

Aus dem Physiologischen Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Arthur Konnerth

**Entwicklungsspezifische Wirkmechanismen
der Neurotransmitter GABA und Glyzin**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Nima Marandi

aus

Karlsruhe

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Konnerth
Prof. Dr. M. Schliwa

Mitberichterstatter: Prof. Dr. U. Büttner
Prof. W. Lange

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Jens Eilers
PD Dr. Olga Garaschuk

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2003

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	7
1.1 GABA-vermittelte Kalziumsignalgebung in der neuronalen Entwicklung	7
1.2 Zwei-Photonen Fluoreszenzmessungen in intaktem Gehirngewebe	9
1.3 GABA-vermittelte Kalziumsignale in sich entwickelnden Purkinjoneuronen des Kleinhirns der Ratte	10
1.4 GABA-vermittelte Kalziumsignale in migrierenden Körnerzellen des Kleinhirns	11
1.5 GABA- und Glyzin-vermittelte Kalziumsignale im Rückenmark des Zebrafisches <i>in vivo</i>	14
1.6 Zwei-Photonen Messungen dynamischer Chloridänderungen in intakten Neuronen	16
2. Methode	21
2.1 Präparation, Aufbewahrung und Beladen der Gehirnschnitte	21
2.2 Präparation und Beladen der Zebrafischlarven	23
2.3 Fluoreszenzmessungen	24
2.4 Elektrophysiologie	25
2.5 Kalibration von MQAE	26
2.6 Pharmaka	27

3. Ergebnisse	28
3.1 GABA-vermittelte Kalziumsignalgebung in Purkinjezellen des Kleinhirns der Ratte während der frühen postnatalen Entwicklung	28
3.1.1 <i>GABA_A-Rezeptor-vermittelte Kalziumsignale in unreifen Purkinjezellen</i>	28
3.1.2 <i>Mechanismen, die GABA-vermittelten Kalziumsignalen zugrunde liegen</i>	31
3.1.3 <i>Perforated-patch Messungen von GABA-vermittelten Strömen</i>	33
3.1.4 <i>Entwicklungsbedingte Verschiebung des GABA-Gleichgewichtspotentials in Purkinjezellen</i>	35
3.2 GABA _A -Rezeptor-vermittelte Kalziumsignalgebung in migrierenden Neuronen des ZNS.	38
3.2.1 <i>GABA_A-Rezeptor-vermittelte Kalziumantworten in unreifen Körnerzellen des Kleinhirns</i>	38
3.2.2 <i>Altersprofil der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Kalziumsignalgebung</i>	41
3.2.3 <i>Mechanismus der GABA_A-Rezeptor vermittelten Kalziumsignalgebung</i>	46
3.2.4 <i>Supralineare Verstärkung der Kalziumsignale bei gleichzeitiger Aktivierung von GABA_A- und NMDA-Rezeptoren</i>	48
3.3 GABA- und Glyzin-vermittelte Kalziumsignale <i>in vivo</i>	51

3.3.1	<i>Beladen der Rückenmarksneuronen in Zebrafischlarven mit Kalziumfarbstoffen</i>	51
3.3.2	<i>GABA- und Glyzin-vermittelte Kalziumsignale in Rückenmarksneuronen der Zebrafischlarven</i>	52
3.4	Zwei-Photonen Messungen dynamischer Chloridänderungen in intakten Neuronen	56
3.4.1	<i>Biophysikalische Eigenschaften von MQAE</i>	56
3.4.2	<i>Zwei-Photonen Mikroskopie von mit MQAE beladenen Neuronen</i>	62
3.4.3	<i>Intrazelluläre Chloridmessungen</i>	65
4.	Diskussion	68
4.1	GABA-vermittelte Kalziumsignale in sich entwickelnden Purkinjoneuronen des Kleinhirns der Ratte	68
4.2	GABA-vermittelte Kalziumsignale in migrierenden Körnerzellen des Kleinhirns	70
4.3	GABA-vermittelter Kalziumsignalgebung zugrundeliegende Mechanismen	72
4.4	Funktionelle Auswirkungen in Purkinjenzellen des Kleinhirns	73
4.5	Funktionelle Auswirkungen in Körnerzellen des Kleinhirns	75
4.6	GABA- und Glyzin-vermittelte Kalziumsignale <i>in vivo</i>	78
4.7	Zwei-Photonen Messungen dynamischer Chloridänderungen in intakten Neuronen	82
4.8	Konsequenzen für die klinische Therapie	90

5. Anhang	92
5.1 Beschreibung der Konzentrationsabhängigkeit Chlorid- vermittelter Fluoreszenzänderungen	92
5.2 Originalarbeiten	95
6. Zusammenfassung	113
7. Schrifttumsverzeichnis	115
8. Lebenslauf	125
9. Danksagungen	126

1. Einleitung

1.1 GABA-vermittelte Kalziumsignalgebung in der neuronalen Entwicklung

Während der embryonalen und frühen postnatalen Gehirnentwicklung wird die neuronale Genexpression (LoTurco et al., 1995), Differenzierung (Marty et al., 1996), Migration (Komuro & Rakic, 1993) und die synaptische Reifung (Spoerri, 1988) reguliert durch transiente Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$). Erstaunlicherweise spielen sich diese Prozesse in einem Entwicklungsstadium ab, in dem in vielen Gehirnregionen die erregende glutamaterge Übertragung nur eine untergeordnete Rolle spielt oder noch nicht entwickelt ist (Durand et al., 1996). Im Gegensatz dazu scheinen GABA (γ -Aminobuttersäure) und Glyzin, die inhibitorischen Neurotransmitter im adulten Gehirn, in der frühen Entwicklung in einigen Gehirnregionen die vorrangige erregende Komponente innerhalb des neuronalen Netzwerkes zu sein (Reichling et al., 1994; Leinekugel et al., 1999). Klare Anhaltspunkte für eine depolarisierende Wirkung von GABA stammen aus Arbeiten im Hippokampus, dem Kortex, dem Striatum, dem Rückenmark, dem Hypothalamus, der Retina, dem Riechkolben (zusammengefasst in (Cherubini et al., 1991)) und aus dem Hirnstamm (Brockhaus & Ballanyi, 1998), während die depolarisierende Wirkung von Glyzin vor allem im Hirnstamm (Ehrlich et al., 1999; Kakazu et al., 1999) und im Rückenmark gezeigt wurde (Wu et al., 1992; Reichling et al., 1994; Kulik et al., 2000). In einigen Fällen scheinen GABA- und Glyzin- vermittelte Erregung auszureichen, um deutliche Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$

hervorzurufen (Yuste & Katz, 1991; Wang et al., 1994; Owens et al., 1996; Kulik et al., 2000), die eventuell sogar die zellulären Signale darstellen, die für eine regelrechte neuronale Entwicklung benötigt werden (Barker et al., 1998). Trotz einer beträchtlichen Zunahme an Informationen, die diese offensichtlich paradoxe Eigenschaft der GABAergen und glyzinerger Übertragung betreffen, gibt es bisher noch keine genauen Erkenntnisse über den exakten zeitlichen Ablauf der Veränderung des GABA- bzw. Glyzin-Antwortverhaltens in irgendeinem Zelltyp. Bisherige Arbeiten zu diesem Thema erfassten entweder nur ein limitiertes Intervall dieser Übergangsphase (Wu et al., 1992) oder wurden durchgeführt in kultivierten Neuronen (z. B. (Wang et al., 1994)), einem Modell, das keine zuverlässige Korrelation zulässt zur postnatalen Gehirnentwicklung *in vivo*.

Als *in vivo* nahes Modell zur neuronalen Entwicklung haben sich vor allem akute Gewebeschnitte des Kleinhirns der Ratte und der Maus etabliert. Das Kleinhirn, das in Nagetieren bei der Geburt noch unreif ist (Woodward et al., 1971), durchläuft in den ersten drei Lebenswochen eine eindrucksvolle Entwicklung. Auffallend ist dabei die Migration von Körnerzellen aus der äußeren Germinalschicht in die innere Körnerzellschicht, wo sie sich durch die Ausbildung von Synapsen mit verschiedenen Neuronen des Kleinhirnkortex in das neuronale Netzwerk integrieren (Altman & Bayer, 1996). Trotz einer Reihe von Untersuchungen entwicklungsbedingter neuronaler Veränderungen, gab es im Kleinhirn bisher nur wenige Erkenntnisse über die Wirkung von GABA (Brickley et al., 1996).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden das Entwicklungsprofil und der Mechanismus GABA-vermittelter Kalziumsignalgebung in visuell identifizierten Neuronen in Kleinhirngewebeschnitten untersucht.

1.2 Zwei-Photonen Fluoreszenzmessungen in intaktem Gehirngewebe

Die Untersuchung GABA- und Glyzin-vermittelter zellulärer Signale in Gehirngewebeschnitten setzt ein schnelles Messverfahren voraus, dass die Auflösung kleiner Strukturen innerhalb eines vitalen Gewebepreparates ohne dessen Schädigung ermöglicht. Die konfokale Laser-Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die deutliche Darstellung dünner optischer Schnitte innerhalb eines mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen vitalen Gewebes (Inoué, 1995). Durch das Abtasten des Gewebes mit einem durch ein Objektiv fokussierten Laserstrahl werden dabei die Fluoreszenzmoleküle angeregt. Zur Erzeugung eines optischen Schnittes durch das Gewebe wird durch eine konfokal angeordnete Lochblende (engl. *pinhole*) nur das Fluoreszenzlicht, das aus der Fokusebene stammt, von einer Photonenverstärkerröhre (*photon multiplier tube*, PMT) gemessen. Aus den jeweiligen Positionen im Scanraster und den gleichzeitig im PMT gemessenen Intensitäten wird von einem Computer ein Bild der Schnittebene erstellt. Allerdings ist bei dieser Methode der Anteil angeregter Fluoreszenzmoleküle außerhalb der optischen Schnittebene hoch, was ein hohes Ausmaß photochemischer Schäden zur Folge hat (Denk et al., 1990).

Bei der sogenannten Zwei-Photonen-Anregung werden Fluoreszenzmoleküle nicht durch die Energie eines einzelnen Photons, sondern durch die zweier Photonen einer längeren Wellenlänge angeregt (Denk et al., 1990). Da für diesen Prozess die Absorption der Photonen innerhalb eines kurzen Zeitintervalls stattfinden muss, findet die Zwei-Photonen-Anregung nur an einem Ort hoher Energiedichte, dem Fokuspunkt, statt. Infolgedessen kann zur Erstellung des

optischen Schnittbildes auch die Intensität des gesamten Emissionslichtes gemessen werden. Im Vergleich zur Ein-Photonen-Anregung ist bei der Zwei-Photonen-Anregung das Ausmaß photochemischer Schäden durch das Fehlen der Fluoreszenzanregung außerhalb der Fokusebene stark reduziert. Außerdem unterliegt langwelligeres Anregungslicht einer vergleichsweise geringen Lichtbrechung am Gewebe, was zu einer verbesserten räumlichen Auflösung bei Messungen innerhalb eines vitalen Gewebepräparates führt.

1.3 GABA-vermittelte Kalziumsignale in sich entwickelnden

Purkinjoneuronen des Kleinhirns der Ratte

Die Purkinjezellen der noch unreifen Kleinhirnrinde sind bei der Geburt in zwei bis drei unregelmäßigen Reihen angeordnet. In den folgenden vier Lebenstagen vollzieht sich eine Änderung zu einer aus einer einzelnen geordneten Reihe bestehenden Schicht von Zellen. Im gleichen Zeitraum geht aus dem kompakten, von multiplen Kletterfasern innervierten Soma durch die Bildung von Synapsen mit Parallelfasern der für diese Zellen typische, von einer einzelnen Kletterfaser innervierte Dendritenbaum hervor (Woodward et al., 1971; Ito, 1984). Bisher ist wenig bekannt über die Schlüsselsignale für diesen Abschnitt der zellulären Entwicklung.

Im Kleinhirn der Ratte wurde bereits in der frühen postnatalen Entwicklung der Neurotransmitter GABA nachgewiesen (Meinecke & Rakic, 1990). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Purkinjezellen in dieser Entwicklungsphase bereits die mRNA für die α_1 , β_2 , β_3 und die γ_2 -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors besitzen (Laurie et al., 1992).

Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit wird das Antwortverhalten von Purkinjezellen auf GABA während dieser Entwicklungsphase massiver synaptischer Reorganisation durch die Anwendung der Zwei-Photonen-Mikroskopie und der *perforated-patch* Methode charakterisiert.

Die hier dargestellten Daten zeigen das Vorhandensein GABA-vermittelter Kalziumsignale in der frühen postnatalen Entwicklung. Nach ungefähr einer Lebenswoche verschwinden im Gehirn der Ratte diese Signale. Diese entwicklungsbedingte Änderung geht einher mit einer Verschiebung des elektrophysiologischen Effektes einer GABA_A-Rezeptor-Aktivierung von einer Depolarisation zu einer Hyperpolarisation.

1.4 GABA-vermittelte Kalziumsignale in migrierenden Körnerzellen des Kleinhirns

Die Migration von Neuronen ist ein grundlegender Prozess in der Entwicklung des Gehirns. Durch die Wanderung entlang definierter Bahnen gelangen Neuronen von ihrer Keimregion nach ihrer letzten mitotischen Teilung in ihr Zielgebiet, in dem sie sich durch die Bildung von Synapsen in das neuronale Netzwerk integrieren.

Eine Reihe genetischer und epigenetischer Signale, die die neuronale Migration lenken, sind in Kleinhirnkörnerzellen untersucht worden, einem häufig benutzten Modell neuronaler Migration. In Nagetieren werden Kleinhirnkörnerzellen während der ersten drei Wochen nach der Geburt in der mitotischen Zone der äußeren Körnerzellschicht (EGL) des Kleinhirnkortex gebildet. Nach ihrer letzten Teilung legen sich die proliferierenden Zellen der sie leitenden Struktur, radial orientierten Fortsätzen der Bergmann Glia, an. Entlang der Gliafortsätze

durchqueren die Körnerzellen die Molekularschicht, bevor sie die Purkinjzellschicht (PCL) erreichen. Nach der Loslösung von der Bergmann Glia und der Durchquerung der Purkinjzellschicht dringen sie in die innere Körnerzellschicht ein und lassen sich in der inneren Körnerzellschicht nieder, wo sie Synapsen mit glutamatergen Moosfasern und GABAergen Golgineuronen bilden (Altman, 1972; Komuro & Rakic, 1995; Komuro & Rakic, 1998a).

Eine Reihe genetischer Studien zeigte die Wirkung verschiedener Moleküle auf Glia-gelenkte Migration von Nervenzellen durch Zell-Zell Erkennung und Zell-Zell-Adhäsion (Rakic et al., 1994; Hatten, 1999). Beispielsweise blockierten F_{ab}-Fragmente von Antikörpern der neuronalen zellulären Adhäsionsmoleküle Astrotactin und L1 die Migration von Kleinhirnkörnerzellen entlang von astroglialen Fortsätzen *in vitro*. Dies weist darauf hin, dass Astrotactin und L1 als Liganden der Neuron-Glia-Bindung während der neuronalen Migration dienen. (Lindner et al., 1983; Zheng et al., 1996). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass *adhesion molecule on glia* (AMOG) ein zelluläres Adhäsionsmolekül im Kleinhirn von Gliazellen während den kritischen Entwicklungsphasen der Körnerzellmigration exprimiert wird. *In vitro* konnte die Migration von Körnerzellen, die durch Oberflächenkontakte zwischen den migrierenden Neuronen und Fortsätzen der Astroglia geleitet wird, gehemmt werden durch Antikörper gegen AMOG, allem Anschein nach durch eine Störung der Adhäsion von Neuronen an Glia (Antonicek et al., 1987). Vor kurzem zeigten Rio und Mitarbeiter (Rio et al., 1997), dass Kleinhirnkörnerzellen während der migratorischen Phase den Wachstumsfaktor *neuregulin* exprimieren, während der zugehörige Rezeptor *erbB4* von Bergmann Gliazellen exprimiert wird. Eine Transfektion kultivierter Gliazellen mit dominant negativen *erbB4*-Rezeptoren, denen der größte Teil der intrazellulären Domäne fehlte, hatte eine signifikant erniedrigte

Migrationsrate der Neuronen entlang der Gliafasern zur Folge. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion von *neuregulin* und *erbB4* eine kritische Rolle in der neuronalen Migration spielt.

Einige epigenetische Signale, die die Migration der Kleinhirnkörnerzellen kontrollieren, wurden maßgeblich von Komuro und Rakic untersucht (zur Übersicht (Komuro & Rakic, 1998b)). Aus deren Studien ging hervor, dass die Migration von Körnerzellen vor allem durch transiente Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration moduliert wird (Komuro & Rakic, 1996). Diese Hypothese wird maßgeblich gestützt durch die Beobachtung, dass die Migration von Kleinhirnkörnerzellen von der extrazellulären Kalziumkonzentration, einem Kalziumeinstrom durch spannungsabhängige Kalziumkanäle des N-Typs und von der Aktivierung glutamaterger NMDA-Rezeptoren abhängig ist. Die letztgenannte Beobachtung legt nahe, dass von Parallelfasern, den Axonen der Körnerzellen, freigesetztes Glutamat kalziumpermeable NMDA-Rezeptoren parakrin aktiviert (Komuro & Rakic, 1992; Komuro & Rakic, 1993).

Ein anderer im Kleinhirn reichlich vorhandener Neurotransmitter ist GABA. Schon kurze Zeit nach der Geburt wird GABA im Kleinhirn in Golgineuronen nachgewiesen (Meinecke & Rakic, 1990). Golgizellen bilden Synapsen mit Körnerzellen nach der Migration. Außerdem besitzen Kleinhirnkörnerzellen der äußeren Körnerzellschicht bereits ab den frühen Entwicklungsstadien funktionelle GABA_A-Rezeptoren (Brickley et al., 1999). Diese Befunde deuten darauf hin, dass GABA ein modulatorischer Faktor der neuronalen Migration sein könnte.

In der Tat zeigten pharmakologische Studien an kultivierten kortikalen Gehirnschnitten, dass von kortikalen Zellen freigesetztes GABA die Migration postmitotischer Neurone in ihre Zielregion über eine Aktivierung Saclofen- und

Picrotoxin-sensitiver Rezeptoren anregt. Während Picrotoxin-sensitive Rezeptoren die Zellen zum Verlassen germinaler Regionen veranlassen zu scheinen, sind Saclofen-sensitive Rezeptoren anscheinend für die Migration in die Zielregion verantwortlich. Untersuchungen mit dem spezifischen GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Bicucullin zeigen, dass eine GABA_A-Rezeptor-Aktivierung der Migration embryonaler kortikaler Neuronen Einhalt gebietet. Diese Beobachtungen bestätigen Ergebnisse von Untersuchungen an dissoziierten embryonalen kortikalen Neuronen, bei denen GABA den Anteil der durch kalziumabhängige Mechanismen migrierenden Zellen erhöht.

In den in dieser Arbeit dargestellten Versuchen wurde die Stichhaltigkeit der Annahme, dass GABA ein ausschlaggebender Faktor der neuronalen Migration ist, *in situ* an migrierenden Neuronen getestet. In akut isolierten Kleinhirngewebeschnitten wurden Körnerzellen vor, während und nach der Migrationsphase identifiziert und der Einfluss von GABA auf die $[Ca^{2+}]_i$ analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass GABA Kalziumsignale in migrierenden Neuronen hervorruft. Des Weiteren wurde durch eine gleichzeitige Aktivierung von NMDA-Typ Glutamatrezeptoren ein supralineares Ansteigen der Kalziumsignale evoziert.

1.5 GABA- und Glyzin-vermittelte Kalziumsignale im Rückenmark des Zebrafisches *in vivo*

Eine Reihe von Untersuchungen haben bisher GABA und Glyzin-vermittelte Kalziumsignale in kultivierten Zellen und Gehirngewebepräparaten gezeigt ((Yuste & Katz, 1991; Wang et al., 1994); zur Übersicht siehe (Ben-Ari, 2002)), während der Nachweis dieses Signals *in vivo* noch nicht erbracht wurde. Ein Grund hierfür ist

sicherlich, dass es erst in den letzten Jahren zu entscheidenden Fortschritten im Bereich der dynamischen *in vivo* Fluoreszenzmessungen kam.

Beispielsweise gelang es durch die Injektion eines Dextran-gekoppelten Kalziumindikatorfarbstoffes ins Rückenmark und in den Hirnstamm immobilisierter Zebrafischlarven, Gruppen identifizierbarer Neuronen zu beladen (Fetcho & O'Malley, 1995; O'Malley et al., 1996). Mit dieser Methode konnten nach einer 12- bis 24- stündigen Inkubationszeit, die zur zellulären Aufnahme des Farbstoffes benötigt wird, Kalziumsignale in gefärbten Zellen des neuronalen Netzwerkes infolge elektrischer und sensorischer Stimuli aufgelöst werden. Edwards und Cline (Edwards & Cline, 1999) beluden durch die iontophoretische Applikation eines Dextran-gekoppelten Kalziumindikatorfarbstoffes in die Retina Neurone im Retinotektalen System der *xenopus laevis* Kaulquappe. Dies ermöglichte die Messung der Abhängigkeit der intrazellulären Kalziumkonzentration von Lichtreizen in retinalen Axonen.

Vor kurzem gelang es erstmals neuronale Kalziumsignale in einem lebenden Tier durch einen genetisch kodierten ratiometrischen Kalziumindikatorfarbstoff zu messen. Kerr und Mitarbeiter (Kerr et al., 2000) entwickelten transgene Tiere der Nematode *Caenorhabditis elegans*, die das Kalziumindikatorprotein Cameleon in Neuronen und Muskelzellen exprimierten. Das Vorhandensein einer kalziumsensitiven und einer kalziuminsensitiven Domäne des Cameleon erlaubten ratiometrische Messungen transienter Änderungen der Kalziumkonzentration auch in Zellen intakter motiler Würmer. Dynamische Fluoreszenzmessungen während der Nahrungsaufnahme ergaben ein Einhergehen von Kalziumsignalen mit Kontraktionen der Pharynxmuskulatur. Außerdem konnten durch elektrische

Stimulation transiente Kalziumänderungen in Clomeleon exprimierenden Neuronen evoziert werden.

In dieser Arbeit wird eine neue Methode zur hochauflösenden *in vivo* Messung von Kalziumsignalen in einzelnen Zellen des neuronalen Netzwerkes vorgestellt. Durch die Injektion der membranpermeablen Kalziumindikatorfarbstoffe Fura PE 3 AM oder Calcium Green-1 AM in das Rückenmark von Zebrafischlarven wurden praktisch alle Neuronen des Rückenmarks innerhalb einer kurzen Zeitdauer (20-30 min) beladen. Es wird gezeigt, dass in diesem lebenden Präparat die Anwendung der Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie zeitlich und räumlich hochauflösende Messungen GABA- und Glyzin-vermittelter Kalziumsignale ermöglicht.

1.6 Zwei-Photonen Messungen dynamischer Chloridänderungen in intakten Neuronen

Während GABA in der frühen neuronalen Entwicklung Erregung über Membrandepolarisationen auslöst (Garaschuk et al., 1998), verursacht GABA im adulten Gehirn über eine Hyperpolarisationen der Zellmembran eine Erregungshemmung. Dieser Veränderung des GABAergen Antwortverhaltens scheint eine Verschiebung der intrazellulären Chloridkonzentration ($[Cl^-]_i$) zugrunde zu liegen (Cherubini et al., 1991; Rivera et al., 1999).

Trotz der Bedeutung der $[Cl^-]_i$ für die neuronale Funktion, besteht bisher wenig Wissen über die Mechanismen, die zu Veränderungen der $[Cl^-]_i$ führen. Ursächlich spielt hier vor allem das Fehlen geeigneter Methoden zum Messen der $[Cl^-]_i$ eine Rolle. In der Vergangenheit wurden Messungen der $[Cl^-]_i$ in einzelnen Neuronen mit intrazellulären Chlorid-selektiven Mikroelektroden durchgeführt (Kaila, 1994).

Allerdings ist dieses Verfahren technisch schwierig und erlaubt nur Messungen an relativ großen Neuronen (Krapf et al., 1988; Kaila, 1994). Außerdem wird die untersuchte Zelle durch die Penetration der Mikroelektrode zwangsläufig geschädigt.

