic function as a mechanism for plasticity. *Nature* 371, 704-707.
- STUART, G.J., DODT, H.U. & SAKMANN, B. (1993). Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 423, 511-518.
- STUART, G.J. & SAKMANN, B. (1994). Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367, 69-72.
- STUART, G.J. & SAKMANN, B. (1995). Amplification of EPSPs by axosomatic sodium channels in neocortical pyramidal neurons. *Neuron* 15, 1065-1076.
- STUART, G.J., SPRUSTON, N., SAKMANN, B. & HAUSSER, M. (1997). Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends in Neurosciences* 20, 125-131.
- STUART, G.J. & SPRUSTON, N. (1998). Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites. *Journal of Neuroscience* 18, 3501-3510.
- SUTOR, B. & ZIEGLGÄNSBERGER, W. (1987). A low-voltage activated, transient calcium current is responsible for the time-dependent depolarizing inward rectification of rat neocortical neurons in vitro. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 410, 102-111.
- SUTOR, B. & LUHMANN, H.J. (1995). Development of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in the rat neocortex. *Perspectives on Developmental Neurobiology* 2, 409-419.
- SWARTZWELDER, H.S., FERRARI, C., ANDERSON, W.W. & WILSON, W.A. (1989). The drug MK-801 attenuates the development, but not the expression, of long-term potentiation and stimulus train-induced bursting in hippocampal slices. *Neuropharmacology* 28, 441-445.
- SZENTÁGOTHAI, J. (1975). The 'module-concept' in cerebral cortex architecture. *Brain Research* 95, 475-496.
- SZENTÁGOTHAI, J. (1978). The Ferrier Lecture, 1977. The neuron network of the cerebral cortex: a functional interpretation. *Proceedings of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences* 201, 219-248.
- TAKEBAYASHI, M., KAGAYA, A., HAYASHI, T., MOTOHASHI, N. & YAMAWAKI, S. (1996). gamma-Aminobutyric acid increases intracellular Ca²⁺ concentration in cultured cortical neurons: role of Cl⁻ transport. *European Journal of Pharmacology* 297, 137-143.
- THOMSON, A.M., WEST, D.C., HAHN, J. & DEUCHARS, J. (1996). Single axon IPSPs elicited in pyramidal cells by three classes of interneurons in slices of rat neocortex. *Journal of Physiology* 496, 81-102.
- THOMSON, A.M. & DESTEXHE, A. (1999). Dual intracellular recordings and computational models of slow inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortical and hippocampal slices. *Neuroscience* 92, 1193-1215.
- TRAYNELIS, S.F. & CULL-CANDY, S.G. (1991). Pharmacological properties and H⁺ sensitivity of excitatory amino acid receptor channels in rat cerebellar granule neurones. *Journal of Physiology* 433, 727-763.

- TSIEN, R.W. & MALINOW, R. (1990). Long-term potentiation: presynaptic enhancement following postsynaptic activation of Ca²⁺-dependent protein kinases. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 55, 147-159.
- TSUMOTO, T. (1992). Long-term potentiation and long-term depression in the neocortex. *Progress in Neurobiology* 39, 209-228.
- TSUMOTO, T., YASUDA, H., FUKUDA, M. & AKANEYA, Y. (1996). Postsynaptic calcium and calcium-dependent processes in synaptic plasticity in the developing visual cortex. *Journal of Physiology, Paris* 90, 151-156.
- UPTON, N. & BLACKBURN, T. (1996). Pharmacology of Mammalian GABA_A receptors. In *The GABA Receptors*, eds. ENNA, S.J. & BOWERY, N.G., pp. 83-120. Totowa: Humana Press.
- VAN BREDERODE, J.F. & SPAIN, W.J. (1995). Differences in inhibitory synaptic input between layer II-III and layer V neurons of the cat neocortex. *Journal of Neurophysiology* 74, 1149-1166.
- VAN EDEN, C.G., KROS, J.M. & UYLINGS, H.B. (1990). The development of the rat prefrontal cortex. Its size and development of connections with thalamus, spinal cord and other cortical areas. *Progress in Brain Research* 85, 169-183.
- WANG, S.S. & AUGUSTINE, G.J. (1995). Confocal imaging and local photolysis of caged compounds: dual probes of synaptic function. *Neuron* 15, 755-760.
- WAXHAM, M.N. (1999). Neurotransmitter Receptors. In *Fundamental Neuroscience*, eds. ZIGMOND, M.J., BLOOM, F.E., LANDIS, S.C., ROBERTS, J.L. & SQUIRE, L.R., pp. 235-267. San Diego: Academic Press.
- WIEBOLDT, R., GEE, K.R., NIU, L., RAMESH, D., CARPENTER, B.K. & HESS, G.P. (1994). Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8752-8756.
- WILLIAMS, K., RUSSELL, S.L., SHEN, Y.M. & MOLINOFF, P.B. (1993). Developmental switch in the expression of NMDA receptors occurs in vivo and in vitro. *Neuron* 10, 267-278.
- WISDEN, W., LAURIE, D.J., MONYER, H. & SEEBURG, P.H. (1992). The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *Journal of Neuroscience* 12, 1040-1062.
- WISE, S.P. & JONES, E.G. (1978). Developmental studies of thalamocortical and commissural connections in the rat somatic sensory cortex. *Journal of Comparative Neurology* 178, 187-208.
- WO, Z.G. & OSWALD, R.E. (1994). Transmembrane topology of two kainate receptor subunits revealed by N-glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 7154-7158.
- WU, W.L., ZISKIND-CONHAIM, L. & SWEET, M.A. (1992). Early development of glycine- and GABA-mediated synapses in rat spinal cord. *Journal of Neuroscience* 12, 3935-3945.
- YAMADA, K.A. & ROTHMAN, S.M. (1992). Diazoxide blocks glutamate desensitization and prolongs excitatory postsynaptic currents in rat hippocampal neurons. *Journal of Physiology* 458, 409-423.
- YUSTE, R., GUTNICK, M.J., SAAR, D., DELANEY, K.R. & TANK, D.W. (1994). Ca²⁺ accumulations in dendrites of neocortical pyramidal neurons: an apical band and evidence for two functional compartments. *Neuron* 13, 23-43.
- YUSTE, R. & DENK, W. (1995). Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375, 682-684.