Die Entwicklung chloridsensitiver Fluoreszenzfarbstoffe, die auf einem Chinolingerüst basieren (Verkman, 1990), vereinfachte maßgeblich die Durchführung von Chloridmessungen und ermöglichte erstmals Untersuchungen an Zellen mit unveränderter $[Cl^-]_i$ (Inoue et al., 1991; Hara et al., 1992). Zur Zeit sind zwei Fluoreszenzfarbstoffe für Chloridmessungen in intakten Zellen verfügbar. N-(6-methoxyquinolyl) acetoethyl ester (MQAE) ist membranpermeabel (Verkman et al., 1989) und geeignet, Zellen direkt zu beladen, vergleichbar mit den gängigen membranpermeablen Kalziumfluoreszenzfarbstoffe (Tsien, 1981). Im Gegensatz dazu muss 6-methoxy-N-ethylquinolinium chloride (MEQ) jedoch direkt vor der Beladung der Zellen zu einer ungeladenen membranpermeablen Form (diH-MEQ) reduziert werden (Bowers & Verkman, 1991). Innerhalb der Zelle wird diH-MEQ von zytosolischen Oxidasen wieder in die membranimpermeable Form (MEQ) umgewandelt. Mit diesen beiden Farbstoffen wurden Messungen der $[Cl^-]_i$ in mehreren Präparaten durchgeführt, unter anderem an isolierten neuronalen Wachstumsfortsätzen (Fukura et al., 1996), Nervenzellen (Hara et al., 1992; Schwartz & Yu, 1995), Gliazellen (Bevensee et al., 1997), an unterschiedlichen Arten von epithelialen und endothelialen Zellen (MacVinish et al., 1993; Lau et al., 1994; Brochiero et al., 1995; Tran et al., 1999), an Fibroblasten (Woll et al., 1996; Maglova et al., 1998) und an beta-Zellen des Pankreas (Eberhardson et al., 2000).

Allerdings haben diese Studien einige Nachteile dieser Technik aufgezeigt. Das größte Problem bei der Anwendung der Chinolin-basierten Fluoreszenzfarbstoffe ist, dass die Anregung mit Licht aus dem UV-nahen

Wellenlängenbereich (320-400 nm) stattfindet (Verkman, 1990) und dass dadurch die Farbstoffe starkem Bleichen ausgesetzt sind (Inglefield & Schwartz-Bloom, 1997; Nakamura et al., 1997). Dadurch sind entweder die Dauer der Messung oder die Bildwiederholungsrate (0.2–2 Bilder/min) stark eingeschränkt (Inglefield & Schwartz-Bloom, 1997; Fukuda et al., 1998; Sah & Schwartz-Bloom, 1999) mit der Folge einer eher statischen als dynamischen Messung. Weitere Nachteile stellen die hohe Autofluoreszenz lebenden Gewebes (die typischerweise verursacht wird durch die Erregung von Pyridinnukleotiden wie NAD(P)H) und eine erhöhte Phototoxizität, die teilweise zustande kommt durch die lichtinduzierte Freisetzung toxischer Produkte aus Farbstoffmolekülen, dar. Nach den Angaben vorangegangener Studien (Verkman et al., 1989; Bowersi & Verkman, 1991) ist die Leckrate für MEQ etwas geringer im Vergleich zu der für MQAE, weshalb dieser Farbstoff für optische Messungen der $[Cl^-]_i$ in Gehirnschnitten anscheinend bevorzugt wurde (Schwartz & Yu, 1995; Fukuda et al., 1998). Um eine gute Beladung der Gehirnschnitte zu erreichen, muss diH-MEQ jedoch direkt vor jeder Ladeprozedur (Fukuda et al., 1998) in einer zeitaufwendigen, sieben Schritte umfassenden chemischen Prozedur synthetisiert werden (Bowersi & Verkman, 1991). Des weiteren ist es nötig, die Gehirnschnitte für 30 bis 90 Minuten zu beladen, um eine ausreichende Anreicherung des Farbstoffes im Zellinneren zu erreichen, da diH-MEQ instabil ist und schon während der Beladungsprozedur sehr leicht oxidiert wird (Inglefield & Schwartz-Bloom, 1997; Fukuda et al., 1998).

Ein neuer Ansatz zur Durchführung nicht-invasiver Chloridmessungen ergab sich aus der Beobachtung, dass einige Mutationen des genetisch kodierten Fluoreszenzfarbstoffes *yellow fluorescent protein* (YFP) sensitiv für Chlorid sind (Wachter & Remington, 1999; Jayaraman et al., 2000; Galletta et al., 2001). Die

Konstruktion eines Fusionsproteins, das aus YFP und dem chloridinsensitiven *cyan fluorescent protein* (CFP) besteht, ermöglichte ratiometrische Messungen der $[Cl^-]_i$, die auf einer Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Übertragung basieren (Kuner & Augustine, 2000). Dieser neu entwickelte Farbstoff mit dem Namen Clomeleon hat eine geringere Chloridsensitivität ($IC_{50} = 160$ mM) als MQAE (15 mM) und MEQ (16-61 mM) (Verkman et al., 1989; Biwersi & Verkman, 1991; Schwartz & Yu, 1995), wird aber durch Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich (434 nm) angeregt und ist dadurch keinem starken Bleichen unterworfen. Nichtsdestotrotz hat Clomeleon zwei klare Nachteile im Vergleich zu Chinolium-basierten Fluoreszenzfarbstoffen: Es ist pH-sensitiv und hat eine nahezu 100mal langsamere Bindungskinetik (es bindet Chlorid über einen Zeitraum von 100ms (Jayaraman et al., 2000)). Infolgedessen kann Clomeleon weder schnelle Chloridänderungen wiedergeben noch ist es vorhersehbar, ob eine Fluoreszenzänderung in intakten Nervenzellen Änderungen des pH-Wertes oder der $[Cl^-]_i$ wiedergibt. Vor kurzem wurde von Galletta et al. (Galletta et al., 2001) eine andere chloridsensitive Mutante des YFP mit dem Namen V163S beschrieben. Die Charakterisierung dieses Proteins in der Küvette brachte im Vergleich zu den zur Zeit bekannten YFP-Mutanten die größte Chloridsensitivität (40 mM) zu Tage. Allerdings sind sicherlich noch weitere Untersuchungen notwendig um eine Aussage über die Chloridsensitivität und unter anderem auch über die pH-Abhängigkeit treffen zu können.

Hier wird eine neue Methode beschrieben zur Messung von Änderungen der $[Cl^-]_i$ von Nervenzellen in Gehirnschnitten. In dieser Methode wurde der chloridsensitive Fluoreszenzfarbstoff MQAE in Verbindung mit der Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie (Denk et al., 1990) benutzt. Es wird gezeigt, dass sich MQAE für Fluoreszenzmessungen unter Zwei-Photonen-Anregung eignet. Diese

Methode ermöglicht lange andauernde Messungen dynamischer Veränderungen der $[Cl^-]_i$ in Zellkörpern und Dendriten intakter Nervenzellen mit einer hohen räumlichen Auflösung und sehr wenig photochemischem Bleichen. Günstige Eigenschaften dieser Methode sind ein unkompliziertes Beladen der Zellen, ein gutes Anfärben der Zellkörper und der Dendriten in Gehirngewebeschnitten junger als auch nahezu adulter Ratten, eine Insensitivität für Änderungen des pH und der Bikarbonatkonzentration und die Möglichkeit, schnelle andauernde Messungen von Veränderungen der $[Cl^-]_i$ vorzunehmen.

2. Methode

2.1 Präparation, Aufbewahrung und Beladen der Gehirnschnitte

Die Versuche wurden durchgeführt an Gehirnschnitten des Kleinhirns, des Hippokampus und des Neokortex, deren Herstellung nach der von Edwards et al. beschriebenen Methode erfolgte. Hierzu wurden 1-24 Tage alte Wistar-Albino (Charles-River, Sulzfeld) oder Sprague-Dewley Ratten (eigene Zucht) dekapitiert. Nach der Spaltung der Kopfhaut mit einem Skalpell und der Entfernung der Schädeldecke mit einer feinen Schere konnten die erforderlichen Gehirnbereiche wiederum mit einem Skalpell freipräpariert werden. Aus dem Kleinhirn wurde der mediale Bereich um die Vermis mit zwei parasagittalen Schnitten herausgetrennt. Zur Erstellung von Gehirnschnitten des Hippokampus und des Kortex wurde das Gehirn als ganzes entnommen, mit einem Schnitt in der Mediansagittalebene geteilt und der kraniale Anteil durch einen Transversalschnitt entfernt. Das freipräparierte Hirngewebe wurde zunächst in kalte (1-3°C) Ringerlösung (Zusammensetzung siehe unten) überführt, um metabolische Prozesse zu inhibieren und dem Gewebeblock eine erhöhte Festigkeit zu verleihen. Nach dem Aufkleben des Gehirngewebeblocks auf einer Schnittfläche in einer Schneidekammer mit Cyanoacrylatkleber (Uhu, Bühl) und sofortiger Kühlung mit eiskalter Ringerlösung wurden mit einem vibrierenden Gewebeschnittgerät 300-500 µm dicke Gehirnschnitte hergestellt. Zum Schneiden der Hippokampus-Kortexschnitte älterer Ratten (> 14 Tage alt) wurde eine modifizierte, Saccharose-basierte Lösung verwendet (Zusammensetzung siehe unten). Nach dem Schneiden wurden die Gehirnschnitte direkt auf das GazeNetz

einer Inkubationskammer mit 34°C warmer Ringerlösung überführt. Bei dieser Temperatur starb erfahrungsgemäß ein Großteil der durch den Schneidevorgang beschädigten Zellen an der Oberfläche der Gehirnschnitte ab. Die darunterliegenden intakten Zellen wurden so für Messungen zugänglich.

Die Temperatur der Ringerlösung wurde nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf 25°C reduziert, um den Metabolismus des Gewebes zu reduzieren. Dies ermöglichte die Verwendung der Gehirnschnitte bis zu 6 Stunden nach dem Schneidevorgang.

Die bei diesen Versuchen verwendete Ringerlösung enthielt (in mM): 125 NaCl, 4.5 KCl, 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 Glukose, pH 7.4 bei Begasung mit 95% O₂ und 5% CO₂. Die Sacharose-basierte Lösung enthielt: 234 Sacharose, 5.3 KCl, 26 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 8 MgSO₄, 10 Glukose, pH 7.4 bei Begasung mit 95% O₂ und 5% CO₂.

Zur Durchführung eines Versuches wurden die Gehirnschnitte in eine Messkammer überführt, in der sie durch ein an einem Platindraht-U befestigtes Gitter aus Nylonfasern fixiert wurden.

Die Messkammer mit dem Gehirnschnitt wurde auf dem Objektträgertisch eines aufrechten Durchlichtmikroskopes positioniert. Über zwei Aussparungen in der Messkammer wurden die Gehirnschnitte während der Experimente mit Ringerlösung (22-24°C) perfundiert. Im Durchlicht konnten die zu untersuchenden Zellen identifiziert werden.

Die Beladung der Neuronen mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte durch eine Inkubation in Ringerlösung mit dem Kalziumindikator fura-2 AM (10 µM) oder dem Chloridindikator MQAE (6 mM) (beide von Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) für 10 Minuten bei 37°C.

Da fura-2 AM ein hydrophobes Molekül ist wurde es in einer Detergenz (20% Pluronic in DMSO) angesetzt (5 mM), um es in einer Ringerlösung in Lösung zu bringen. MQAE hingegen ist sehr amphophil und deshalb sehr gut wasserlöslich. Nach der Permeation der Zellmembran werden fura-2 AM und MQAE durch die Abspaltung von Estergruppen hydrophil und verbleiben so im Zytoplasma.

2.2 Präparation und Beladen der Zebrafischlarven

Für die *in vivo* Versuche wurden 5–8 Tage alte Zebrafischlarven (*Danio rerio*) verwendet, die bei 28.5°C in einer Salzwasserlösung (63,38 mg/l Meersalz, Tropic Marin, Wartenberg/Angersbach, Deutschland) aufgezogen worden sind. In diesem Entwicklungsstadium schwimmen die Fische bereits frei und können Nahrung aufnehmen.

Zur Durchführung der Versuche wurden die Fische durch 0.02% Tricain oder durch 0.02% Mivacurium (GlaxoSmithKline, München, Germany) immobilisiert und in Seitenlage in Weichagar (2%) eingebettet. Durch die Injektion von 1 mM Fura PE3 AM (Teflabs, Austin, Texas, USA) oder 1 mM Calcium Green-1 AM (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA; gelöst in Evans Ringer (in mM 134 NaCl, 2.9 KCl, 2.1 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 10 HEPES) mit DMSO (10%)) in das Rückenmark auf Höhe des Anus wurden Neuronen mit Kalziumfarbstoff beladen. Nach einer Dauer von ungefähr 20-30 Minuten war ein Großteil der Rückenmarksneuronen beladen. Während der Versuchsdauer dienten kardiale Aktivität und Durchblutung der Zebrafischlarven zur Kontrolle der Vitalität.

2.3 Fluoreszenzmessungen

Die zeitlich und räumlich hochauflösenden Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Zwei-Photonen Laser-Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden angeregt von einem *mode-locked* Laser System in einem Wellenlängenbereich von 720-870 nm, mit einer Pulswiederholungsrate von 80 MHz und mit einer Pulslänge von <100 fs (Tsunami and Millenia, Spectra Physics, Mountain View, California, USA). Dieser Laser war über ein Laser-Scanning-System (MRC 1024, Bio-Rad, UK) gekoppelt an ein aufrechtes Lichtmikroskop (BX50WI, Olympus, Tokyo, Japan), das ausgestattet war mit einem Wasserimmersionsobjektiv (Fluor 60x, 1.0 NA, Nikon, Tokyo, Japan). Mit einer Frequenz von 1-5 Hz wurde das Gewebe abgerastert. Die von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierten Photonen wurden durch einen Photomultiplier (H1518, Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) gemessen und direkt zu Bildern bzw. Bildsequenzen rekonstruiert, die auf der Festplatte eines Computers gespeichert wurden. Im Anschluss an die Experimente wurden die Fluoreszenzänderungen ausgewählter Regionen mit einer LabView-basierten Software (Fast Analysis 1.0 (Noll-Hussong, 2002); National Instruments, Austin, Texas, USA) gemessen. Nach der Subtraktion des Hintergrundrauschens wurden die gemittelten Helligkeitswerte der analysierten Regionen in Igor (WaveMetrics, Lake Oswego, Oregon, USA) ausgewertet. Da fura-2, Fura PE3 und MQAE bei ansteigender $[Ca^{2+}]$ bzw. $[Cl^-]$ mit einer Abnahme der emittierten Fluoreszenz reagieren, wurden die Fluoreszenzsignale dargestellt als $-\Delta F/F$, das negative Verhältnis zwischen der Fluoreszenzänderung (ΔF) und der Ausgangsfluoreszenz vor der Stimulation (F), Calcium Green-1 abhängige Fluoreszenzsignale wurden dargestellt als $\Delta F/F$. Zur

statistischen Auswertung der Kalziumfluoreszenzsignale wurden in Igor nach der Anwendung eines Gauss-Filters die Fluoreszenzwerte im Intervall ± 1 Sekunde vom Maximalwert gemittelt. Die statistische Präsentation der Daten erfolgte als arithmetisches Mittel \pm standardisiertem Fehler.

Hochauflösende Fluoreszenzbilder entstanden aus der Projektion der Einzelbilder aus verschiedenen Aufnahmeebenen (von denen jedes der Mittelwert aus wiederum 4-8 Einzelbildern war).

2.4 Elektrophysiologie

GABAerge Ströme in Purkinjezellen wurden mit einem EPC9 *patch-clamp* Verstärker (HEKA, Lambrecht, Deutschland) in der *perforated-patch* Technik gemessen. Die Verwendung der Chlorid-impermeablen Ionophore Gramicidin (Gramicidin D, Dubos, Sigma) ermöglichte Messungen transmembranärer Ströme im *whole-cell* Modus ohne die $[Cl^-]_i$ zu beeinflussen (Rhee et al., 1994). Bei diesen Messungen enthielt die extrazelluläre Ringerlösung die Antagonisten für AMPA und NMDA-Typ Glutamat-Rezeptoren CNQX (10 μ M) und APV (50 μ M) und den Blocker spannungsgesteuerter Natriumkanäle TTX (500 nM). Die Patchpipetten wurden hergestellt aus Borosilikatglas (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland). Die Spitzen der Patchpipetten wurden durch 5-7 Sekunden langes Eintauchen in eine Gramicidin-freie Pipettenlösung gefüllt, die 150 mM KCl und 10 mM Hepes enthielt. Die Pipette wurde daraufhin rückläufig mit einer Lösung gefüllt, die zusätzlich 25 μ g/ml Gramicidin enthielt (angesetzt in DMSO 1000fach konzentriert). Mit dieser Lösung gefüllt hatten die Pipetten einen Widerstand von 6-8 M Ω . Die Gramicidin-freie Pipettenspitze ermöglichte die Annäherung der Pipette an die Zelle ohne ein

unerwünschtes Austreten von Gramicidin. Nach dem Etablieren der *on-cell* Konfiguration konnte die Zunahme der Leitfähigkeit durch die Gramicidin-ionophoren anhand des seriellen Widerstandes (RS) ermittelt werden. Dieser wurde errechnet aus dem maximalen Strom, der aus einem kleinen hyperpolarisierten Spannungspuls resultierte. Beim Erreichen von $100\text{ M}\Omega$ für RS wurde das Ruhemembranpotential der Zelle bestimmt. Messungen GABA-vermittelter Ströme wurden begonnen, wenn RS kleiner als $25\text{ M}\Omega$ war. Die Daten wurden nach einer Filterung (3 kHz) mit 5 kHz durch die Pulse Software (HEKA, Lambrecht, Germany) aufgezeichnet.

2.5 Kalibration von MQAE

Die Lösungen für die Kalibration von MQAE in der Küvette enthielten 5 mM MQAE, 30 mM Hepes, Chlorid und HCO_3^- wie in den Abbildungen beschrieben. Die Osmolarität wurde durch Saccharose bei 310 mosm eingestellt, der pH wurde mit 1 N KOH in Abb. 17A und B auf 7.4 und in der Abb. 17C auf die angegebenen Werte eingestellt. Die Lösungen der Versuche, die in Abb. 16C dargestellt sind, enthielten 0 und 26 mM Chlorid. Die Küvette für die *in vitro* Versuche hatte ein Volumen von $70\text{ }\mu\text{l}$ und bestand aus einem Objektträger mit aufgeklebten Plexiglasring, der von einem Quarzglas-Deckgläschen abgedeckt wurde.

Die Messung der intrazellulären Chloridsensitivität von MQAE wurde nach dem von Krapf und Mitarbeitern (Krapf et al., 1988) beschriebenen Protokoll durchgeführt. Durch die K^+/H^+ Ionophore Nigericin ($10\text{ }\mu\text{M}$) und den Cl^-/OH^- Antiporter Tributylzinnchlorid ($10\text{ }\mu\text{M}$) wurden die $[\text{Cl}^-]$ und der pH in den Zellen den Werten im Extrazellulärraum angeglichen. Durch eine stufenweise Änderung der $[\text{Cl}^-]_e$ und dadurch auch der $[\text{Cl}^-]_i$ konnte die Chloridsensitivität von MQAE *in situ*

bestimmt werden. Die Kalibrationslösungen enthielten 0-40 mM KCl, 10 mM Hepes und 10 mM Natrium-Gluconat. Der pH wurde mit KOH bei 7.4 und die Osmolarität mit Kalium-Gluconat bei 310 mosm eingestellt.

2.6 Pharmaka

Agonisten (GABA, Glyzin, Muscimol, Glutamat, NMDA) wurden mit Druck (Picospritze PDES-2L, npi, Tamm, Germany) oder mittels Iontophorese (MVCS-02, npi, Tamm, Deutschland) aus einer dünnen einzel- oder doppelläufigen Glaspipette (6-12 M Ω) appliziert. Die Dauer der Druckapplikation betrug 100-1000 ms. Die iontophoretische Applikation von Pharmaka dauerte 20–50 ms. Bicucullin-Methiodid (20-100 μ M), Picrotoxin (20-50 μ M), Nickel (1 mM), APV (D-2-Amino-5-Phosphopentansäure, 50 μ M), CNQX (6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion, 10 μ M), Glyzin (10 μ M) und TTX (Tetrodotoxin, 500 nM, Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA) wurden benutzt, wie im Ergebnisteil aufgeführt. Die kalziumfreie Lösung enthielt 4 mM Magnesium und 10 μ M EGTA (Ethyleneglycol-bis-(β -Aminoethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid). Die Lösung mit erhöhtem Kalium enthielt 80 mM KCl und 48 mM NaCl. Für die Versuche in Abb. 15 wurde Strychnin (1 μ M) 1-4 Segmente rostral des Applikationsortes des Agonisten in den Rückenmarkskanal injiziert.

Wenn nicht anderweitig beschrieben, stammten alle Pharmaka von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany).

3. Ergebnisse

3.1 GABA-vermittelte Kalziumsignalgebung in Purkinjezellen des Kleinhirns der Ratte während der frühen postnatalen Entwicklung

3.1.1 GABA_A Rezeptor vermittelte Kalziumsignale in unreifen Purkinjezellen

Zur Untersuchung der GABA-vermittelten Kalziumsignalgebung in intakten Purkinjezellen des Kleinhirns wurde der membranpermeable Kalziumindikatorfarbstoff fura-2 AM in Verbindung mit der Zwei-Photonen Mikroskopie (Denk et al., 1990) verwendet. Im Anschluss an das Beladen mit fura-2 AM war es möglich, Purkinjezellen unter der Oberfläche der Kleinhirngewebeschnitte von neugeborenen und juvenilen Ratten auszumachen (Abb. 1A-C, F). Obwohl in unreifen Purkinjezellen der für diesen Zelltyp typische Dendritenbaum noch nicht entwickelt ist (Abb. 1C), konnten diese Zellen anhand ihrer Größe, der charakteristischen Lage zwischen innerer Körnerzellschicht und Molekularschicht und anhand ihrer Form identifiziert werden (Altman & Bayer, 1996). Durch die Anwendung der Zwei-Photonen Mikroskopie und der damit verbundenen räumlichen Auflösung konnte sichergestellt werden, dass ausschließlich Fluoreszenzsignale der zu untersuchenden Neurone und nicht solche von benachbarten, in einer anderen Fokusebene liegenden Zellen gemessen wurden.

Interessanterweise zeigte sich insbesondere das Zytosol von Purkinjezellen in unreifem Gewebe weniger stark mit dem Fluoreszenzfarbstoff fura-2 AM beladen als andere Zelltypen des Kleinhirns wie beispielsweise Körnerzellen (Abb. 1B, C).

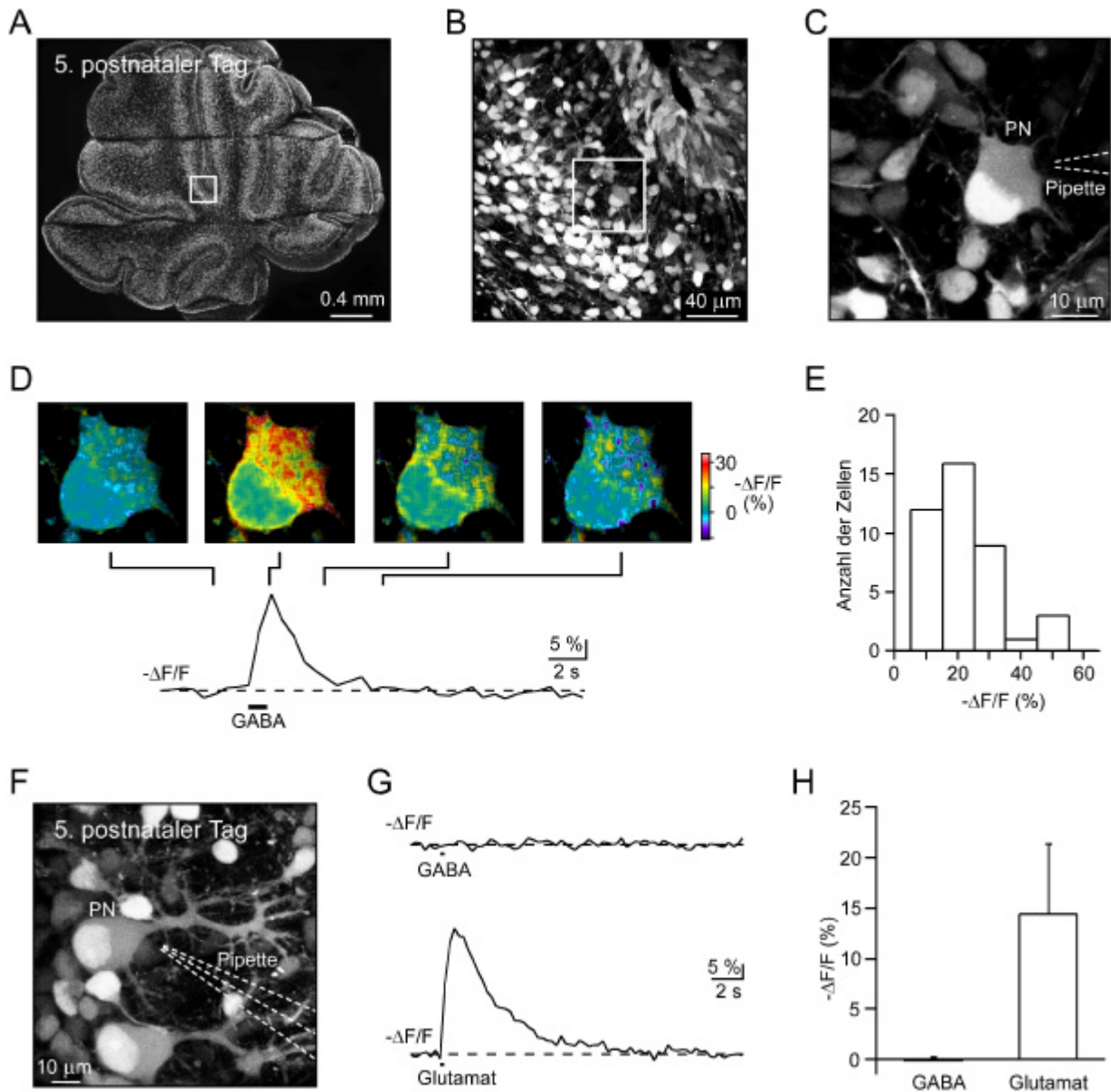


Abb. 1. GABA-vermittelte Kalziumsignale in unreifen Purkinjezellen.

A-C, Zwei-Photonen Fluoreszenzbilder eines Kleinhirnschnittes einer 5 Tage alten Ratte (P5), der mit dem Kalziumindikatorfarbstoff fura-2 AM beladen wurde. Die Bilder wurden aufgenommen unter zunehmender Vergrößerung (2.5x, 10x, 60x Objektiv in A-C) in jeweils der Region, die in A und B mit Rechtecken markiert ist. Der Schnitt wurde fixiert mit dünnen Nylonfäden, die die drei in A sichtbaren

horizontalen Einkerbungen verursachen. In C ist eine einzelne Purkinjenzelle (PN) gezeigt. Die Position der für die Druckapplikation von GABA benutzten Pipette ist markiert. Die helle Struktur innerhalb des Zellkörpers der Purkinjenzelle entspricht dem Nukleus, der sich in diesem Entwicklungsstadium typischerweise vergrößert und aufgebläht darstellt. D, kurze Applikationen von 100 μM GABA riefen eine transiente Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hervor. Oben: Farbkodierte Bilder der Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$; Unten: zeitlicher Verlauf des Transienten aufgenommen in der Region, die im linken oberen Bild skizziert ist. E, Säulendiagramm zur Darstellung der Amplituden der Fluoreszenzsignale, die durch GABA und den GABA_A -Rezeptor-Agonisten Muscimol hervorgerufen wurden. F, Fluoreszenzbild einer Purkinjenzelle (PN) einer 9 Tage alten Ratte. Die Position der doppeläufigen Pipette, die für die Druckapplikation von GABA und Glutamat verwendet wurde, ist rechts dargestellt. G, kurze Applikationen von GABA riefen keine Kalziumsignale hervor, während aus der Applikation von Glutamat (100 μM) ein deutliches Kalziumsignal resultierte. H, Säulendiagramm, dass die Ergebnisse fünf solcher Versuche darstellt.

Durch kurze räumlich begrenzte Applikationen von GABA (100 μM , 100-1000 ms) aus einer Glaspipette wurden in unreifen Purkinjenzellen transiente Erhöhungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hervorgerufen (Abb. 1D). Die Anstiegszeit dieser Kalziumsignale korrelierte eng mit der Dauer der GABA-Applikationen. Der Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verlief exponentiell mit einer Abfallszeitkonstante von 2-4 Sekunden. Repetitive Stimulationen riefen Kalziumsignale hervor, die sowohl eine konstante Amplitude als auch eine konstante Kinetik besaßen, wenn zwischen zwei Applikationen mindestens ein Zeitintervall von zwei Minuten lag. Eine GABA-Rezeptor-Aktivierung rief zuverlässig Kalziumsignale in Purkinjenzellen von drei bis sechs Tage alten Ratten hervor. Obwohl die Amplituden der GABA-vermittelten Kalziumsignale von vielfältigen Faktoren, wie der relativen Position der Pipettenspitzen und den Parametern der Applikation beeinflusst wurden, überstiegen die meisten Signale eine Amplitude von 5% $-\Delta F/F$ und hoben sich deutlich hervor gegenüber dem intrinsischen Rauschen der Fluoreszenzmessungen (Abb. 1E).

Wegen der spektralen Eigenschaften von fura-2 unter Zwei-Photonen Anregung (Xu et al., 1996) war es nicht möglich, durch ratiometrische Messungen

die $[Ca^{2+}]_i$ zu quantifizieren, wie dies bei der Ein-Photonen Anregung möglich ist. Nichtsdestotrotz war es möglich, unter Zuhilfenahme der *in vitro* ermittelten Kalziumsensitivität von fura-2 (Grynkiewicz et al., 1985; Xu et al., 1996) zu kalkulieren, dass die größten Kalziumsignale ($> 50\% \Delta F/F$, Abb. 1E) Konzentrationen im mikromolaren Bereich und kleine Signale Konzentrationsmaxima im Bereich mehrerer hundert nM erreichten.

Nur wenige Tage später in der Entwicklung rief GABA keine Kalziumsignale mehr hervor. In den Abb. 1F und G ist ein repräsentatives Experiment in einem Kleinhirngewebeschnitt einer 9 Tage alten Ratte dargestellt. In diesen Versuchen wurden doppeläufige Applikationspipetten benutzt, um wechselweise GABA oder Glutamat (100 μ M) zu applizieren. Letzteres diente als funktionelle Kontrolle der Unversehrtheit der untersuchten Zelle. Während Glutamatapplikationen in allen untersuchten Purkinjezellen Kalziumsignale hervorriefen, war es nicht möglich, durch die Applikation von GABA messbare Kalziumsignale in Kleinhirngewebeschnitten von Tieren zu evozieren, die älter als 7 Tage waren (Abb. 1G und H).

3.1.2 Mechanismen, die GABA-vermittelten Kalziumsignalen zugrunde liegen

Der spezifische $GABA_A$ -Rezeptor-Agonist Muscimol (Bowery et al., 1983) rief in gleicher Weise Kalziumsignale hervor wie GABA ohne einen offensichtlichen Unterschied der Kinetik (vgl. Abb. 2B und E). Des weiteren blockierte der kompetitive spezifische $GABA_A$ -Rezeptor-Antagonist Bicucullin reversibel GABA-vermittelte Kalziumsignale (durchschnittliche Verminderung der initialen Amplitude von $92 \pm 8\%$, $n = 5$ Zellen, Abb. 2A-C). Folglich ist die GABA-vermittelte Kalziumsignalgebung in Purkinjezellen abhängig von einer $GABA_A$ -Rezeptor-Aktivierung.

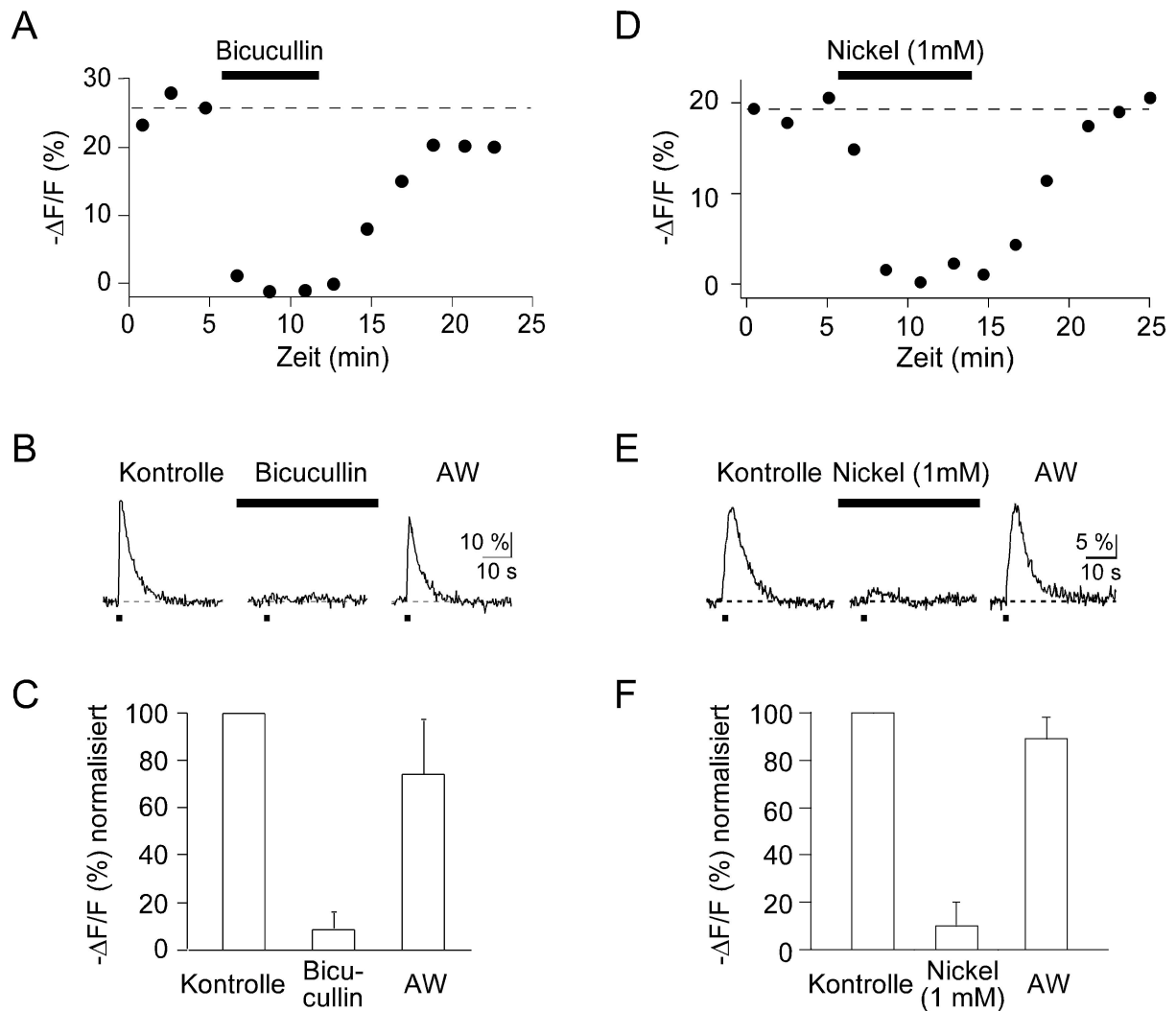


Abb. 2. Pharmakologische Eigenschaften GABA-vermittelter Kalziumsignale.

A, Graphische Darstellung der Amplituden der Kalziumantworten in einer unreifen Purkinjezelle (P3) während sukzessiver GABA-Applikationen (100 μ M). Die Signale wurden reversibel blockiert durch die Badapplikation des GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Bicucullin (100 μ M). Die gestrichelte Linie entspricht der durchschnittlichen Amplitude der Antworten während der Kontrollmessungen. AW, nach dem Auswaschen. B, Kalziumsignale (drei gemittelt) gemessen vor, während und nach der Applikation von Bicucullin (gleiches Experiment wie in A). Die Balken zeigen den Zeitpunkt der Applikation des Agonisten an. C, Zusammenfassung des Effektes von Bicucullin auf GABA-vermittelte Kalziumsignale im Säulendiagramm (n = 5 Zellen, P3-6). D und E, Durch Muscimol (100 μ M) hervorgerufene Kalziumsignale wurden reversibel blockiert durch die Badapplikation von 1 mM Ni²⁺. Ein charakteristisches Experiment von einer 3 Tage alten Ratte. F, Zusammenfassung des Effektes von Ni²⁺ auf Muscimol-vermittelte Kalziumsignale im Säulendiagramm (n = 5 Zellen, P3-6). AW, nach dem Auswaschen.

Als nächstes wurde untersucht, ob durch eine GABAerge Stimulation auch spannungsabhängige Kalziumkanäle aktiviert werden und ob deren Aktivierung den untersuchten Kalziumsignalen zugrunde liegt. Abb. 2D und E zeigen ein repräsentatives Experiment, in dem der Antagonist spannungsabhängiger Kalziumkanäle Nickel (1 mM) reversibel durch den GABA_A-Rezeptor-Agonisten Muscimol evozierte Kalziumsignale blockierte. Nickel verursachte im Durchschnitt eine Reduktion von $90\pm 10\%$ der GABA-vermittelten Kalziumsignale ($n = 5$ Zellen, Abb. 2F).

3.1.3 *Perforated-patch* Messungen von GABA-vermittelten Strömen

In der nächsten Reihe von Experimenten wurden *whole-cell* Messungen an Purkinjezellen durchgeführt, um die Änderungen des Antwortverhaltens auf GABA während der Entwicklung zu quantifizieren. Mit der Absicht, die $[Cl^-]_i$ während der Messungen nicht zu verändern, wurde die *perforated-patch* Technik mit Gramicidin D als Ionophore angewendet (Abb. 3A; (Rhee et al., 1994)). Die Abbildung 3B zeigt den zeitlichen Verlauf der Perforation eines *patches*. Wie bei einer konventionellen *whole-cell* Messung ging die Perforation einher mit einem Anstieg des Leckstromes und einem Anstieg der Amplitude des durch den Test-Spannungspuls hervorgerufenen Stromes. Durch die Maxima dieser Stromsignale wurde der zelluläre Eingangswiderstand R_S bestimmt. In dem Experiment, das in der Abb. 3B dargestellt ist, erreichte R_S einen stabilen Wert von ungefähr 20 M Ω 35 Minuten nach Etablieren eines *seals*. In allen erfolgreich vollzogenen *perforated-patch* Versuchen erreichte R_S in dieser Plateauphase Werte zwischen 10 und 25 M Ω .

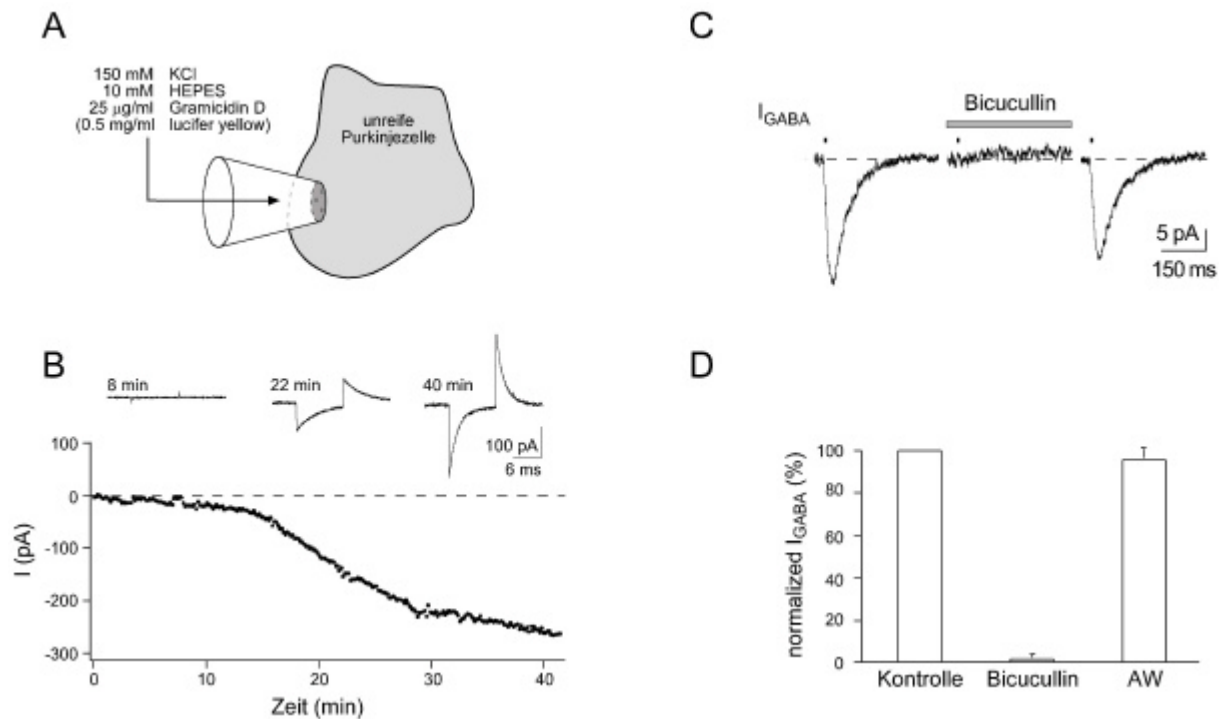


Abb. 3. Perforated-patch Messungen mit Gramicidin.

A, Schematische Darstellung der experimentellen Anordnung; Die Zusammensetzung der Pipettenlösung ist gegeben. B, Amplitude des transienten Stromes beim Beginn der Membranhyperpolarisation (die umgekehrt proportional zum seriellen Widerstand ist) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Ausbildung des *gigaseal*. Charakteristische Kurven sind oben gezeigt. C, kurze Applikationen von 10 μM GABA auf den Zellkörper rief Stromantworten in allen untersuchten Purkinjezellen unabhängig vom Alter hervor. Kleine Balken zeigen den Zeitpunkt der GABA-Applikation an. Die Stromantworten stellen den Durchschnitt von fünf Antworten dar, die in einer Purkinjezelle einer 7 Tage alten Ratte gemessen wurden. Die Stromantworten wurden reversibel blockiert durch Bicucullin (10 μM). D, Zusammenfassung des Effektes von Bicucullin auf I_{GABA} im Säulendiagramm ($98 \pm 2\%$ Hemmung, Mittelwert \pm Standardfehler, P7-8). AW, nach dem Auswaschen.

Unter diesen Versuchsbedingungen riefen kurze GABA-Applikationen (10 μM , 5-20 ms) auf Purkinjezellsomata einwärts gerichtete Stromantworten hervor, wie in Abb. 3C gezeigt. In diesen Versuchen wurden in Abhängigkeit vom Alter der Tiere und vom Haltepotential der Zelle Einwärts- oder Auswärtsströme beobachtet (siehe unten). Die GABA-vermittelten Ströme wurden reversibel blockiert durch Bicucullin (10 μM , $98 \pm 2\%$ Reduktion, $n = 5$ Zellen, Abb. 3C und D). Wie in vorangegangenen

Veröffentlichungen (Sorimachi et al., 1991; Vigot & Batini, 1997) konnten keine GABA_B Rezeptor-vermittelten Antworten gemessen werden, die erwartungsgemäß langsame auswärtsgerichtete Ströme sein sollten.

3.1.4 Entwicklungsbedingte Verschiebung des GABA-Gleichgewichtspotentials in Purkinjezellen

Die Spannungsabhängigkeit GABA-vermittelter Antworten wurde untersucht in 45 Purkinjezellen von Ratten in einem Altersbereich von 2-22 Tagen nach der Geburt. Kurzzeitige GABA-Applikationen auf Purkinjezellsomata riefen Ströme hervor, die in allen untersuchten Altersstufen einen ähnlichen zeitlichen Verlauf hatten. Bei einem Haltepotential nahe dem Ruhemembranpotential (-60 bis -65 mV) wurden früh in der ersten postnatalen Woche große, einwärts gerichtete Ströme beobachtet (zum Beispiel bei P3; Abb. 4A). Im Gegensatz dazu waren die Ströme bei diesem Haltepotential nach der ersten postnatalen Woche auswärts gerichtet (zum Beispiel bei P8; Abb. 4B). Das GABA-Gleichgewichtspotential wurde ermittelt durch GABA-Applikationen auf Purkinjezellen, während diese bei verschiedenen Spannungen gehalten worden waren. In Abb. 4A-D sind Beispiele von zwei Versuchen gezeigt, in denen das GABA-Gleichgewichtspotential bei P3 -44 mV und bei P8 -70mV betrug. Aus Abb. 4E geht hervor, dass das GABA-Gleichgewichtspotential während der postnatalen Entwicklung progressiv negativer wird, indem es von ungefähr -40 mV bei 2-3 Tage alten Tieren bis auf -80 mV bei 9-10 Tage alten Tieren und auf -85 mV bei über 12 Tage alten Tieren abfällt. Diese Daten konnten mit einer sigmoidalen Näherungsfunktion beschrieben werden, in der man von Werten für das GABA-Gleichgewichtspotential von -33 mV bei der Geburt und -87 mV nach dem 15.

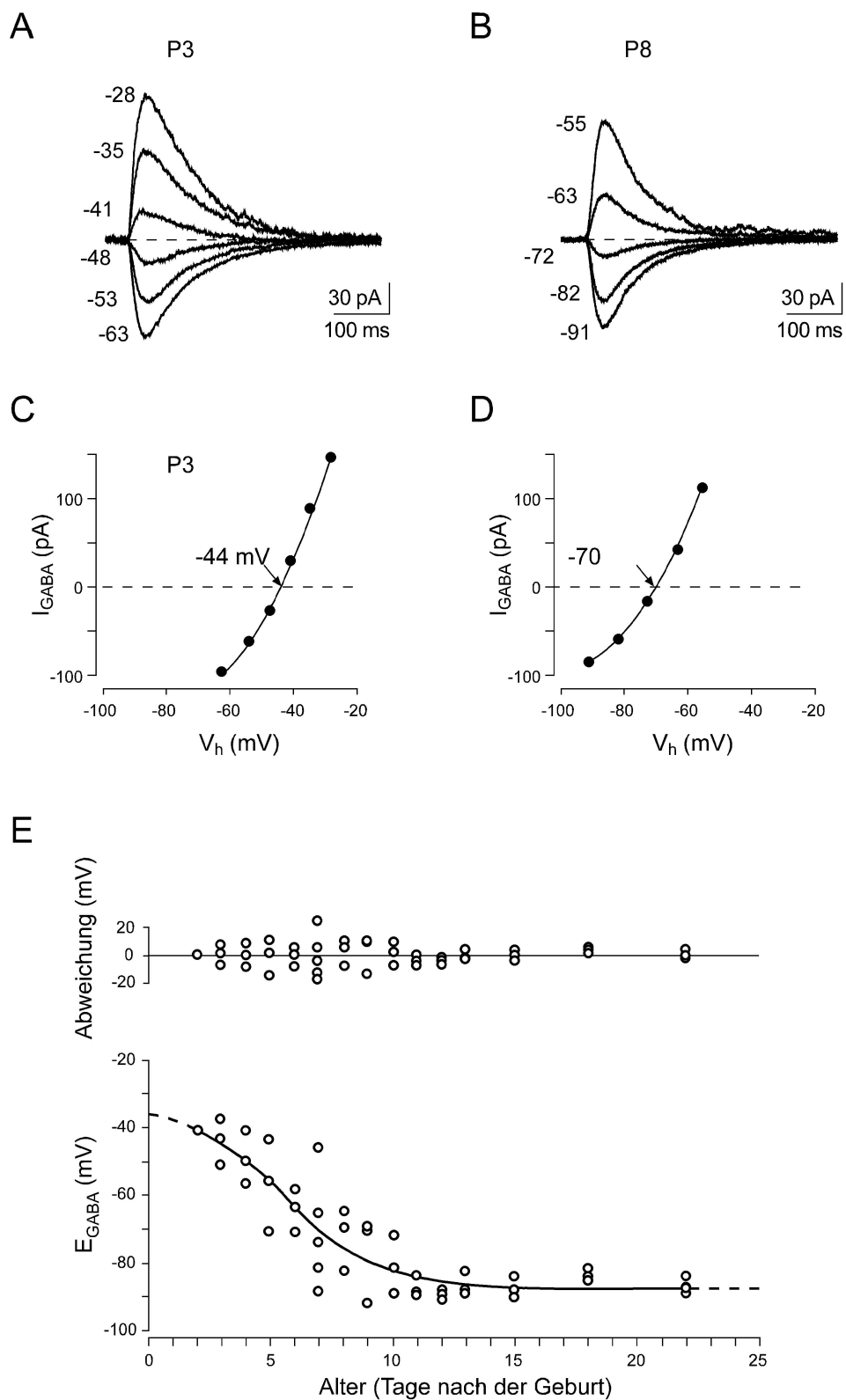


Abb.