- YUSTE, R. & TANK, D.W. (1996). Dendritic integration in mammalian neurons, a century after Cajal. *Neuron* 16, 701-716.
- ZHANG, L., SPIGELMAN, I. & CARLEN, P.L. (1991). Development of GABA-mediated, chloride-dependent inhibition in CA1 pyramidal neurones of immature rat hippocampal slices. *Journal of Physiology* 444, 25-49.
- ZUKIN, R.S. & BENNETT, M.V. (1995). Alternatively spliced isoforms of the NMDARI receptor subunit. *Trends in Neurosciences* 18, 306-313.

Abkürzungen

a	Radius eines Zylinders
ACSF	Künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (" artificial cerebrospinal fluid ")
AMPA	α - Amino -3-hydroxy-5- methyl -4-isoxazol propionsäure ("...propionic acid ")
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosin triphosphat
BAPTA	1,2- bis (2- Amino phenoxy)ethan-N,N,N',N'- tetraacetat
CGP35348	p-(3-Aminopropyl)-P-diethoxymethylphosphinsäure
C_m	Spezifische Membrankapazität
CNB	α - Carboxy -2- nitrobenzyl
CNQX	6- Cyano -7- nitroquinoxalin -2,3-dione
D-APV	D (-)-2- Amino -5- phosphonopentansäure
E_{Cl}	Cl ⁻ -Gleichgewichtspotential
EGTA	bis-(Amino ethyl)- glycolether -N,N,N',N'- tetraacetat
EPSC	Exzitatorischer postsynaptischer Strom ("... current ")
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
GABA	γ - Aminobuttersäure ("... acid ")
GC	Gradientenkontrast ("... contrast ")
GluR	Glutamatrezeptor
GYKI 52466	1-(4-Amino-phenyl)-4-methyl-7,8-methyl-endioxyl-5H-2,3-benzodiazepin
HWFM	" Half width full maximum "
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
IR	Infrarot
λ	Längskonstante
L	Elektrotonische Länge
l	Länge eines Zylinders
LTD	Langzeitdepression (" long-term depression ")
LTP	Langzeitpotenzierung (" long-term potentiation ")
MK-801	Dizocilpin
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure (" messenger ribonucleic acid ")
NBQX	6- Nitro -7-sulphamoyl- benz(f)quinoxalin -2,3-dion
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NR	NMDA-Rezeptor
PCP	Phencyclidin
PSD	Postsynaptische Dichte
R_i	Längswiderstand

R_m	Spezifischer Membranwiderstand
RMP	R uhem m embran p otential
R_N	Eingangswiderstand
S.E.M.	Standardfehler ("standard e rror of the m ean")
TM	T rans m embran s egment
TTX	T etrod o to x in
UV	U ltraviolett
V_m	Membranpotential
ZNS	Z entrales N ervens s ystem

Verwendete Substanzen

(CNB-caged) GABA	1 mM	Molecular Probes
(CNB-caged) Glutamat	0,5 mM	Molecular Probes
BAPTA	10 mM	Sigma
CaCl ₂	2 mM	Merck
CGP35348	200 µM	Ciba-Geigy
EGTA	0,5 mM	Merck
Glucose	5 - 25 mM	Merck
HEPES	10 mM	Biomol
KCl	2,5 - 5 mM	Merck
K-Gluconat	130 mM	Fluka
KOH	1 M	Merck
Mg-ATP	2 mM	Sigma
MgCl ₂	1 - 4 mM	Merck
MK-801	20 µM	Tocris Cookson
NaCl	125 mM	Merck
NaH ₂ PO ₄	1,25 mM	Merck
NaHCO ₃	25 mM	Merck
Picrotoxin	75 µM	Sigma
TTX	1 µM	Sigma

Danksagung

An erster Stelle möchte ich herzlich Herrn Prof. Dr. W. Zieglgänsberger danken, der mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat. Neben seiner großzügigen Unterstützung danke ich ihm weiterhin für die stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. F. Holsboer bedanke ich mich für die Erlaubnis zur Nutzung sämtlicher Einrichtungen seines Hauses.