4. Entwicklungsabhängige Veränderung des Umkehrpotentials GABA-vermittelter Ströme (E_{GABA}).

A und B, Antworten nach einer 5 ms langen GABA-Applikation (10 μ M) auf den Zellkörper einer Purkinjzelle einer 3 und einer 8 Tage alten Ratte, die an dem Membranpotential gehalten wurde, dass links der Kurven angezeigt ist. C und D, Strom-Spannungs-Abhängigkeit, ermittelt aus den Strommaxima während der Antworten in A und B. E_{GABA} wurde ermittelt anhand des Abszissenschnittpunktes einer polynomialen Näherungsgleichung der Datenpunkte. E, Unterer Teil, E_{GABA} in Abhängigkeit vom Alter. Jeder Datenpunkt entspricht einer Zelle. Die durchgezogene Linie stellt eine sigmoidale Näherungsfunktion der Datenpunkte dar. Die gestrichelte Linie stellt die Näherungsfunktion dar, die bis P0 und P25 (Details im Text) verlängert wurde. Oberer Teil, Darstellung der Differenzwerte der einzelnen Datenpunkte von der Näherungsfunktion. Es ist zu bemerken, dass die Differenzwerte einer Zufallsverteilung entsprechen, was bedeutet, dass die Näherungsfunktion genau die Datenpunkte beschreibt.

Lebenstag ausgeht. Diese Näherungsfunktion hatte ihre größte Steigung mit -7 mV/Tag bei P5.6. Die Darstellung der Abweichungswerte (oberer Graph; Abb. 4E) zeigt die Genauigkeit, mit der die Sigmoidalfunktion die Datenpunkte beschreibt.

3.2 GABA_A-Rezeptor-vermittelte Kalziumsignalgebung in migrierenden Neuronen des ZNS.

3.2.1 GABA_A-Rezeptor-vermittelte Kalziumantworten in unreifen Körnerzellen des Kleinhirns

Die Anwendung der Zwei-Photonen Kalziummessung diente dem Untersuchung der funktionellen Eigenschaften von Körnerzellen des sich entwickelnden Kleinhirns der Ratte. Abb. 5 zeigt einen Kleinhirngewebeschnitt einer 8 Tage alten Ratte, in der die Zellen mit dem membranpermeablen Kalziumindikatorfarbstoff fura-2 AM beladen wurden. Bei einer ausreichenden Vergrößerung konnten die Schichten der Kleinhirnrinde mit ihren typischen Zellen identifiziert werden (Abb. 5B und C). Unter der Pia Mater ist die mitotische Zone der äußeren Körnerzellschicht (EGL) gekennzeichnet durch konfluierende dicht gepackte proliferierende Zellen (Altman, 1972). Im Gegensatz dazu sind die Körnerzellen der differenzierenden Zone der äußeren Körnerzellschicht klar voneinander zu unterscheiden. Die migrierenden Zellen der benachbarten Molekularschicht (ML) sind charakterisiert durch eine spindelförmige Morphologie mit einer Ausrichtung parallel zu den vertikalen Fortsätzen der Bergmann Gliazellen, von denen angenommen wird, dass sie den Migrationsweg der Körnerzellen vorgeben (Komuro & Rakic, 1995). Nach dem Durchwandern der Purkinjzellschicht (PL) gelangen die Körnerzellen in ihre Zielregion, die sogenannte innere Körnerzellschicht (IGL). Diese wird dominiert von postmigratorischen runden Körnerzellen mit einem Durchmesser von 5-10 μm , die kleine Fortsätze aussenden (Altman, 1972).

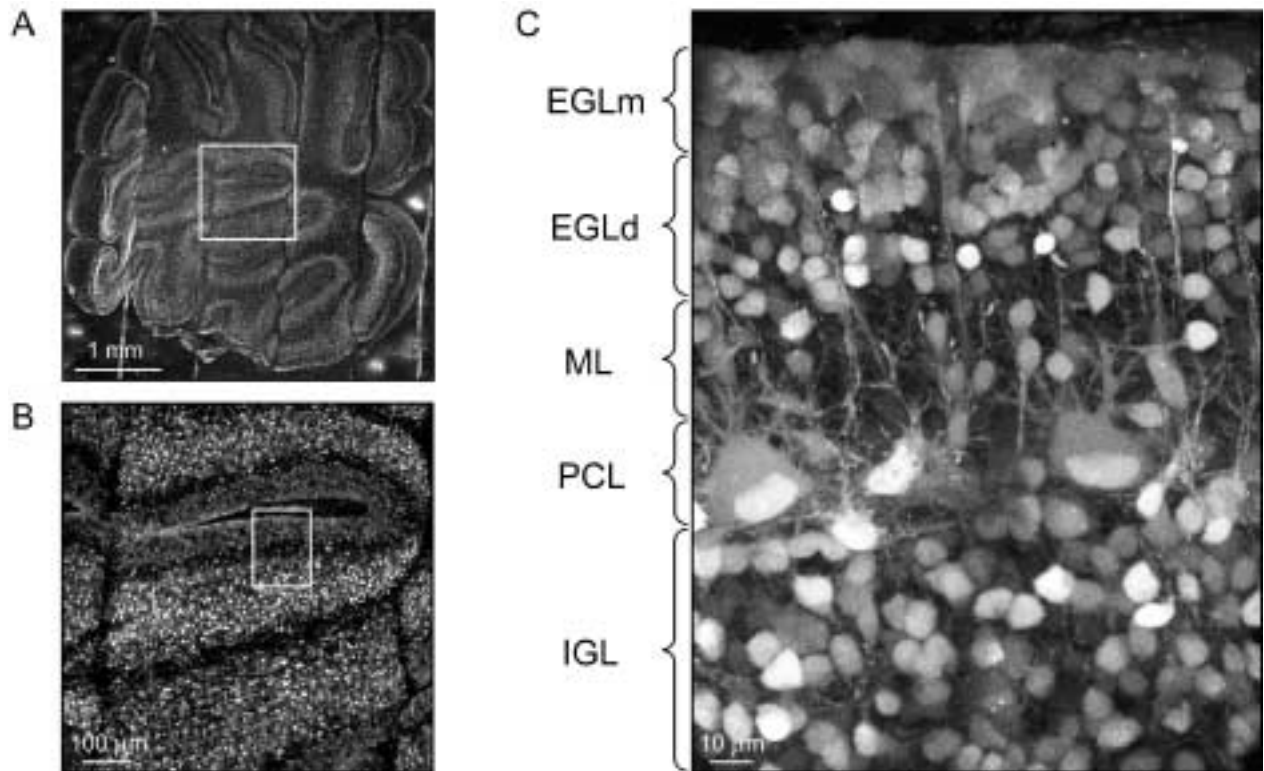


Abb. 5. Morphologie der Kleinhirnrinde während der frühen postnatalen Entwicklung

A-C, Zwei-Photonen Fluoreszenzbilder eines Kleinhirnschnittes einer 8 Tage alten Ratte, der mit dem Kalziumindikatorfarbstoff fura-2 AM beladen wurde. Die Bilder wurden aufgenommen unter zunehmender Vergrößerung (2.5x, 10x, 60x Objektiv in A-C) in jeweils der Region, die in A und B mit Rechtecken markiert ist. Der Schnitt wurde fixiert mit dünnen Nylonfäden, die die in A sichtbaren vertikalen Einkerbungen verursachen. In C sind Körnerzellen innerhalb der unterschiedlichen Schichten des Kleinhirnkortex deutlich zu erkennen anhand ihrer morphologischen Eigenschaften (detaillierte Beschreibung im Text). *EGLm*, äußere Körnerzellschicht – mitotische Zone; *EGLd*, äußere Körnerzellschicht – differenzierende Zone, *ML*, Molekularschicht; *PCL*, Purkinjzellschicht; *IGL*, innere Körnerzellschicht.

Um die Rolle von GABA-vermittelter Kalziumsignalgebung während der Entwicklung und insbesondere während der Migration von Nervenzellen zu untersuchen, wurde GABA auf Körnerzellen appliziert, die mit dem Kalziumfarbstoff fura-2 AM beladen worden sind. In Abb. 2 ist eine migrierende Körnerzelle in der Molekularschicht der Kleinhirnrinde einer 13 Tage alten Ratte identifiziert worden.

Eine sich wiederholende lokale Druckapplikation von GABA aus einer Pipette erzeugte große transiente Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$.

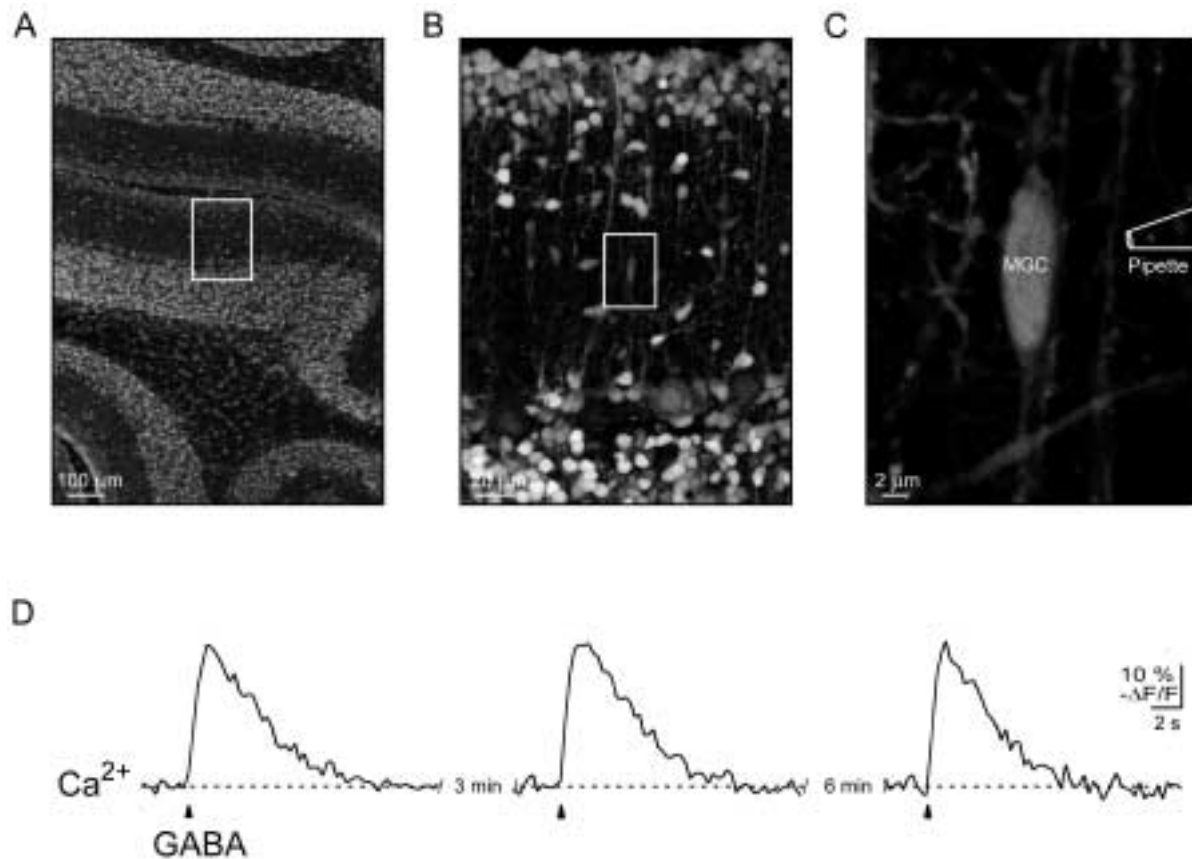


Abb. 6. GABA-vermittelte Kalziumsignale in unreifen Körnerzellen.

A-C, Zwei-Photonen Fluoreszenzbilder einer migrierenden Körnerzelle (MGC) in der Molekularschicht des Kleinhirnkortex einer 13 Tage alten Ratte. In C ist die Stellung der Applikationspipette eingezeichnet. D, eine kurze und räumlich begrenzte GABA-Druckapplikation (Pfeil, 200 ms, 1 mM) rief robuste reproduzierbare Kalziumsignale hervor (2-3 Minuten zwischen sukzessiven Applikationen).

Diese transienten Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ wurden in gleicher Weise hervorgerufen durch den GABA_A-Rezeptor-Agonisten Muscimol. Außerdem konnten die GABA-vermittelten transienten Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ durch den GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Bicucullin blockiert werden (Abb. 7).

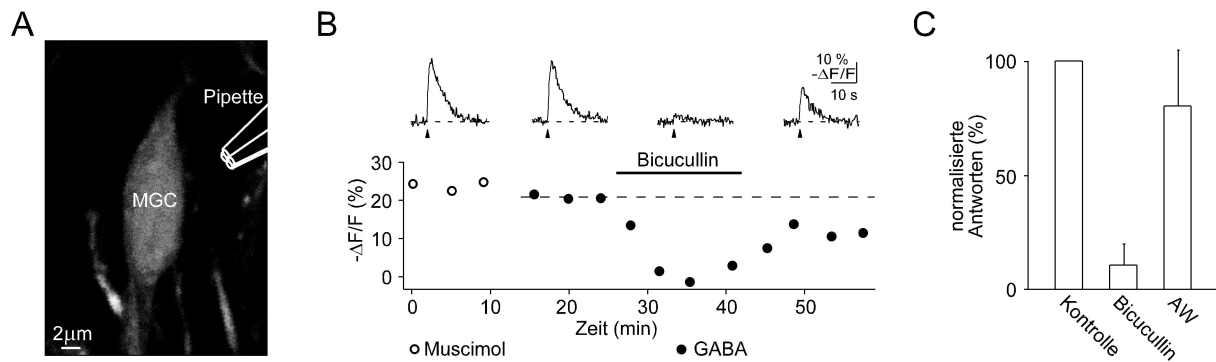


Abb. 7. GABA triggert Kalziumantworten durch die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren.

A, migrierende Kleinhirnkörnerzelle (MGC) einer 13 Tage alten Ratte. Die Position der vierläufigen Applikationspipette ist rechts dargestellt. B, unten, graphische Darstellung der Amplituden der durch Muscimol (100 μM, offene Kreise) und GABA (1 mM, gefüllte Kreise) evozierten Kalziumtransienten. Der GABA_A-Rezeptor-Antagonist Bicucullin (100 μM) blockierte reversibel GABA-vermittelte Antworten. Die gestrichelte Linie entspricht der durchschnittlichen Amplitude der Antworten während der Kontrollmessungen. Oben, der unteren Darstellung zugrundeliegende Kalziumtransienten (jeweils drei gemittelt). C, Zusammenfassung des Effektes von Bicucullin auf GABA-vermittelte Kalziumsignale im Säulendiagramm (n = 8 Zellen, P10-15). AW, nach dem Auswaschen.

3.2.2 Altersprofil der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Kalziumsignalgebung

Um die Abhängigkeit des neuronalen Entwicklungsstadiums vom Vorhandensein GABA_A-Rezeptor-vermittelter Kalziumsignalgebung zu bestimmen wurde Muscimol auf Körnerzellen in allen Schichten der Kleinhirnrinde in Gewebeschnitten von 2-32 Tage alten Tieren appliziert.

Abb. 8 zeigt einen Versuch, in dem Muscimol Kalziumantworten hervorrief sowohl in unreifen Zellen der äußeren Körnerzellschicht (EGL), als auch in einer migrierenden Körnerzelle der Molekularschicht (ML).

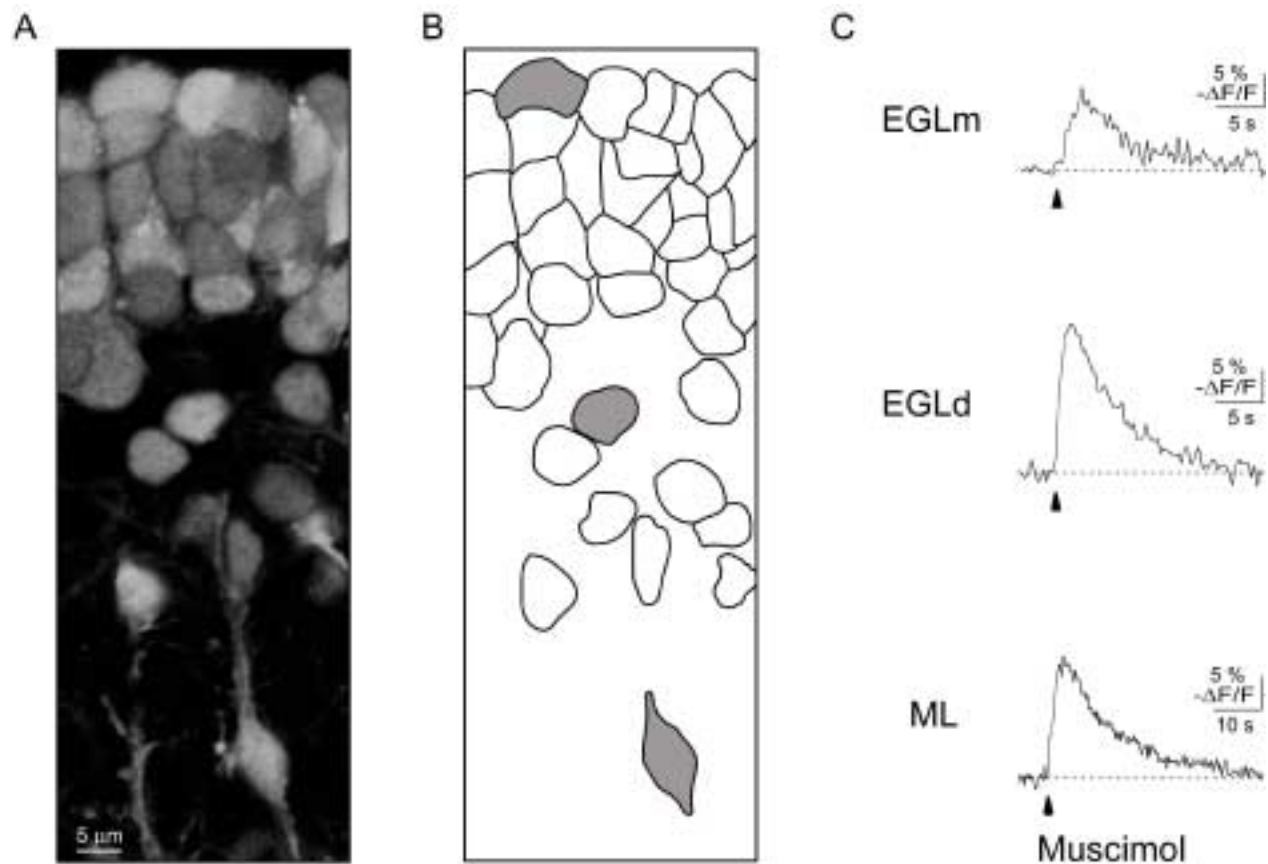


Abb. 8 GABA_A-Rezeptor-vermittelte Kalziumtransienten in prä-migratorischen und in migrierenden Kleinhirnkörnerzellen.

A, Zwei-Photonen Fluoreszenzbild der mitotischen und der differenzierenden Zone der äußeren Körnerzellschicht (*EGLm* und *EGLd*) und der Molekularschicht (*ML*) in der Kleinhirnrinde einer 8 Tage alten Ratte. B, Schematische Darstellung der in A gezeigten Zellen. C, Muscimol (100 μ M) rief Kalziumsignale in allen in B grau markierten unreifen Körnerzellen hervor.

Auch in der inneren Körnerzellschicht wurden GABA_A-Rezeptor-vermittelte Kalziumsignale beobachtet, die allerdings nicht in jeder Zelle ausgelöst werden konnten. Dies wird verdeutlicht durch das in Abb. 9 gezeigte Beispiel. In einem Gewebeschnitt einer 14 Tage alten Ratte rief Muscimol in einer postmigratorischen Körnerzelle eine Kalziumantwort hervor, während die $[Ca^{2+}]_i$ in der benachbarten Zelle sistierte (Abb. 9D).

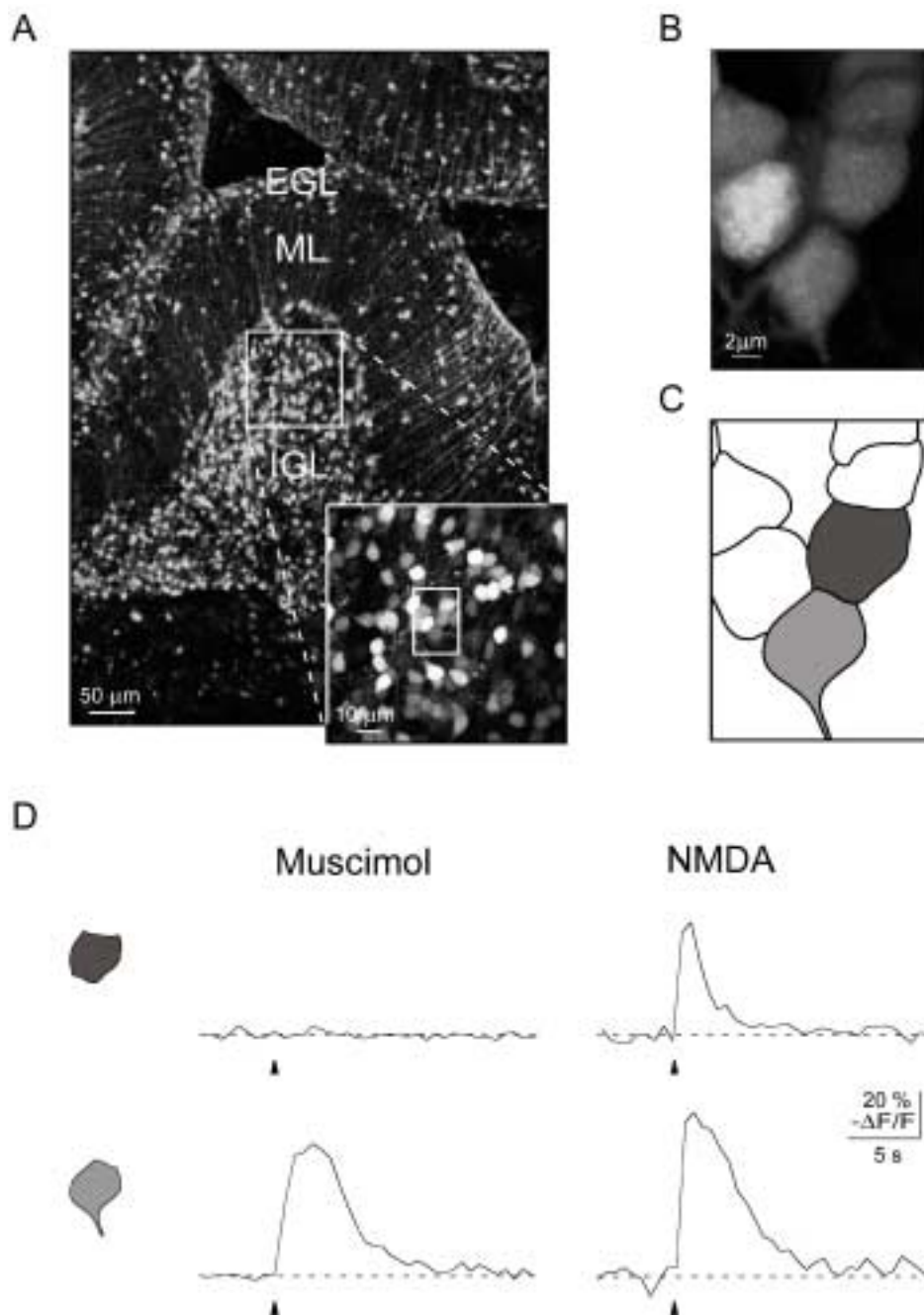


Abb. 9. GABA-Antwortverhalten in der inneren Körnerzellschicht.

A, Kleinhirnkortex einer 13 Tage alten Ratte. Die markierte Region in der inneren Körnerzellschicht ist rechts unten vergrößert gezeigt. Innerhalb dieser Darstellung zeigt ein Rechteck die Region, die in B mit hoher Auflösung und in C schematisch dargestellt ist. C, die grau markierten Zellen wurden pharmakologisch untersucht. D, Die obere Zelle (dunkleres grau) zeigte auf Muscimol (100 μM) keine Antwort aber eine deutliche Antwort auf NMDA (50 μM). Die untere Zelle (helles grau) antwortete auf beide Stimuli.

Als Kontrolle der Intaktheit der untersuchten Zelle dienten NMDA-evozierte Kalziumsignale. Da Kleinhirnkörnerzellen schon in frühen Entwicklungsstadien funktionelle NMDA-Rezeptoren exprimieren (Rossi & Slater, 1993; Farrant et al., 1994), dienten NMDA-Rezeptor-vermittelte Kalziumantworten als Vitalitätskontrolle in Körnerzellen. Dies wird gezeigt in Abb. 9D, in der beide Zellen NMDA-vermittelte Kalziumantworten zeigen.

Mit diesem Ansatz wurde das zelluläre Antwortverhalten auf eine GABA_A-Rezeptor-Aktivierung in den aufeinanderfolgenden Stadien der Körnerzellentwicklung in der Ratte untersucht. Nahezu alle Zellen (80-90%) der mitotischen Zone der äußeren Körnerzellschicht zeigten GABA-vermittelte Kalziumantworten bis zur dritten Lebenswoche, dem Zeitpunkt, zu dem diese Schicht verschwindet. In gleicher Weise stellte sich das Antwortverhalten in der differenzierenden Zone der äußeren Körnerzellschicht dar, in der während der ersten vier Lebenswochen zwischen 89 und 100% der Körnerzellen GABA-vermittelte Kalziumantworten zeigten. Zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung konnten auch in dieser Schicht keine Zellen mehr identifiziert werden.

Während der Phase der Migration zeigten Körnerzellen ein absolut einheitliches Antwortverhalten auf eine GABA_A-Rezeptor-Aktivierung. Vom zweiten bis zum 23. Tag nach der Geburt, dem letzten Zeitpunkt in der Entwicklung, zu dem migrierende Körnerzellen in der Kleinhirnrinde identifiziert werden konnten, evozierte Muscimol Kalziumsignale. Im Gegensatz dazu veränderten postmigratorische Körnerzellen ihr Antwortverhalten während der Entwicklung. Während in den ersten beiden Lebenswochen nahezu alle postmigratorischen Körnerzellen (94 und 93%) GABA_A-Rezeptor vermittelte Kalziumsignale zeigten, reduzierte sich dieser Anteil auf 46% in der dritten, 32% in der vierten und 5% in der fünften Lebenswoche (Abb. 10).

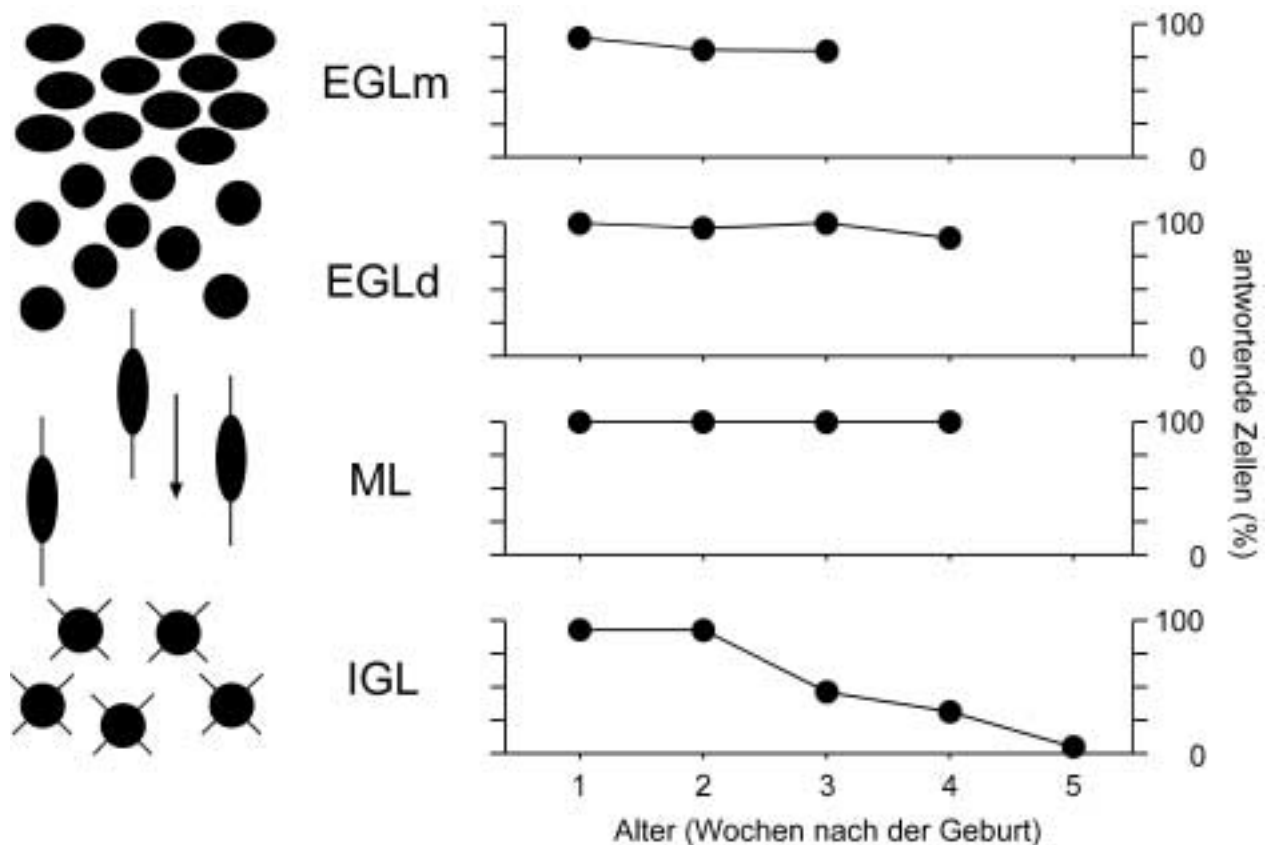


Abb. 10. Entwicklungsprofil des GABA-Antwortverhaltens in Kleinhirnkörnerzellen.

Links, schematische Darstellung der aufeinanderfolgenden Phasen der Körnerzellentwicklung. Rechts, graphische Darstellung des Anteils der Körnerzellen, die in den verschiedenen Entwicklungsphasen GABA-vermittelte Kalziumsignale zeigen. Nach 3-4 Wochen sind alle Zellen der äußeren Körnerzellschicht in die innere Körnerzellschicht migriert. Aus diesem Grunde bestehen Datenpunkte für die äußere Körnerzellschicht und die Molekularschicht nur für die ersten drei bis vier Wochen. *EGLm*, äußere Körnerzellschicht - mitotische Zone; *EGLd*, äußere Körnerzellschicht - differenzierende Zone, *ML*, Molekularschicht; *PCL*, Purkinjezellschicht; *IGL*, innere Körnerzellschicht.

3.2.3 Mechanismus der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Kalziumsignalgebung

Bisher veröffentlichte Arbeiten über GABA_A-Rezeptor-vermittelte Kalziumsignale ergaben Evidenzen für eine Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle infolge einer Membrandepolarisation. Um die Beteiligung spannungsabhängiger Kalziumkanäle an GABA_A-Rezeptor-vermittelten Kalziumsignalen zu untersuchen, wurde deren Funktion pharmakologisch blockiert. Wie das in Abb. 11B dargestellte Experiment an einer migrierenden Körnerzelle (Abb. 11A) zeigt, blockiert die Zugabe von 1 mM Nickel, eines Inhibitors spannungsabhängiger Kalziumkanäle, GABA_A-Rezeptor-vermittelte Kalziumsignale in Körnerzellen reversibel (Abb. 11C). Wurden Körnerzellen durch die Druckapplikation einer Lösung, die 80 mM KCl enthielt, depolarisiert zeigten sich ähnliche Kalziumsignale, die auch durch 1 mM Nickel blockiert werden konnten (Abb. 11D).

Sollte den GABA_A-Rezeptor-vermittelten Kalziumsignalen ein Kalziumeinstrom durch spannungsaktivierte Kalziumsignale zugrunde liegen, müssten beim Fehlen extrazellulären Kalziums diese Signale verschwinden. Ein solches Experiment, in dem in Körnerzellen durch eine kalziumfreie, den Kalziumpuffer EGTA enthaltende Lösung GABA-vermittelte Kalziumsignale verschwinden, ist gezeigt in Abb. 11E-G.

Da durch Depolarisationen in Nervenzellen neben spannungsabhängigen Kalziumkanälen vor allem spannungsabhängige Natriumkanäle aktiviert werden, stellt sich die Frage, ob deren Aktivierung eine zusätzliche Signalverstärkung mit sich bringt. Um dies zu testen, wurden während einer Serie repetitiver Muscimol-Applikationen spannungsabhängige Natriumkanäle blockiert. Die Zugabe von TTX (500 nM) führte zu einer Reduktion der Amplitude der Kalziumsignale auf $73 \pm 20\%$ des Ausgangswertes (Abb. 11H).

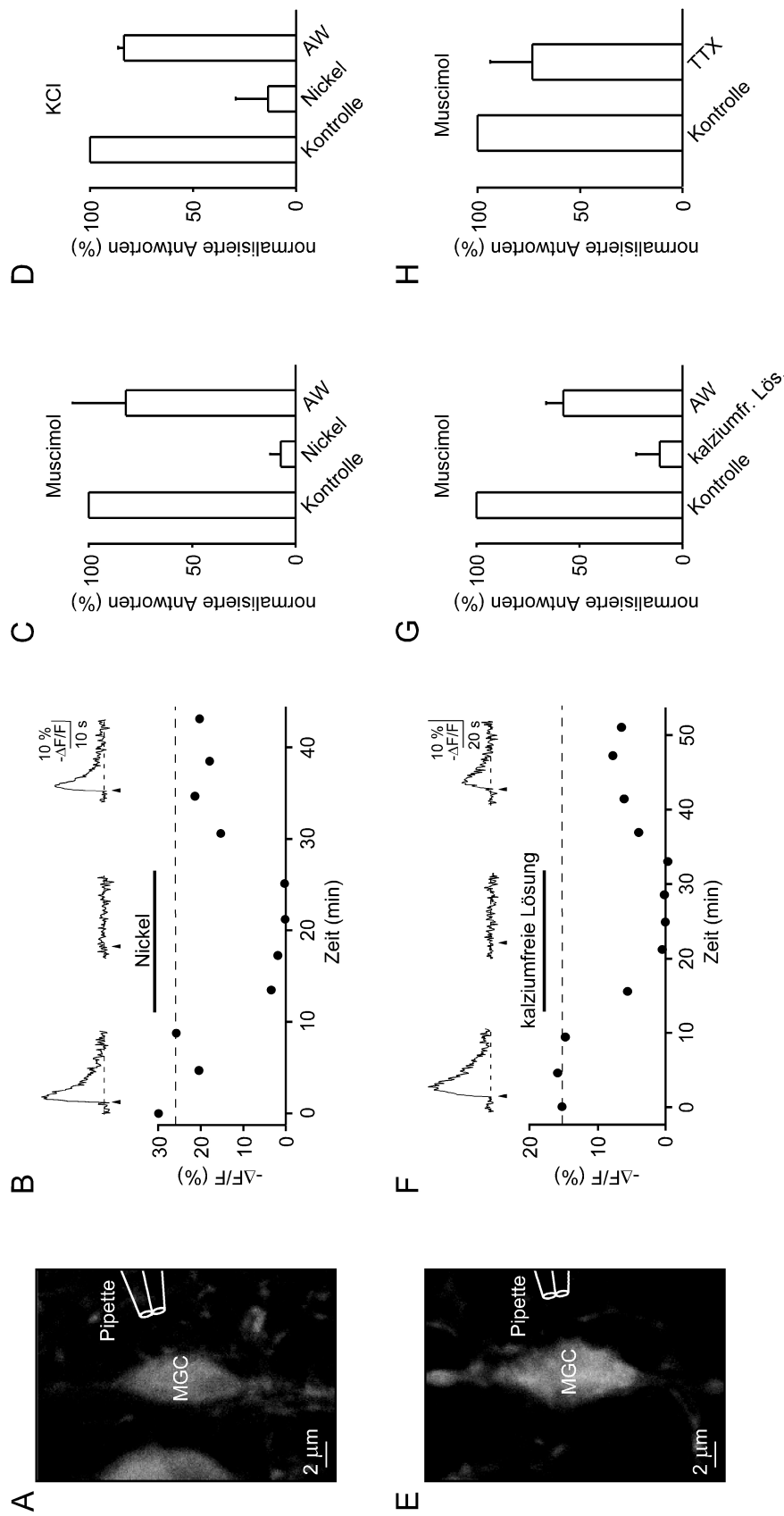


Abb. 11. Mechanismus der GABA-vermittelten Kalziumsignale.

A, Migrierende Kleinhirnkörnerzelle (MGC) einer 15 Tage alten Ratte. Pharmaka wurden appliziert über eine mehrläufige Pipette. B, unten, graphische Darstellung der Amplituden der durch Muscimol (100 μ M) evozierten Kalziumsignale. Nickel (1 mM), ein Inhibitor spannungsgesteuerter Kalziumsignale, blockierte reversibel durch Muscimol hervorgerufene Antworten. Die gestrichelte Linie entspricht der durchschnittlichen Amplitude der Antworten während der Kontrollmessungen. Oben, der unteren Darstellung zugrundeliegende Kalziumtransienten (jeweils drei gemittelt). C, Zusammenfassung des Effektes von Nickel (1 mM) auf Muscimol-vermittelte Kalziumsignale im Säulendiagramm ($n = 6$ Zellen, P9-15). D, Zusammenfassung des Effektes von Nickel (1 mM) auf durch KCl (80 mM) evozierte Kalziumsignale im Säulendiagramm ($n = 5$ Zellen, P13-15). E, migrierende Körnerzelle (MGC) einer 15 Tage alten Ratte. Die Stellung der mehrläufigen Pipette ist rechts eingezeichnet. F, in der in E dargestellten Zelle verschwanden Muscimol-vermittelte Kalziumsignale in einer kalziumfreien Lösung. G, Zusammenfassung des Effektes einer kalziumfreien Lösung auf Muscimol-vermittelte Kalziumsignale im Säulendiagramm ($n = 6$ Zellen, P11-13). H, TTX (500 nM) hatte nur einen kleinen Effekt auf Muscimol-vermittelte Kalziumsignale in migrierenden Körnerzellen. Das Säulendiagramm zeigt die durchschnittliche Amplitude der Muscimol-vermittelten Kalziumsignale vor und während der Applikation von TTX ($n = 7$ Zellen, P15).

3.2.4 Supralineare Verstärkung der Kalziumsignale bei gleichzeitiger Aktivierung von GABA_A- und NMDA-Rezeptoren

Bei einer Studie in einer Kleinhirngewebeschnittkultur haben Komuro und Rakic gezeigt, dass eine Hemmung ionotroper NMDA-Typ Glutamatrezeptoren die Migrationsrate von Körnerzellen reduziert (Komuro & Rakic, 1993). Daraus folgerten sie, dass Glutamat über die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und einer konsekutiven Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ die Migrationsrate steuert.

In den hier gezeigten Versuchen war eine sehr kurze Druckapplikation (80-200 ms) von NMDA auf migrierende und postmigratorische Körnerzellen in den meisten Fällen nicht ausreichend um intrazelluläre Kalziumänderungen herbeizuführen. Erst die gleichzeitige Aktivierung von GABA_A- und NMDA-Rezeptoren resultierte in Kalziumsignalen, deren Amplitude ungefähr das doppelte der Amplitude der Kalziumsignale nach alleiniger GABA_A-Rezeptor-Aktivierung betrug. In dem Versuch, der in Abb. 12 dargestellt ist, wurden GABA und NMDA einzeln oder gemeinsam auf eine migrierende Kleinhirnkörnerzelle (Abb. 12A und B) appliziert. Während die alleinige Applikation von NMDA kein Kalziumsignal hervorrief, erzeugte eine Applikation von GABA aus einer mehrläufigen Pipette mit gleichem Druck und gleicher Applikationsdauer kleine Kalziumsignale. Die gleichzeitige Applikation beider Agonisten verstärkte deutlich die Amplitude des Kalziumsignals (Abb. 12C). Die Graphik in Abb. 12D fasst das Ergebnis der Versuche an 20 migrierenden und postmigratorischen Körnerzellen zusammen.

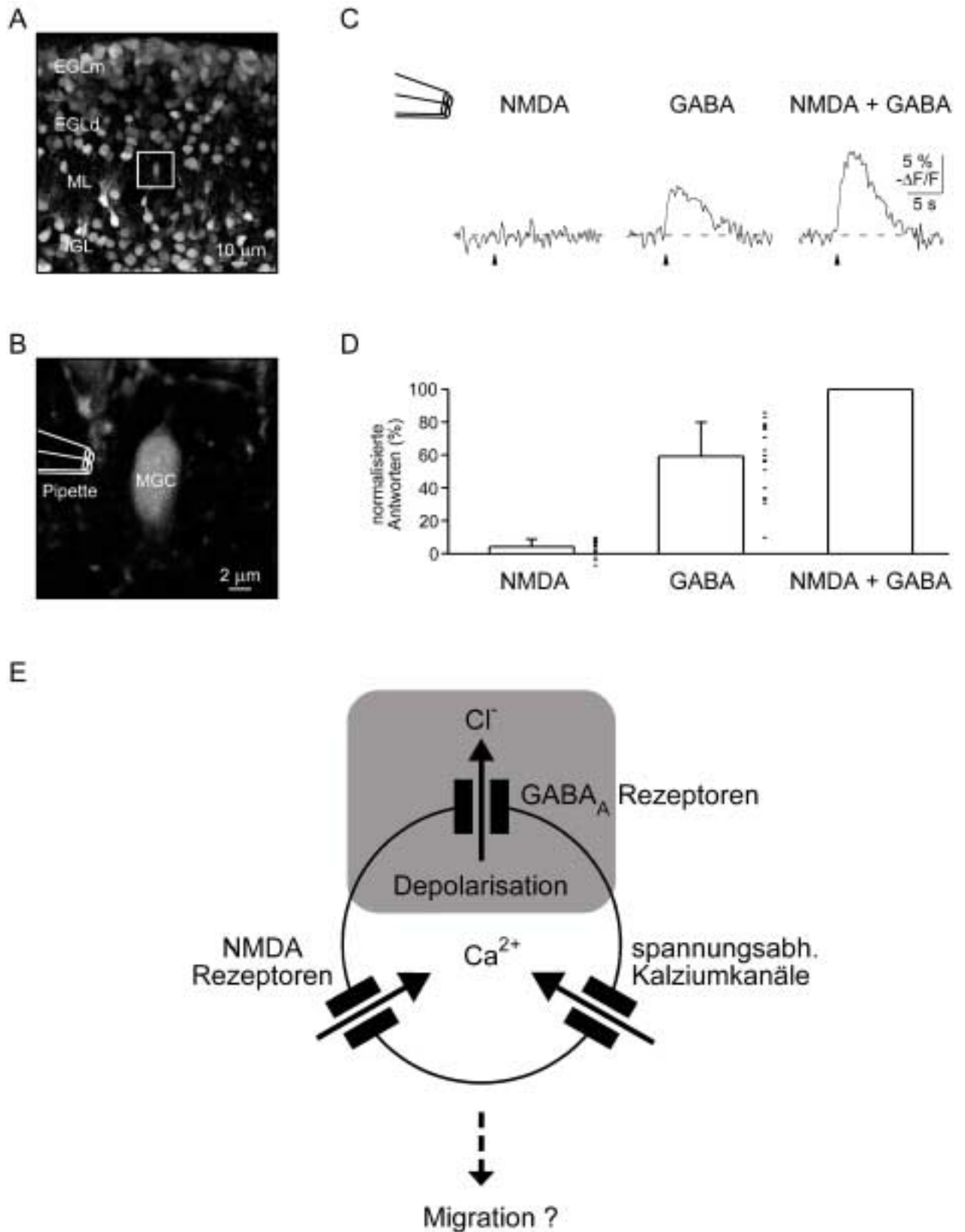


Abb. 12. Potenzierung der Kalziumsignale bei koinzidenter GABA_A- und NMDA- Rezeptor-Aktivierung

A und B, Migrierende Körnerzelle (MGC) in der Molekularschicht (ML) der Kleinhirnrinde einer 5 Tage alten Ratte. Die Stellung der mehrläufigen Applikationspipette ist dargestellt. C, Kalziumantworten durch eine alleinige als auch durch eine gleichzeitige Applikation von NMDA (100 μ M) und GABA (1 mM). D, Zusammenfassung der Effektes einer gleichzeitigen NMDA- und GABA-Rezeptor-Aktivierung auf migrierende und postmigratorische Zellen im Säulendiagramm (n = 20 Zellen, P5-15). Die Punkte entsprechen den Amplituden der Kalziumsignale aller analysierten Zellen. E, schematische Darstellung der durch die hier vorgestellten Ergebnisse gestützten Mechanismen der Kalziumsignalgebung in migrierenden Körnerzellen.

Die Amplituden nach einer alleinigen NMDA- oder GABA-Applikation wurden normalisiert auf die Amplituden der Kalziumsignale nach gleichzeitiger Applikation beider Agonisten. Gegenüber der gleichzeitigen Applikation hatte die alleinige NMDA-Applikation Amplituden von $4.2 \pm 4.6\%$ und die von GABA $59.2 \pm 20.7\%$.

3.3 GABA- und Glyzin-vermittelte Kalziumsignale *in vivo*

3.3.1 Beladen der Rückenmarksneurone in Zebrafischlarven mit Kalziumfarbstoffen

Die Durchführung von Kalziumfluoreszenzmessungen in intakten vitalen Lebewesen setzt einerseits die ausreichende Transparenz eines Tieres und andererseits die Möglichkeit der Beladung des zu untersuchenden Geweberegion voraus. Ein vor allem für genetische Mutationsstudien häufig benutztes Präparat, das zumindest die erste dieser Eigenschaften hervorragend erfüllt, ist der Zebrafisch im Larvenstadium. Durch die Injektion der membranpermeablen Kalziumindikatorfarbstoffe Fura PE3 AM oder Calcium Green-1 AM gelang es außerdem, die Zellen des Rückenmarks zu beladen und somit die zweite Voraussetzung für Kalziumfluoreszenzmessungen zu erfüllen. Unter Anwendung der Zwei-Photonen-Mikroskopie konnten in mit Kalziumindikatorfarbstoffen beladenen Zebrafischlarven bei hoher Vergrößerung deutlich die einzelnen Rückenmarksneuronen mit teilweise prominenten Fortsätzen dargestellt werden. Ein vertikales Schnittbild durch das mit Fura PE3 AM beladene Rückenmark einer 6 Tage alten Zebrafischlarve zeigt charakteristische Strukturen des Rückenmarks wie die um die Medianlinie herum angeordneten Zellen, den zentralen Spinalkanal und die beiden lateralen Spinalarterien (Abb. 13A). In den Längsaufnahmen des Rückenmarks sind deutlich große lateral angeordnete Neuronen mit prominenten nach ventral verlaufenden Fortsätzen zu erkennen, die der Lage und Form nach den primären Motoneuronen des Rückenmarks entsprechen (Abb. 13B).