Herrn PD Dr. H.-U. Dodt danke ich für die Vergabe des Themas und die gute Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.J. Leppelsack möchte ich herzlich für die externe Betreuung, seine Anregungen, sein Interesse und seine Hilfsbereitschaft danken.

Bei Frau C. Hilf und Frau B. Hauger bedanke ich mich für die technische Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Klinische Neuropharmakologie danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und menschliche Atmosphäre. Für zahlreiche wissenschaftliche sowie persönliche Gespräche möchte ich mich insbesondere bei Andi, Krischan, Ulli, Jan, Gerhard, Bettina und Anja bedanken.

Lebenslauf

Geburt 9.7.1968 in München
Name Matthias Gerhard Eder
Eltern Jörg Eder, Sieglinde Eder, geb. Schär
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig

Ausbildung

1975 - 1979 Grundschule an der Alfonsstraße, München
1979 - 1988 Wittelsbacher-Gymnasium, München; Abschluß: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,5)
1988 - 1990 Ableistung des Zivildienstes am Klinikum Rechts der Isar, München
11/1990 - 11/1996 Studium der Biologie an der Technischen Universität München; Abschluß: Diplom (Note: "sehr gut"); Diplomarbeit mit dem Titel "Octopaminerge Modulation eines Propriozeptors der afrikanischen Wanderheuschrecke *Locusta migratoria*"
seit 4/1997 Promotion am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Abteilung Klinische Neuropharmakologie, München

Eigene Arbeiten

1.) Zeitschriftenbeiträge

BRÄUNIG, P. & EDER, M. (1998). Locust unpaired median (DUM) neurons directly innervate and modulate hindleg proprioceptors. *The Journal of Experimental Biology*, 201, 3333-3338.

DODT, H.U., EDER, M., FRICK, A. & ZIEGLGÄNSBERGER, W. (1999). Precisely localized LTD in the neocortex revealed by infrared-guided laser stimulation. *Science* 286, 110-113.

EDER, M., RAMMES, G., ZIEGLGÄNSBERGER, W. & DODT, H.U.: GABA_A and GABA_B receptors on neocortical neurons are differentially distributed. *Zur Publikation eingereicht*.

2.) Diplomarbeit

EDER, M. (1996). Octopaminerge Modulation eines Propriozeptors der afrikanischen Wanderheuschrecke *Locusta migratoria*. Technische Universität München, Diplomarbeit.

3.) Konferenzbeiträge

DODT, H.-U., EDER, M., FRICK, A. & ZIEGLGÄNSBERGER, W. (1998). Long-term depression of glutamate sensitivity investigated by infrared-guided laser stimulation in rat neocortex. *Society for Neuroscience Abstracts*, 205.4.

DODT, H.-U., EDER, M., FRICK, A. & ZIEGLGÄNSBERGER, W. (1998). Long-term depression of glutamate sensitivity investigated by targeted laser photostimulation in rat neocortex. *European Neuroscience Association Abstracts*, 14.19.

EDER, M. & BRÄUNIG, P. (1996). Modulation of leg joint strand receptors of *Locusta migratoria* by biogenic amines. *Proceedings of the 24th Göttingen Neurobiology Conference*, 116.

EDER, M. & BRÄUNIG, P. (1996). Modulation of leg joint strand receptors of *Locusta migratoria* by biogenic amines. *Proceedings of the 20th international Congress of Entomology*, volume 1, page 208.

EDER, M., ZIEGLGÄNSBERGER, W. & DODT, H.-U. (1999). GABA receptors are differentially distributed on pyramidal neurons in the neocortex as revealed by infrared-guided laserstimulation. *Society for Neuroscience Abstracts*, 597.12.

EDER, M., ZIEGLGÄNSBERGER, W. & DODT, H.-U. (2000). GABA receptors are differentially distributed on pyramidal neurons in the neocortex. *German Physiological Society*, S04-4.

SCHIERLOH, A., EDER, M., ZIEGLGÄNSBERGER, W. & DODT, H.-U. (2000). Circuitry of rat barrel cortex investigated by infrared-guided laserstimulation. *Synapses 2000*.

SCHIERLOH, A., EDER, M., ZIEGLGÄNSBERGER, W. & DODT, H.-U. (2000). Circuitry of rat barrel cortex investigated by infrared-guided laserstimulation. *Society for Neuroscience Abstracts*.