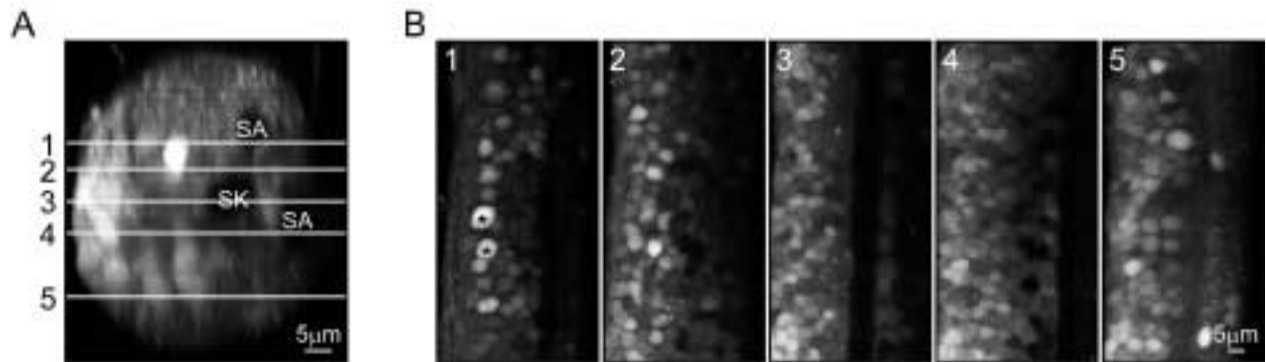


Abb. 13. Beladung des Rückenmarks einer Zebrafischlarve mit membranpermeablen Kalziumfarbstoffen.

A, Zwei-Photonen Bild eines vertikalen Schnittes durch das mit membranpermeablen Kalziumfarbstoffen (Fura PE3 AM) beladene Rückenmark einer in Seitenlage positionierten Zebrafischlarve (P6). In der rechten Bildhälfte sind deutlich der Spinalkanal (SK) und die beiden Spinalarterien (SA) zu erkennen. In diesem Bild entsprechen links und rechts dorsal und ventral. Die durchgezogenen weißen nummerierten Linien zeigen die Lage der Schnittebenen der Zwei-Photonen Bilder in B. Einzelne Neurone des Rückenmarks sind deutlich zu erkennen. Die beiden hellen großen Zellen (*) mit den nach rechts oben laufenden feinen Fortsätzen zeigen die morphologischen Charakteristika der primären Motoneurone. Es ist zu bemerken, dass nahezu alle Zellen des Rückenmarks gefärbt sind.

3.3.2 GABA- und Glyzin-vermittelte Kalziumsignale in Rückenmarksneuronen der Zebrafischlarven

Zur Untersuchung der Wirkung von GABA und Glyzin auf Zellen eines sich entwickelnden neuronalen Netzwerkes *in vivo* wurden die Kalziumsignale nach iontophoretischer GABA- und Glyzin-Applikation im Rückenmark von vitalen intakten Zebrafischlarven untersucht. Abb. 14A zeigt mit Calcium Green-1 AM beladene Zellen in der Paramedianebene im Rückenmark einer 8 Tage alten Zebrafischlarve. Die repetitive iontophoretische Applikation von GABA rief robuste Kalziumsignale in den beiden in Abb. 14A markierten Zellen hervor (Abb. 14B).

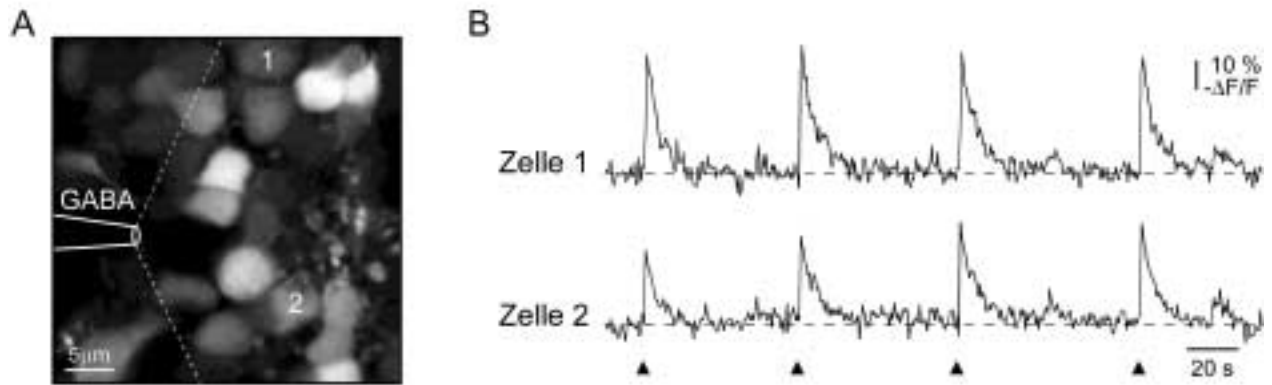
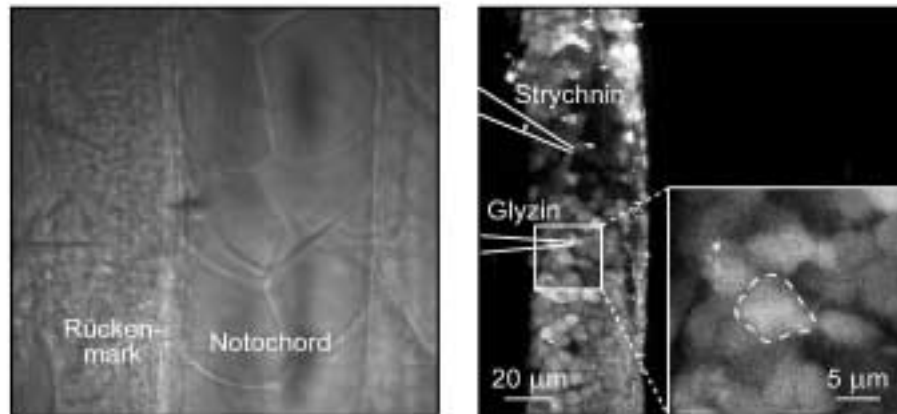


Abb. 14. GABA-vermittelte Kalziumsignale in Rückenmarksneuronen *in vivo*.

A, Zwei-Photonen Bild von mit Calcium Green-1 AM beladenen Rückenmarksneuronen in der Paramedianebene einer 8 Tage alten Zebrafischlarve. Aus der links dargestellten Pipette wurde iontophoretisch GABA appliziert. B, eine repetitive GABA-Applikation rief in den in A markierten Zellen robuste Kalziumsignale hervor. Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Applikation an.

Wie GABA rief auch Glyzin Kalziumsignale in Rückenmarksneuronen von Zebrafischlarven hervor. Die Abb. 15A zeigt in einem Durchlichtbild (links) und einem Zwei-Photonen-Fluoreszenzbild das mit Fura PE3 AM beladene Rückenmark einer 6 Tage alten Zebrafischlarve. Die repetitive lokale iontophoretische Applikation von Glyzin rief große Kalziumsignale mit konstanter Amplitude hervor, die nach einer ungefähr ein Segment entfernten Injektion des Glyzin-Rezeptor-Antagonisten Strychnin nahezu verschwanden (Abb. 15B-C).

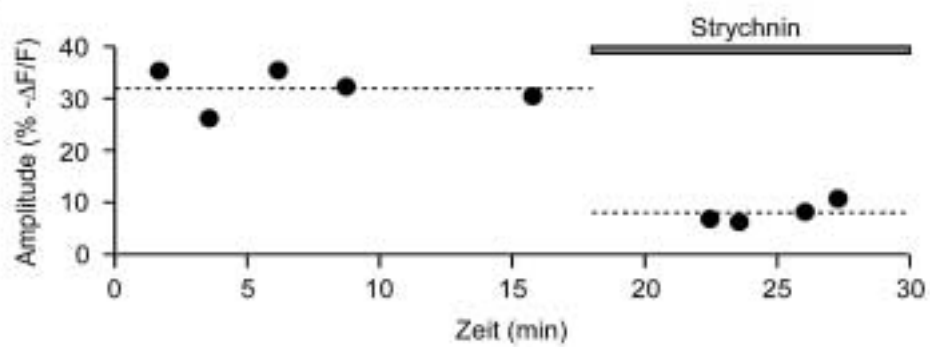
A



B



C



D

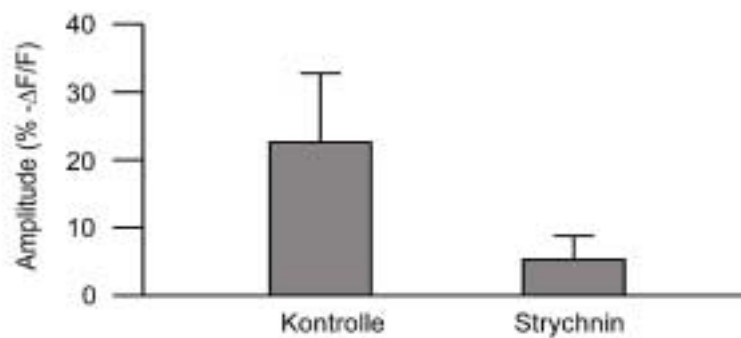


Abb. 15. Glyzin-vermittelte Kalziumsignale in Rückenmarksneuronen *in vivo*.

A, links, Durchlichtbild aus der Medianebene des Rumpfes einer 6 Tage alten Zebrafischlarve (14. bis 16. Segment). Das Rückenmark und das Notochord sind deutlich zu erkennen. Rechts, das korrespondierende Fluoreszenzbild zeigt deutlich die Beladung der Rückenmarksneuronen mit dem Kalziumindikatorfarbstoff Fura PE3 AM. Die im Durchlichtbild zu erkennenden Applikationspipetten für den Agonisten (unten) und den Antagonisten (oben) sind eingezeichnet. Die in dem Quadrat dargestellte Region ist rechts unten vergrößert dargestellt. Die dort markierte Zelle diente den in B und C gezeigten Messungen. B, Die iontophoretische Applikation von Glyzin (1 M) rief Kalziumsignale (4 Einzelsignale gemittelt) hervor, die durch die Injektion von Strychnin (1 μ M) nahezu vollständig blockiert wurden. C, Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Amplituden (schwarze Punkte) der Kalziumsignale bei repetitiver Glyzinapplikation (gleicher Versuch wie in B). Die gestrichelten Linien entsprechen den durchschnittlichen Amplituden der Kalziumsignale vor und nach der Injektion von Strychnin (angezeigt durch Pfeil). D, Zusammenfassung des Effektes von Strychnin auf Glyzin-vermittelte Kalziumsignale als Säulendiagramm (n = 8 Zellen, P5-8).

3.4 Zwei-Photonen Messungen dynamischer Chloridänderungen in intakten Neuronen

3.4.1 Biophysikalische Eigenschaften von MQAE

MQAE (N-(6-methoxyquinolyl) Acetoethylester; Fig. 16A) ist ein membrangängiger chloridsensitiver fluoreszierender Farbstoff, der zur Gruppe der N-substituierten Quinolinverbindungen gehört (Verkman et al., 1989). In bisherigen Studien ist dieser Farbstoff im Ein-Photonen-Modus mit Wellenlängen von 320 bis 400 nm angeregt worden mit einer maximalen Intensität der Emission bei 460 nm (Verkman et al., 1989; Bevensee et al., 1997). Um die Eignung von MQAE für die Zwei-Photonen-Mikroskopie (Abb. 16B) zu überprüfen, wurde ein Zwei-Photonen Anregungsspektrum erstellt. Dies wurde erreicht durch die Messung der Intensitäten der emittierten Fluoreszenz einer Lösung die 26 mM Chlorid und 6 mM MQAE enthielt. Diese Lösung wurde angeregt bei einer Wellenlänge zwischen 740 und 800 nm, einem Bereich der ungefähr dem doppelten des Wellenlängenbereiches für die Ein-Photonen-Anregung entspricht. Dieses Anregungsprotokoll resultierte in einer starken Fluoreszenz im gesamten getesteten Wellenlängenbereich. Zur Konstanthaltung des emittierten Fluoreszenzlichtes war eine Zunahme der Leistung des Anregungslichtes bei zunehmender Wellenlänge nötig (Abb. 16C, Quadrate).

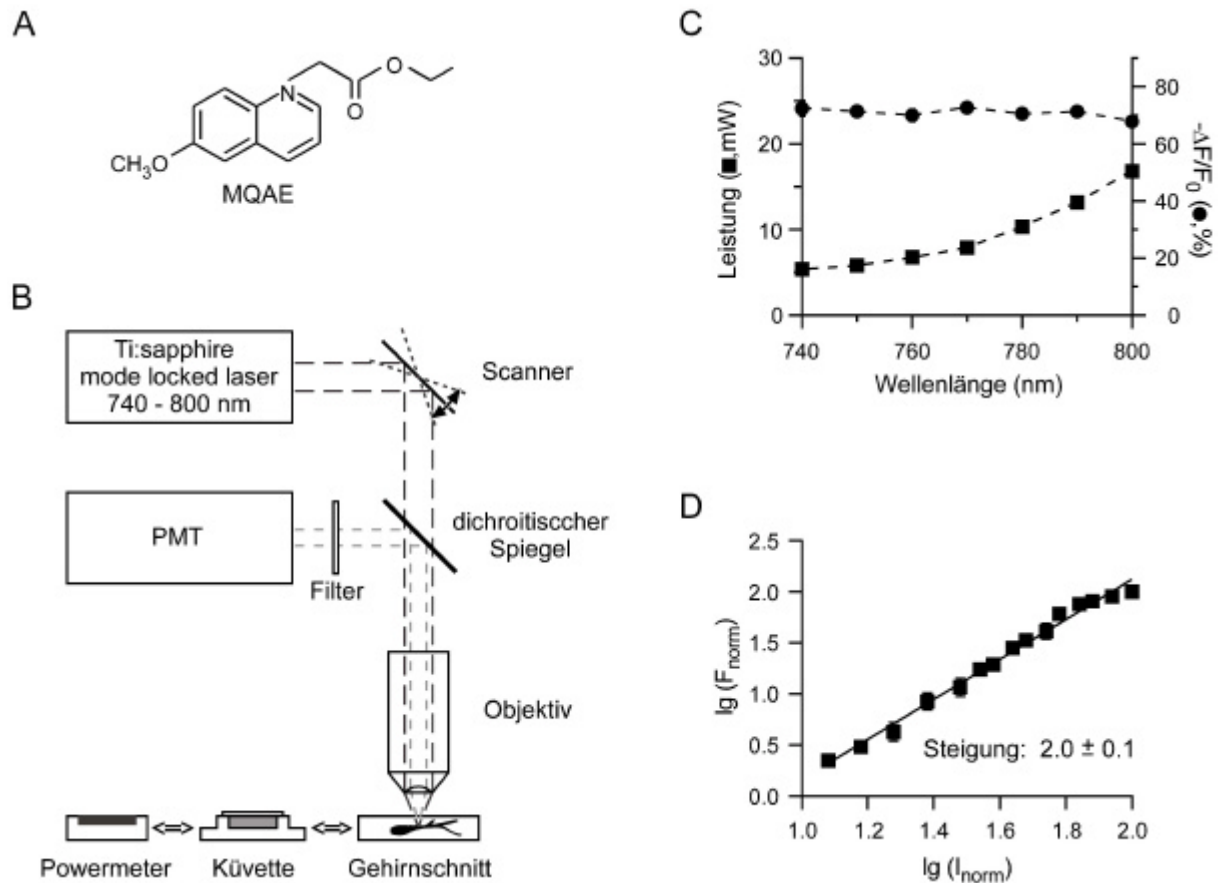


Abb. 16. Fluoreszenzeigenschaften von MQAE.

A Chemische Struktur von N-(6-methoxyquinolyl) acetoethyl ester (MQAE). B, Darstellung der experimentellen Anordnung. MQAE wurde angeregt durch gepulstes Laserlicht, das von einem Ti:Saphir Laser System erzeugt wurde und von einem galvanometrischen Scanner gelenkt wurde. Das emittierte Licht wurde durch eine Photonenverstärkerröhre (PMT) gemessen, die sich nahe der Messprobe befand. Zur Durchführung von *in vitro* Messungen wurde eine mit der jeweiligen Lösung gefüllte Küvette unter dem Objektiv platziert. Die Leistung des Anregungslichtes am Präparat wurde mit einem Messgerät unter dem Objektiv erfasst. C, spektrale Eigenschaften von MQAE. Die Änderungen von $-\Delta F/F_0$ (Kreise) und der Anregungsleistung (Quadrate) wurde dargestellt gegenüber der Wellenlänge des Anregungslichtes. Zur Erfassung der Werte für $-\Delta F/F_0$ wurde die Fluoreszenz von MQAE in Lösungen gemessen, die 0 (F_0) und 26 mM (F) Cl⁻ enthielten. Über eine variable Leistung des Anregungslichtes wurde F_0 konstant gehalten. D, logarithmische Darstellung der Fluoreszenz von MQAE gegen die Anregungsintensität. Die Messungen wurden durchgeführt in fünf zufällig ausgewählten Purkinjezellen. Die X-Werte wurden normalisiert zur maximalen Intensität des Anregungslichtes und die Y-Werte wurden normalisiert zur maximalen Intensität der Fluoreszenz von MQAE. Die Näherung der Datenpunkte mit einer linearen Funktion ergab eine Steigung von 2.0, ein Wert, der deutlich macht, dass das Fluoreszenzsignal von MQAE aus einer Zwei-Photonen Anregung resultiert.

Um zu bestimmen, ob die Amplituden der Chloridsignale von der Anregungswellenlänge abhängen, wurden bei verschiedenen Wellenlängen chloridabhängige Fluoreszenzänderungen ($-\Delta F/F$) gemessen. Dazu wurden Fluoreszenzmesswerte von 2 Küvetten, die 0 und 26 mM Chlorid enthielten, aufgezeichnet. Wie gezeigt in Abb. 16C sind die chloridabhängigen Fluoreszenzänderungen im Wellenlängenbereich von 740 bis 800 nm konstant (Kreise). Allerdings wurde die niedrigste Energie des Anregungslichtes, die eine bestimmte Intensität des Emissionslichtes und dadurch auch den niedrigsten phototoxischen Schaden hervorrief (Tsien & Waggoner, 1995), bei 740 und 750 nm benötigt. Weitere Experiments wurden bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm durchgeführt, da unser Lasersystem bei dieser Wellenlänge eine größere Leistung als bei 740 nm hervorbringt.

Um die physikalische Grundlage der Zwei-Photonen-Anregung von MQAE zu bestimmen, wurde die Intensität des Emissionslichtes von mit MQAE beladenen Kleinhirnpurkinjezellen als eine Funktion der Anregungsintensität gemessen (Abb. 16D). Dass die Intensität der von MQAE emittierten Fluoreszenz in einer quadratischen Abhängigkeit stand zur Anregungsintensität, zeigt an, dass bei 750 nm eine Zwei-Photonen-Anregung stattfindet.

Als nächstes wurden die Sensitivität und die Selektivität von MQAE untersucht, insbesondere die Fähigkeit, zu diskriminieren zwischen Chlorid und Bikarbonat, dem Anion, das bei einer Reihe biologischer Vorgänge mit Chlorid konkurriert (Bormann et al., 1987; Deitmer & Rose, 1996).

Um dieser Frage nachzugehen, wurde untersucht, in welcher Weise die Fluoreszenz von MQAE *in vitro* in Abhängigkeit stand zu den Konzentrationen von Chlorid und Bikarbonat (Abbi. 17A und B). Wie erwartet, wurde die Fluoreszenz von

MQAE durch Chlorid stark abgeschwächt (Abb. 17A). Die Messwerte stimmten eng überein mit der folgenden Gleichung (weitere Erläuterungen im Anhang):

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_{\max} * \frac{[Cl^-]}{K_d + [Cl^-]} \quad (1)$$

unter der Annahme, dass die Interaktion zwischen Chlorid und dem Farbstoff in Analogie zur Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden kann.

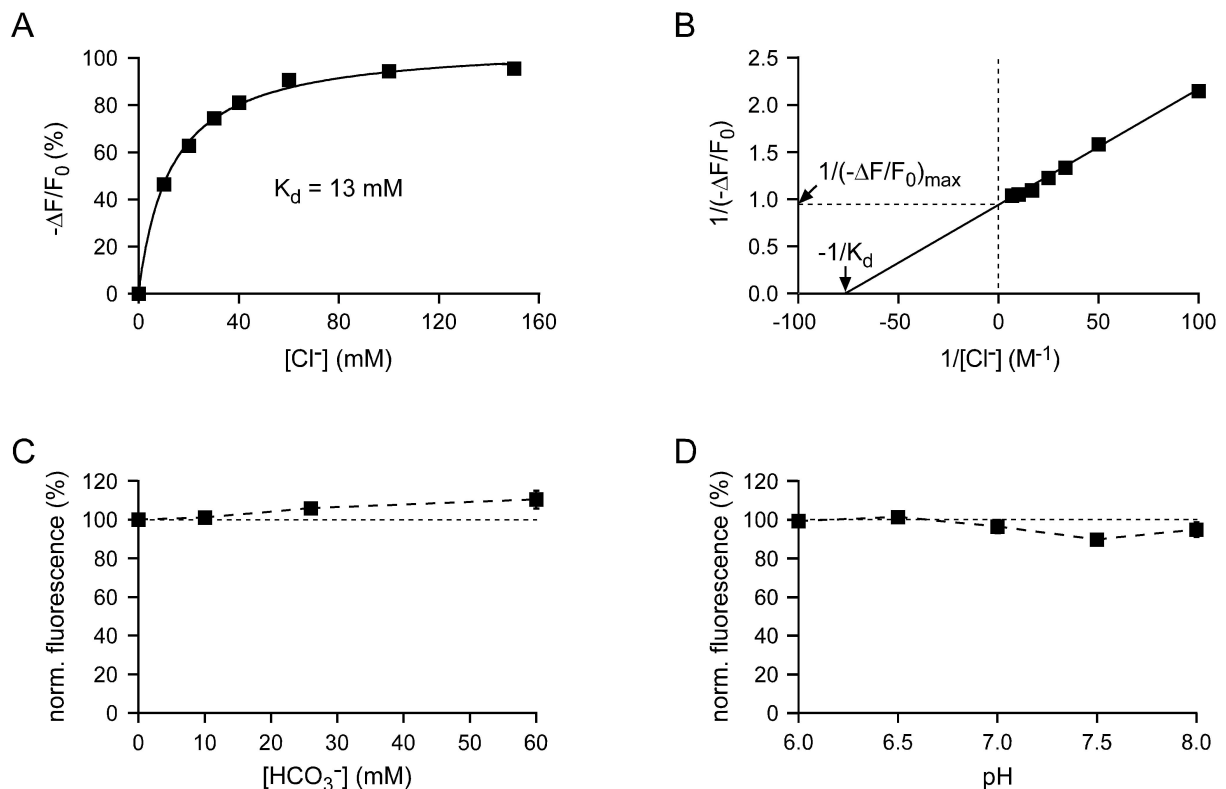


Abb. 17. Sensitivität von MQAE.

Graphische Darstellung der Abhängigkeit der MQAE-Fluoreszenz von der Chloridkonzentration in A, der Bikarbonatkonzentration in C und vom pH-Wert in D. In A erfolgte die Näherung der Datenpunkte mit der Gleichung 8 (siehe Appendix). B, Lineweaver-Burk-Darstellung der Datenpunkte. Die Kehrwerte des IC_{50} und von $(-\Delta F/F_0)_{\max}$ wurden aus den jeweiligen Schnittpunkten mit der X- und der Y-Achse bestimmt.

Unter Anwendung der graphischen Darstellung nach Lineweaver-Burk (Abb. 17B, ausführliche Erklärung im Anhang) wurde für $(\Delta F/F_0)_{\max}$ ein Wert von 1 und für den IC_{50} der chloridabhängigen Fluoreszenzminderung ein Wert von 13 mM bestimmt. Des Weiteren kann der IC_{50} auch aus einer Stern-Volmer Darstellung der Fluoreszenzdaten entnommen werden (weitere Erklärungen im Anhang). Hierbei ergab sich mit 9.5 mM ein ähnlicher Wert für den IC_{50} .

Im Gegensatz zu Änderungen der $[Cl^-]$ verursachten Änderungen der $[HCO_3^-]$ im physiologischen Bereich (0-60 mM) nur sehr kleine Änderungen des MQAE-Fluoreszenzsignals (Abb. 17C). Das gleiche gilt für pH-Änderungen innerhalb des physiologisch-relevanten Bereiches. Zwischen pH 6.0 und pH 8.0 zeigte MQAE keine nennenswerten Fluoreszenzänderungen (Abb. 17D).

Zur Untersuchung der Chloridsensitivität von MQAE innerhalb von Neuronen wurde die von Krapf und Mitarbeitern (Krapf et al., 1988) entwickelte Kalibrationsprozedur angewendet. Die K^+/H^+ -Ionophore Nigericin (10 μM) und der Cl^-/OH^- -Antiporter Tributylzinnchlorid (10 μM) wurden der extrazellulären Lösung hinzugefügt um die $[Cl^-]_i$ und den intrazellulären pH-Wert den äußeren Werten anzugleichen. Dieses Vorgehen ermöglichte die Kalibration von MQAE durch eine schrittweise Veränderung der $[Cl^-]_e$ (Abb. 18A). Allerdings verursachte die Zugabe dieser Substanzen zur extrazellulären Lösung einen plötzlichen Abfall der Fluoreszenz von ungefähr 20% (nicht gezeigt), wahrscheinlich als Folge einer Absorption durch Nigericin und Tributylzinnchlorid (Fukuda et al., 1998). Um der Gefahr zu entgehen, diese Daten falsch zu interpretieren, wurde dieser anfängliche Fluoreszenzabfall nicht kompensiert und als Konsequenz keine $[Cl^-]_i$ quantifiziert. Wie gezeigt in Abbildung 18B, verringert sich das MQAE-Fluoreszenzsignal bei einer Erhöhung der $[Cl^-]_i$ von 10 mM um 20%.

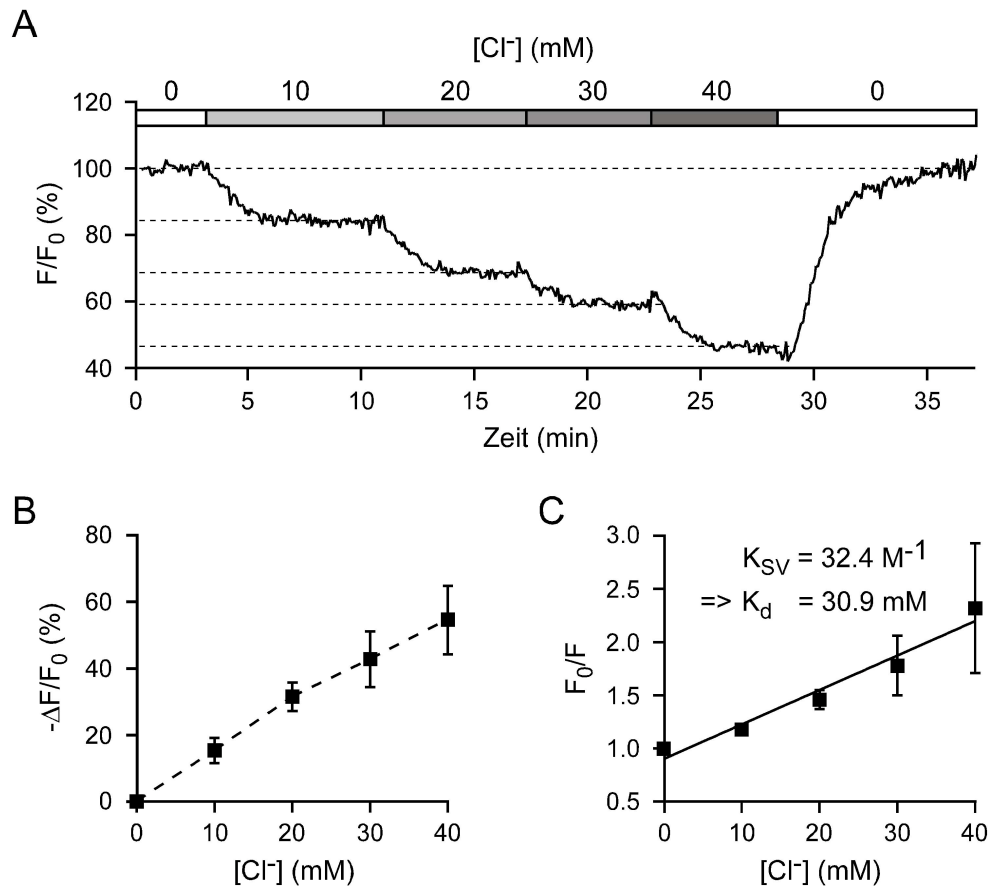


Abb. 18. Intrazelluläre Chloridsensitivität von MQAE.

A, Darstellung eines Kalibrationsexperimentes in CA1 Hippokampus Pyramidenneuronen einer 9 Tage alten Ratte. Die Verlaufskurve entspricht dem Durchschnitt von 5 frei ausgewählten Zellen. Die Daten wurden gemessen in Gegenwart von 10 μM Nigericin und 10 μM Tributylzinnchlorid. Der obere Balken zeigt den Zeitpunkt der Zugabe der unterschiedlichen Lösungen an. Die Daten wurden korrigiert für einen Fluoreszenzabfall von 0.08 %/min. B, graphische Darstellung der Abhängigkeit der MQAE-Fluoreszenz von der Chloridkonzentration in Zellen (jeder Datenpunkt entspricht dem Durchschnittswert \pm Standardabweichung, $n = 5$ Schnitte, 42 Zellen). Die durchgezogene Linie entspricht der Näherung der Datenpunkte mit der Gleichung 8 (siehe Appendix). C, Stern-Volmer-Darstellung der Datenpunkte. Die Steigung der Näherungsgeraden ergibt die Stern-Volmer Konstante (K_{SV}), die dem Kehrwert des IC_{50} entspricht.

Außerdem zeigte sich, dass in dem in dieser Arbeit untersuchten physiologisch relevanten Bereich die $[\text{Cl}^-]_i$ in nahezu linearer Abhängigkeit stand zu MQAE-abhängigen Fluoreszenzänderungen ($\Delta F/F$) (Abb. 18B). Dies ermöglichte die ungefähre Bestimmung transienter Änderungen der $[\text{Cl}^-]_i$ anhand der Messung von

Fluoreszenzänderungen ($\Delta F/F$). Die Anwendung der Stern-Volmer Gleichung ergab für Chlorid einen IC_{50} von 31 mM (Abb. 18C). Dieser Wert zeigt, dass MQAE auch im intrazellulären Milieu eine ausreichend hohe Chloridsensitivität besitzt, um physiologisch relevante Änderungen der $[Cl^-]$ bestimmen zu können.

3.4.2 Zwei-Photonen Mikroskopie von mit MQAE beladenen Neuronen

Zur Beladung von Neuronen in Gehirngewebeschnitten mit MQAE wurde das von Garaschuk und Mitarbeitern entwickelte Protokoll zur Beladung mit dem membrangängigen Kalziumfarbstoff fura-2 AM (Garaschuk et al., 1998) modifiziert. Die Gehirngewebeschnitte wurden beladen durch eine zehnmündige Inkubation in extrazellulärer Ringerlösung mit 6 mM MQAE bei 37°C. Aus diesem Vorgehen resultierte eine gute Beladung von Neuronen des Hippokampus, des Kortex und des Kleinhirns in Gehirngewebeschnitten von 1-17 Tage alten Ratten (Abb. 19A, D, E und 20A und B). Innerhalb der oberflächlichen 70 μ m der Gehirngewebeschnitte ermöglichte die Qualität der durch die Zwei-Photonen Mikroskopie erstellten Bilder deutlich das Erkennen unterschiedlicher Arten von Neuronen anhand ihrer Morphologie. Es konnte kein Unterschied der Qualität der Ladung zwischen verschiedenen Zelltypen ausgemacht werden. Allerdings war die Fluoreszenzintensität in mit MQAE beladenen Zellen innerhalb des Zytoplasmas nicht homogen verteilt (siehe beispielsweise Abb. 20A). Während die Intensität der Fluoreszenz innerhalb der Zellkerne schwach war, befanden sich innerhalb des Zytoplasmas unregelmäßig verteilte hellere und dunklere Regionen. Um zu untersuchen, ob diese Heterogenität verbunden ist mit einer differierenden Chloridsensitivität, wurde ein Vergleich der Fluoreszenzänderungen infolge einer GABA_A-Rezeptor

Aktivierung in hellen und dunklen zellulären Regionen durchgeführt. Die normalisierten Amplituden der Fluoreszenzänderungen ($\Delta F/F$) waren nahezu identisch in dunklen (16.97 ± 1.15 %) und hellen Regionen (16.28 ± 1.33 %) des Zytosols und ähnlich denen im Zellkern (21.65 ± 1.72 %, $n = 9$ Zellen). Dieses Ergebnis legt nahe, dass sich Chloridionen frei innerhalb einer Zelle bewegen und dunkle und helle „Kompartimente“ gleichermaßen erreichen. Aus diesem Grunde wurde in den folgenden Messungen die durchschnittliche Fluoreszenz des ganzen Zellkörpers bestimmt.

Als nächstes wurde untersucht, in welchem Ausmaß ein Austreten von Farbstoff aus der Zelle und photochemisches Bleichen des Farbstoffes durch die Zwei-Photonen Anregung eine Rolle spielen. Dies wurde untersucht in hippokampalen CA1 Pyramidenzellen und kortikalen Pyramidenzellen der fünften Schicht. Das Ausmaß des Austretens von Farbstoff aus einer Zelle wurde gemessen anhand der spontanen Abnahme der Fluoreszenzintensität während Zeitintervallen, in denen keine Zwei-Photonen-Anregung stattfand. Im Gegensatz dazu wurde das photochemische Bleichen bestimmt aus der Differenz der Fluoreszenzreduktion während Zwei-Photonen Anregung (15-45 min bei 1 Hz) und der Farbstoffaustrittsrate. Berechnet auf eine Stunde betrug die Farbaustrittsrate ungefähr 30% und die Rate des photochemischen Bleichens ungefähr 10% ($n = 54$ Zellen). Im Vergleich zu den bisherigen Daten unter Ein-Photonen-Anregung zeigt dieses Ergebnis, dass durch die Zwei-Photonen Anregung das Ausmaß des photochemischen Bleichens stark reduziert wird und dass dadurch lange andauernde ununterbrochene Messungen mit einer relativ hohen Aufnahmefrequenz möglich werden (Schwartz & Yu, 1995, Fukuda et al., 1998, Sah & Schwartz-Bloom, 1999, Kaneko et al., 2001).

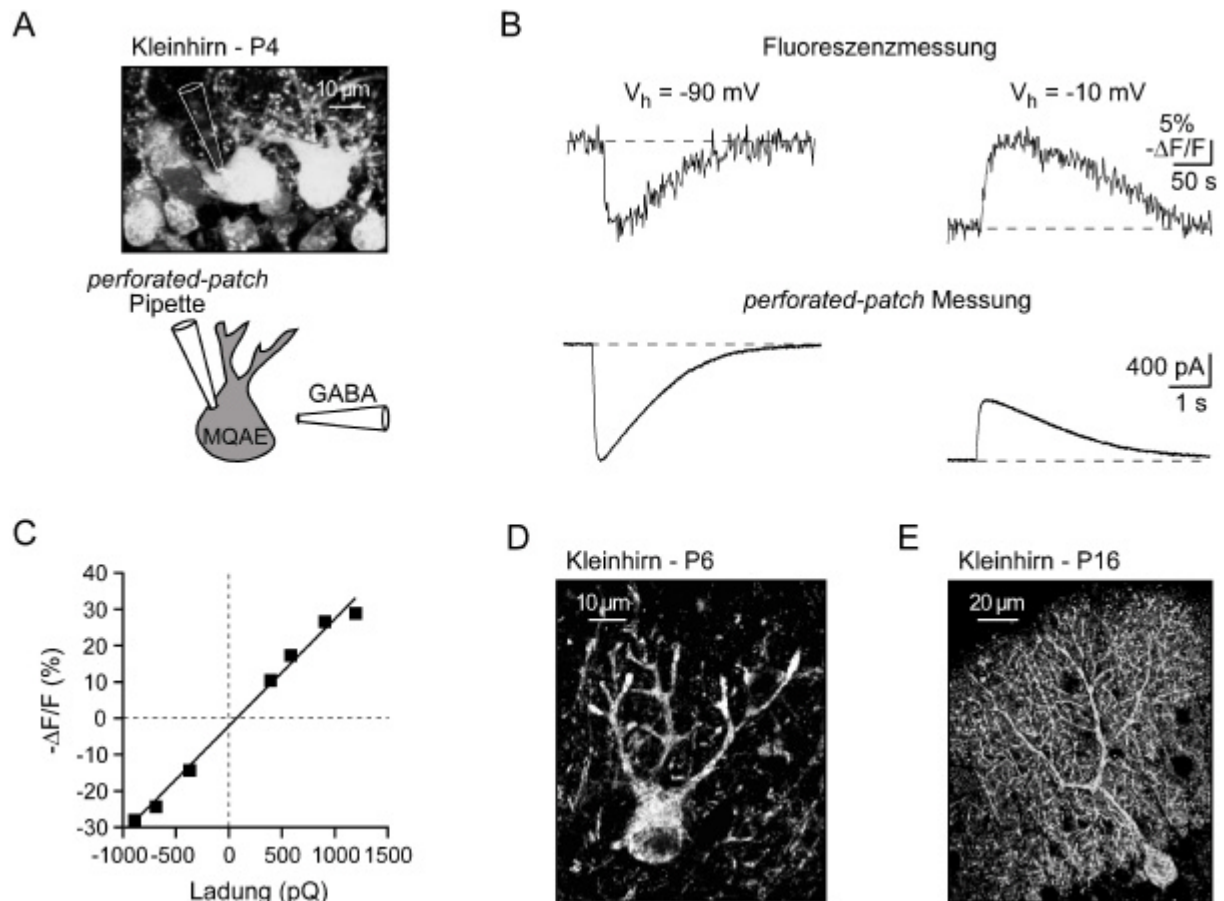


Abb. 19. Chlorid-Ausstrom-Einstrom-Untersuchung in Kleinhirnpurkinjezellen.

A, oben, hochauflösendes Bild zweier Purkinjezellen im Kleinhirnschnitt einer 4 Tage alten Ratte. Unten, schematische Darstellung der experimentellen Anordnung für die Gramicidin-basierten *perforated-patch* Messungen. B, entgegengesetzte Richtungen GABA-vermittelter Chloridströme bei Haltepotentialen (V_h) von -90 mV (links) und -10 mV (rechts). Veränderungen der Fluoreszenz (oben) und der korrespondierenden transmembranären Ströme (unten) wurden hervorgerufen durch eine 150 ms lange GABA-Druckapplikation. C, Korrelation zwischen der Amplitude der Chloridtransienten und den korrespondierenden transmembranären Strömen in einem anderen Versuch. D, E, Hochauflösende Zwei-Photonen-Bilder von Purkinjezellen in einem mit MQAE beladenen Kleinhirnschnitt von einer 6 bzw. 16 Tage alten Ratte. Die Bilder entsprechen einer Maximalprojektion von 6 bzw. 9 Einzelbildern in D und E, die in einem Abstand von jeweils 1 µm aufgenommen wurden.

3.4.3 Intrazelluläre Chloridmessungen

Um die Durchführbarkeit von MQAE-basierten Chloridmessungen zu testen, wurden unter einer GABA-Applikation auf Purkinjezellen (Abb. 19A) gleichzeitig MQAE-abhängigen Fluoreszenzänderungen und die damit einhergehenden transmembranären Ströme gemessen (Abb. 19B). Zu diesem Zweck wurde die Gramicidin-basierte *perforated-patch* Technik angewendet, die es ermöglichte, elektrophysiologische Messungen in der Ganzzelleableitung durchzuführen ohne dabei die $[Cl^-]_i$ zu verändern (Eilers et al., 2001).

Wie in Abb. 19B gezeigt, verursacht eine $GABA_A$ -Rezeptor-Aktivierung bei einem Haltepotential von -90 mV eine Fluoreszenzzunahme (in dieser Abbildung invertiert, um die Änderung der $[Cl^-]_i$ zu verdeutlichen) und einen einwärts gerichteten Strom. Beides spricht dafür, dass Chloridsignale zustande kommen durch einen Chloridausstrom durch $GABA_A$ -Rezeptoren. Durch eine Verschiebung des Haltepotentials auf -10 mV wurde die Richtung beider Signale umgekehrt. Das Verhältnis zwischen MQAE-vermittelten Fluoreszenzänderungen und der über die Zellmembran verschobenen elektrischen Ladung infolge einer $GABA_A$ -Rezeptor Aktivierung war linear und hatte den gleichen Proportionalitätskoeffizienten für jede Richtung der Ladungverschiebung (Abb. 19C). Es war möglich, deutliche Fluoreszenzänderungen infolge einer einmaligen $GABA_A$ -Rezeptor-Aktivierung aufzulösen, wenn sie mit transmembranären Strömen von mindestens 200 pA einhergingen. Bei kleineren Ladungverschiebungen hingegen war es nötig, die Daten mehrerer konsekutiver Fluoreszenzsignale zu mitteln, um diese deutlich darzustellen.

Während in Neuronen von Neugeborenen GABA am Ruhemembranpotential eine Abnahme der $[Cl^-]_i$ bewirkte, veränderte sich die Richtung dieses Signals während der neuronalen Entwicklung hin zu GABA-evozierten Chloridzunahmen. Wie in Abb. 20A gezeigt wird, riefen GABA-Applikationen auf Zellkörper von CA1 Pyramidenzellen in Hippokampusgewebeschnitten 16 Tage alter Ratten transiente Fluoreszenzsignalabnahmen hervor, die intrazellulären Chloridzunahmen entsprachen. Ähnliche GABA-vermittelte Chloridsignale wurden auch in apikalen Hauptdendriten von hippokampalen (nicht gezeigt) und neokortikalen Pyramidenzellen bis zu 100 μm vom Zellkörper entfernt beobachtet (Abb. 20B).

Diese GABA-vermittelten Chloridsignale konnten reversibel durch die GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Picrotoxin (20 oder 50 μM in der extrazellulären Lösung, n = 5 Zellen, Abb. 20C und D) und Bicucullin (20 μM) blockiert werden. Überraschenderweise ermöglichte die hier angewandte Beladetechnik mit MQAE auch in Gewebeschnitten älterer Ratten (P16) eine Qualität der Beladung, die es ermöglichte, intakte Zellen und deren Fortsätze aufzulösen (Abb. 19E, 20A und B).

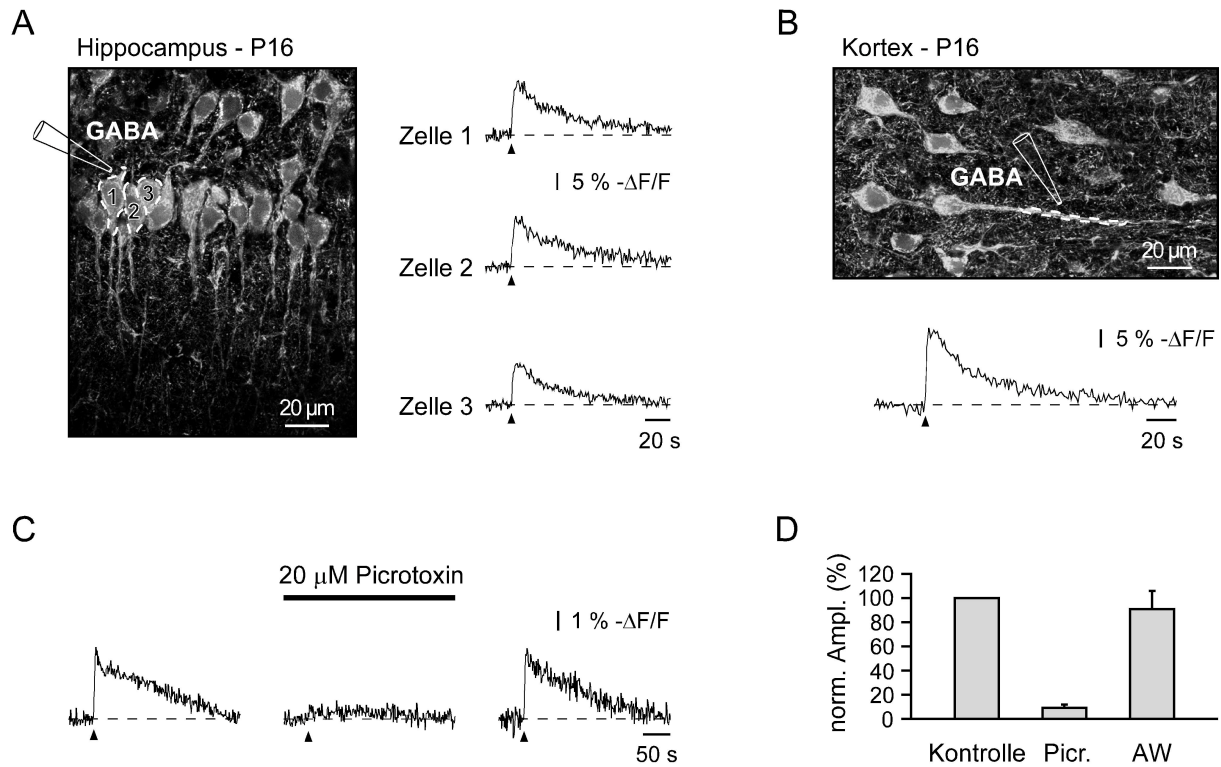


Abb. 20. GABA-vermittelte Chloridtransienten in Neuronen juveniler Tiere.

GABA-vermittelte Chloridtransienten in Zellkörpern von CA1 Pyramidenzellen. Links, Bild der Zellkorperschicht im Schnittpräparat einer 16 Tage alten Ratte (Maximalprojektion einer Serie von 7 mit einem Abstand von 1 μm aufgenommenen Bilder). Rechts, Chloridtransienten in den Zellkörpern dreier Neurone, die sich in der Nähe der Pipettenspitze befanden. B, oben, Bild der fünften Schicht in einem kortikalen Schnitt von einer 16 Tage alten Ratte (Maximalprojektion einer Serie von 7 mit einem Abstand von 1 μm aufgenommenen Bilder). Unten, dendritische GABA-vermittelte Chloridtransienten in einem Pyramidenneuron der fünften Schicht des Kortex. C, GABA-vermittelte Chloridtransienten wurden reversibel durch Picrotoxin blockiert (links - Kontrolle, Mitte - in Picrotoxin, rechts - nach dem Auswaschen von Picrotoxin (AW)). D, Zusammenfassung des Effektes von Picrotoxin auf GABA-vermittelte Chloridsignale ($n = 5$ Zellen). Die Signale in A-C sind Durchschnittswerte fünf konsekutiver Einzelsignale, die Pfeile zeigen jeweils den Zeitpunkt der GABA-Applikation an. AW, nach dem Auswaschen.

4. Diskussion

Während die Neurotransmitter GABA und Glyzin im adulten Nervengewebe Nervenzellen hyperpolarisieren und dadurch ihre Aktivität hemmen, wirken sie in unreifen Nervenzellen depolarisierend und führen zu intrazellulären Kalziumtransienten. Die hier vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der spezifischen Wirkung von GABA und Glyzin im unreifen Nervengewebe. Mit Hilfe der Zwei-Photonen Mikroskopie konnten erstmals GABA-vermittelte Kalziumsignale in unreifen Nervenzellen der Kleinhirnrinde nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass diese Signale in einer Phase der Zellreifung verschwinden, in der sich ein starkes Wachstum von Dendriten und die Bildung von Synapsen vollzieht. Während bisher GABA-vermittelte Kalziumsignale lediglich in kultivierten Zellen und in Gehirnschnitten nachgewiesen werden konnten, gelang in dieser Arbeit die Messung GABA- und Glyzin-vermittelter Kalziumsignale im Rückenmark immobilisierter intakter Zebrafischlarven *in vivo*. Hochauflösende Chloridfluoreszenzmessungen zeigten, dass GABA-vermittelten Kalziumsignalen in unreifen Nervenzellen als Mechanismus ein Chloridausstrom zugrunde liegt, während GABA in reifen Nervenzellen einen Einstrom von Chlorid bewirkte.

4.1 GABA-vermittelte Kalziumsignale in sich entwickelnden

Purkinjoneuronen des Kleinhirns der Ratte

Die hier gezeigten Ergebnisse sind die erste Darstellung GABA-vermittelter Kalziumsignalgebung in Purkinjenzellen und im Kleinhirn generell. Dabei wurde das

Zeitfenster der Änderung der GABAergen Transmission von einer Depolarisation zu einer Hyperpolarisation identifiziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen den Vermutungen der bisher einzigen Untersuchungen der GABAergen Übertragung in unreifen Purkinjezellen. Beide, Woodward und Mitarbeiter (Woodward et al., 1971) und Sorimachi und Mitarbeiter (Sorimachi et al., 1991), fanden aufgrund ihrer indirekten Methode keine Anhaltspunkte für eine depolarisierende Wirkung von GABA in unreifen Purkinjezellen des Kleinhirns. Woodward und Mitarbeiter (Woodward et al., 1971) führten eine ausgiebige Untersuchung der Synapsenbildung und des Neurotransmitterantwortverhaltens in unreifen Purkinjezellen *in vivo* durch. Die technischen Schwierigkeiten dieser Experimente könnten den Nachweis der depolarisierenden Wirkung von GABA verhindert haben. Sorimachi und Mitarbeiter (Sorimachi et al., 1991) untersuchten Purkinjezellen aus 5–11 Tage alten Ratten und fanden keine Hinweise auf GABA-vermittelte Kalziumsignale. Da diese Autoren allerdings kein spezifisches Alter der in diesen Versuche benutzten Ratten angaben, bleibt unklar, ob die hier gezeigten Ergebnisse denen oben genannter Studien widersprechen. Wahrscheinlich konzentrierten sich diese Studien auf ein etwas reiferes Alter.

Die sich auf die depolarisierende Wirkung von GABA in unreifen Purkinjezellen beziehenden früheren Vermutungen beruhen auf zwei unabhängigen experimentellen Ansätzen, einerseits Kalziummessungen an mit fura-2 AM beladenen Purkinjezellen und andererseits elektrophysiologische *perforated-patch* Messungen. Beide Verfahren lieferten robuste und völlig reproduzierbare Ergebnisse. Die Variabilität des GABA_A-Rezeptor-Gleichgewichtspotentiales während der Übergangsperiode (um den 6. Tag nach der Geburt) ist wahrscheinlich eine Folge der Unterschiede der Entwicklungsstufe individueller Purkinjezellen. In

keinem Fall konnten GABA-vermittelte Kalziumsignale in Purkinjezellen von mehr als 7 Tage alten Ratten gemessen werden, einem Alter, in dem Purkinjezellen schon einen relativ ausgereiften Dendritenbaum besitzen (siehe beispielsweise Abb. 1F).

Aus den hier dargestellten Untersuchungen geht hervor, dass Purkinjezellen zu einer größeren Gruppe von Nervenzellen gehören, in denen GABA während der frühen postnatalen Phase des Lebens Depolarisationen hervorruft (zur Übersicht siehe (Cherubini et al., 1991; Leinekugel et al., 1999)). Allerdings ist die Rolle dieser depolarisierenden Wirkung immer noch unklar. Eines der Hindernisse, das der bisherigen Überprüfung der Hypothese im Wege stand, dass GABA unter anderem für dendritisches Wachstum und Synapsenbildung eine Rolle spielt, resultierte aus dem Problem, Aktivität in definierten Nervenzelltypen zu messen. Das ist vor allem deswegen eine große Herausforderung auch in einer klar strukturierten Formation wie dem Hippokampus wegen des Fehlens eindeutiger morphologischer Kennzeichen für die meisten unreifen Nervenzellen. Diese Studie bewältigt diese Probleme durch die Identifizierung von Purkinjezellen als zelluläres Modellsystem, dass die Feststellung einer außergewöhnlich guten Korrelation zwischen morphologischen Veränderungen, als auch Veränderungen der synaptischen Konnektivität mit den klar umrissenen zeitlichen Veränderungen des GABA-Antwortverhaltens ermöglicht.

4.2 GABA-vermittelte Kalziumsignale in migrierenden

Körnerzellen des Kleinhirns

Die hier dargestellten Ergebnisse der Untersuchungen an Körnerzellen des Kleinhirns zeigen erstmalig GABA-vermittelte Kalziumsignale in migrierenden

Nervenzellen *in situ*. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dieses Signal während des gesamten Reifungsprozesses in Körnerzellen vorhanden ist und erst nach Vollendung der Migration verschwindet. Interessanterweise nahm der Anteil der postmigratorischen Zellen, die GABA-vermittelte Kalziumsignale zeigten, von der dritten bis zur fünften Woche nach der Geburt sukzessiv bis zum nahezu völligen Verschwinden ab.

Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus mehreren früheren Studien. Zum einen besitzen unreife Körnerzellen die mRNA für die GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha_2, \alpha_3, \beta_3, \gamma_1, \gamma_2$ (Laurie et al., 1992), zum anderen wurde GABA schon am zweiten Tag nach der Geburt im Kleinhirn der Ratte nachgewiesen (Meinecke & Rakic, 1990). Brickley und Mitarbeiter (Brickley et al., 1996) konnten zeigen, dass prä- und postmigratorische Körnerzellen auch funktionelle GABA_A-Rezeptoren zu besitzen. Diese Beobachtung legt nahe, dass auch migrierende Körnerzellen funktionelle GABA_A-Rezeptoren besitzen. Außerdem führten Brickley und Mitarbeiter (Brickley et al., 1996) *perforated-patch* Messungen durch, aus denen sich ergab, dass in postmigratorischen Körnerzellen in Kleinhirnschnitten 4-7 Tage alter Ratten GABA-vermittelte spontane postsynaptische Potentiale das Membranpotential depolarisierten, während sich um den 18. Tag nach der Geburt das GABA_A-Rezeptor-Gleichgewichtspotential im Bereich des Ruhemembranpotentials befand. Demnach besteht zwischen den Ergebnissen dieser elektrophysiologischen Untersuchung und den hier vorgestellten Kalziummessungen eine deutliche Parallelität der altersabhängigen Entwicklung der Körnerzellen.

In keiner der bisherigen Studien GABA-vermittelter Kalziumsignalgebung (zur Übersicht siehe (Cherubini et al., 1991; Leinekugel et al., 1999)) wurde dieses Signal

in Abhängigkeit des genauen neuronalen Entwicklungsstadiums beschrieben. Die ist dadurch bedingt, dass es in den meisten Gehirnregionen sehr schwierig ist, unreife Nervenzellen anhand ihrer Morphologie und ihrer Position innerhalb des Gewebes in ihrem exakten Entwicklungsstadium zu identifizieren. Im Gegensatz dazu erlauben die klare Schichtstruktur und das unreife Entwicklungsstadium des Kleinhirns bei der Geburt eine Korrelation zwischen dem Entwicklungsstadium einer Nervenzelle und ihrer physiologischen Funktion.

4.3 GABA-vermittelter Kalziumsignalgebung zugrundeliegende Mechanismen

Da GABA_A-Rezeptorkanäle permeabel sind für die Anionen Chlorid und HCO₃⁻ (Bormann et al., 1987), könnten verschiedene Mechanismen der depolarisierenden Wirkung von GABA in sich entwickelnden Purkinje- und Körnerzellen zugrunde liegen. Beispielsweise würde ein verstärkter HCO₃⁻-Ausstrom durch GABA_A-Rezeptorkanäle das GABA_A-Rezeptor-Gleichgewichtspotential (E_{GABAA}) zu positiveren Werten hin verschieben. Dies könnte verursacht werden einerseits durch eine Veränderung der HCO₃⁻-Leitfähigkeit der GABA_A-Rezeptorkanäle (Perkins & Wong, 1996) oder durch ein Ansteigen der [HCO₃⁻]_i (Sun et al., 1999). Allerdings scheinen, wie aus dem in Abb. 19A gezeigten Versuch hervorgeht, GABAerge Depolarisationen eher durch eine erhöhte [Cl⁻]_i in unreifen Nervenzellen zustande zu kommen. Dies führt zu einem Cl⁻-Ausstrom durch GABA_A-Rezeptorkanäle und zu einem positiveren E_{GABAA}. Unterstützt wird diese Hypothese von Studien, die gezeigt haben, dass unreife Nervenzellen, die noch keine Chloridextrusion besitzen (Zhang et al., 1991; Rivera et al., 1999) oder aktiv Chlorid

in die Zelle hineinpumpen (Rohrbough & Spitzer, 1996; Kakazu et al., 1999) mit einer Depolarisation auf eine GABAerge Stimulation antworten. In der Tat wäre eine entwicklungsbedingte Hochregulation des zerebellären Kalium-Chlorid-Transporters (Lu et al., 1999), der in adulten Nervenzellen höchstwahrscheinlich für die Chloridextrusion verantwortlich ist, vereinbar mit den in dieser Arbeit gezeigten Beobachtungen.

Als gesichert scheint aufgrund dieser Arbeit die Folgerung, dass wie auch in einer Reihe anderer Gehirnregionen, die GABA-evozierte Kalziumsignalgebung durch eine GABA_A-Rezeptor-vermittelte Depolarisation mit einer nachfolgenden Aktivierung spannungsgesteuerter Kalziumkanäle hervorgerufen wird.

4.4 Funktionelle Auswirkungen in Purkinjezellen des Kleinhirns

Das Zeitfenster, in dem GABA depolarisierend wirkt, überlappt mit einer kritischen Periode der Purkinjezellentwicklung. Zwischen dem ersten und dem vierten Tag nach der Geburt vereinigen sich Purkinjezellen aus zwei bis drei unregelmäßigen Reihen zu einer einzigen Reihe (Ito, 1984) und bilden an dem Ort ihres letztendlichen Verbleibens zuerst GABAerge und dann glutamaterge Synapsen. Dies ist gleichzeitig der Anfang einer weiteren Entwicklungsphase, die bis zum sechsten Tag nach der Geburt anhält, in der sich Purkinjezellen einer dramatischen Veränderung der Morphologie (siehe Abb. 1) und der synaptischen Konnektivität (Altman & Bayer, 1996) unterziehen. In dieser Periode verändern sich Purkinjezellen von einem multipolaren dendritischen Phänotyp in ihre ausgereifte Form mit dem für diese Zelle typischen Dendritenbaum, der dem Zellkörper mit seinem prominenten Hauptdendriten aufsitzt. Die Veränderung der dendritischen

Morphologie geht einher mit einer Abnahme der Anzahl der afferenten Kletterfasern (Mariani & Changeux, 1981). Es ist möglich, dass die synaptische GABA-vermittelte Kalziumsignalgebung, die sich während der Phase der intensivsten synaptischen Reorganisation abspielt, zur Reifung des exzitatorischen Systems der Kletterfasern beiträgt. Ein weiterer Mechanismus, durch den die GABA-vermittelte Kalziumsignalgebung die synaptische Verknüpfung des unreifen Kleinhirns kontrollieren könnte, ist die homosynaptische Selbstpotenzierung der GABAergen Synapsen. Folglich könnten GABA-vermittelte Kalziumsignale an GABAergen Synapsen der Purkinjezellen zu einer Selbstverstärkung durch den von Kano und Mitarbeitern (Kano et al., 1992) beschriebenen Prozess der kalziumabhängigen sogenannten "Reboundpotenzierung" führen. Welche detaillierte Aufgabe die depolarisierende Wirkung von GABA in Purkinjezellen auch immer hat, das enge zeitliche Fenster und die schnelle Verschiebung zum adulten hyperpolarisierenden Antwortverhalten hin machen diesen Mechanismus zu einem attraktiven Modell sowohl für die neuronale Entwicklung als auch für die synaptische Physiologie. Die Bestimmung der $[Cl^-]_i$ als auch die Identifizierung von Chlorid-Transportern während der postnatalen Entwicklung werden die nächsten wichtigen Schritte zum Verständnis der Physiologie des GABAergen Systems im unreifen Kleinhirn sein.

4.5 Bedeutung GABA-vermittelter Kalziumsignale für die neuronale Migration

In der neuronalen Entwicklung wandern unreife Nervenzellen von proliferativen Zentren in ihre Zielregionen. Der exakte Ablauf dieses Prozesses ist wichtig für die reguläre Entwicklung der zellulären Morphologie, der synaptischen Vernetzung und der Funktion (Rakic, 1990).

Nach der letzten mitotischen Teilung migrieren Körnerzellen von der äußeren proliferativen Körnerzellschicht durch die Molekularschicht und die Purkinjzellschicht in ihr Zielgewebe, die innere Körnerzellschicht. Dort bilden sie Synapsen mit den Terminalen glutamaterger Moosfasern und den Axonen GABAerger Golgizellen (Altman & Bayer, 1996). Eine Reihe von Studien, durchgeführt von Komuro und Rakic, haben gezeigt, dass während dieses Migrationsprozesses Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ eine zentrale Rolle spielen. Beispielsweise verlangsamte die Antagonisierung glutamaterger NMDA-Rezeptoren und spannungsabhängiger N-Typ Kalziumkanäle die Körnerzellmigration in Kleinhirnschnitten (Komuro & Rakic, 1992; Komuro & Rakic, 1993). Des Weiteren konnten sie in Mikroexplantatkulturen des Kleinhirns zeigen, dass die Amplitude und die Frequenz intrazellulärer Kalziumsignale korrelieren mit der Rate der Körnerzellmigration. (Komuro & Rakic, 1996). Durch die Abhängigkeit der neuronalen Migrationsrate von dynamischen Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ und die GABA-vermittelte Kalziumsignalgebung in migrierenden Körnerzellen erscheint GABA als möglicher Modulator der neuronalen Migration. In der Tat konnten Behar und Mitarbeiter (Behar et al., 1996) zeigen, dass eine erhöhte Anzahl suspendierter embryonischer kortikaler Nervenzellen entlang eines GABA-Gradienten migrierte in

Abhängigkeit von der $[Ca^{2+}]_i$. Diese Ergebnisse, die die Vermutung stützen, dass GABA über kalziumabhängige Prozesse die neuronale Migration steuert, konnten jedoch nicht *in situ* in Kleinhirnschnitten bestätigt werden. Komuro und Rakic zeigten, dass die Migrationsrate von Körnerzellen durch die Hemmung von GABA_A-Rezeptoren nicht verändert wurde (Komuro & Rakic, 1993). Allerdings wurde diese Untersuchung in der Molekularschicht und nicht in der inneren Körnerzellschicht durchgeführt (Komuro & Rakic, 1993), in der GABA am dritten Tag nach der Geburt erstmals in der Kleinhirnrinde vorkommt (Meinecke & Rakic, 1990). Deswegen sollte der Effekt des GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Bicucullin auf die Körnerzellmigrationsrate in der inneren Körnerzellschicht untersucht werden.

Nicht nur während der Migration, sondern auch in der stationären Phase danach evoziert GABA Kalziumsignale in Körnerzellen. In diesen Zellen geht das zeitliche Interwall, in dem GABA-vermittelte Kalziumsignale verschwinden, einher mit der Ausbildung von Synapsen mit glutamatergen Moosfasern und GABAergen Golgizellen. Wall und Usowicz (Wall & Usowicz, 1997) konnten zeigen, dass in der frühen postnatalen Entwicklung postmigratorische Körnerzellen von Aktionspotentialen abhängige phasische GABAerge Signale erhalten, die wahrscheinlich Golgizellen entstammen. Was könnte die Aufgabe dieser eventuell von Golgizellen ausgehenden GABAergen Kalziumsignale sein?

Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Ausbildung und funktionelle Reifung von Synapsen ein aktivitätsabhängiger Prozess ist, bei dem vor allem das zeitliche Muster der Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ eine entscheidende Rolle spielt (Gu & Spitzer, 1995). Von besonderer Bedeutung bei diesen Reifungsprozessen scheint der Kalziumeinstrom durch glutamaterge NMDA-Rezeptoren sein (Durand et al., 1996). Die besondere Eigenschaft von NMDA-Kanälen ist ihre Blockade durch Mg^{2+} -Ionen

am Ruhemembranpotential (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Eine Aktivierung des NMDA-Rezeptors hat erst bei einer gleichzeitigen Membrandepolarisation eine Öffnung des Kanals zur Folge. Das erklärt, weshalb in den hier vorgestellten Versuchen die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen (1 mM Mg^{2+} in der extrazellulären Lösung) in postmigratorischen Körnerzellen keine oder nur sehr kleine Kalziumsignale hervorrief. Erst die gleichzeitige Aktivierung von $GABA_A$ -Rezeptoren scheint die Membran zu depolarisieren und dadurch den Kalziumeinstrom durch NMDA-Kanäle nach der Aufhebung der Mg^{2+} -Blockade zu ermöglichen. Besonders durch die enge räumliche Nähe von glutamatergen und $GABA$ ergen Synapsen auf Dendriten der Körnerzellen (Jakab & Hamori, 1988) könnte eine koinzidente Aktivierung von $GABA_A$ - und NMDA-Rezeptoren zu robusten Kalziumsignalen als Triggermechanismus der zellulären Reifung führen.

Das Verschwinden $GABA$ -vermittelter Kalziumsignale in Körnerzellen geht wahrscheinlich wie in Purkinjezellen mit einer Verschiebung des $GABA_A$ -Rezeptorgleichgewichtspotentials einher (Eilers et al., 2001). Vor kurzem konnten Messungen an kultivierten Nervenzellen zeigen, dass $GABA$ erge Aktivierung über die Expression von Kalium-Chlorid-Transportern die intrazelluläre $[Cl^-]_i$ und damit das $GABA_A$ -Rezeptor-Gleichgewichtspotential verschiebt (Ganguly et al., 2001). Folglich würde $GABA$ wirken als selbstlimitierender trophischer Faktor während der neuronalen Entwicklung. Allerdings werden erst *in vivo* nähere Versuchsbedingungen die physiologische Relevanz dieses Reifungsmechanismus darstellen können. Gerade sich entwickelnde Körnerzellen in Kleinhirnschnitten erscheinen dabei für die hier dargelegten noch offenen Fragestellungen ein geeignetes Modell zu sein. Dabei könnte neben der funktionellen auch eine

molekulare Untersuchung der entwicklungsabhängigen Expression von Chloridtransportern in Körnerzellen eine große Rolle spielen für das generelle Verständnis der neuronalen Entwicklung.

4.6 GABA- und Glyzin-vermittelte Kalziumsignale *in vivo*

In dieser Arbeit wird ein neuer Ansatz zur *in vivo* Messung von kalziumabhängigen Fluoreszenzsignalen in Neuronen vorgestellt. Durch die Injektion membranpermeabler AM-Kalziumindikatorfarbstoffe wurden innerhalb kurzer Zeit (20-30 min) nahezu alle Neurone des Rückenmarks in intakten vitalen immobilisierten Zebrafischlarven minimalinvasiv beladen. Unter Anwendung der Zwei-Photonen Mikroskopie gelang es, kalziumabhängige Fluoreszenzsignale in einzelnen Neuronen innerhalb des Rückenmarks aufzulösen.

In den letzten Jahren gab es bereits mehrere Ansätze zur Beladung von Neuronen *in vivo*. Fetcho und O'Malley gelang es, Rückenmarks- und Hirnstammneuronen von intakten Zebrafischlarven mit einem dextrangekoppelten Kalziumindikatorfarbstoff zu beladen (Fetcho & O'Malley, 1995). Nach einer Injektion des dextrangekoppelten Kalziumindikatorfarbstoffes in die Muskulatur oder in das Rückenmark wurden Neurone durch passive Diffusion des Farbstoffes entlang der Axone vom Injektionsort innerhalb eines Tages retrograd beladen. Eine ausgedehntere Beladung der Zellen eines ganzen Zebrafisches gelang Cox und Fetcho (Cox & Fetcho, 1996) durch die Injektion dextrangekoppelter Kalziumindikatorfarbstoffe in Zebrafischembryonen im 1-4 Zellstadium. Die Anwendung dieser Methoden resultierte in einer intensiven Beladung unterschiedlicher neuronaler Zelltypen mitsamt axonalen und dendritischen

Fortsätzen. Sie ermöglichte die dynamische Untersuchung von Kalziumsignalen in definierten Rückenmarksneuronen in Abhängigkeit von elektrischer und sensorischer Stimulation.

Mit einem ähnlichen Ansatz gelang es Edwards und Cline (Edwards & Cline, 1999) durch die iontophoretische Applikation eines dextrangekoppelten Kalziumindikatorfarbstoffes in die Retina der *xenopus laevis* Kaulquappe Neurone des Retinotektalen Systems zu beladen. Dies ermöglichte die Messung der Abhängigkeit der intrazellulären Kalziumkonzentration von Lichtreizen in retinalen Axonen.

Ein neues Konzept zur Durchführung von Kalziummessungen *in vivo* ist die Entwicklung transgener, einen endogenen Kalziumindikatorfarbstoff exprimierender Tiere. Dies gelang erstmals Kerr und Mitarbeitern (Kerr et al., 2000) mit der Expression des ratiometrischen Kalziumindikatorproteins Cameleon in Neuronen und Muskelzellen der Nematode *Caenorhabditis elegans*. Das Vorhandensein einer kalziumsensitiven und einer kalziuminsensitiven Domäne des Cameleon erlaubten ratiometrische Messungen transients Änderungen der Kalziumkonzentration auch in Zellen intakter motiler Würmer. Infolgedessen konnten die mit Kontraktionen der Pharynxmuskulatur einhergehenden zellulären Kalziumsignale bestimmt werden. Außerdem wurde die Durchführbarkeit neuronaler Kalziummessungen nach elektrischer Stimulation gezeigt.

In welchen Merkmalen unterscheiden sich die hier erwähnten Methoden dynamischer Kalziummessungen in vitalen intakten Präparaten? Die in dieser Arbeit eingeführte Methode der Injektion von membranpermeablen AM-Kalziumindikatorfarbstoffen in das zu untersuchende Zielgewebe ermöglicht die ausgedehnte Beladung nahezu aller Zellpopulationen. Im Gegensatz dazu scheint

die Injektion von dextrangebundenen Kalziumindikatorfarbstoffen die Beladung einer Subpopulation von Zellen zur Folge zu haben, deren Fortsätze am Injektionsort entlang verlaufen (Fetcho & O'Malley, 1995; Edwards & Cline, 1999). Des weiteren benötigen membranpermeable AM-Kalziumindikatorfarbstoffen eine kurze Inkubationszeit für die zelluläre Beladung von 20 bis 30 Minuten, während für dextrangebundene Kalziumindikatorfarbstoffe in der Literatur Zeiten von 12 Stunden bis zu 2 Tagen beschrieben wurden (Fetcho & O'Malley, 1995; Edwards & Cline, 1999). Im Gegensatz zu diesen Ansätzen liefert die Injektion des dextrangebundenen Kalziumindikatorfarbstoffes Calcium Green Dextran im embryonalen 1-4 Zellstadium eine weitaus globalere Färbung von Zellen im ganzen Zebrafisch (Cox & Fetcho, 1996). Allerdings geht aus einer weiteren Arbeit, in der diese Methode angewandt wurde, hervor, dass der Farbstoff Calcium Green Dextran durch eine Pufferung des intrazellulären Kalzium das axonale Wachstum von Motoneuronen des Rückenmarks hemmt (Ashworth et al., 2001).

Transgene Tiere, die endogene Kalziumindikatorproteine exprimieren, haben eine Reihe vorteilhafter Eigenschaften für Kalziummessungen. Im Falle des von Kerr und Mitarbeitern (Kerr et al., 2000) beschriebenen Cameleon exprimierenden Wurmes *c. elegans* ist die herausragende Eigenschaft sicherlich die intrinsische Beladung von Neuronen gepaart mit der Durchführbarkeit ratiometrischer Kalziummessungen. Dieser Ansatz erscheint geeignet, um die neuronale Aktivität in sich bewegenden Lebewesen zu untersuchen. Allerdings war das Expressionsmuster in den Würmern sehr variabel und die spontanen Fluoreszenzsignale in Neuronen so klein, dass sie von Bewegungsartefakten kupiert wurden. Des weiteren kam es während dieser Messungen zu starkem Bleichen des Farbstoffes (10%/15 sec). Es ist jedoch zu erwarten, dass die Entwicklung neuer

Mutanten des Cameleon zu einer deutlichen Verbesserung sowohl der Expressionsrate, als auch des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses und des Bleichverhaltens während Kalziummessungen führen wird.

Im Vergleich mit den bestehenden Techniken der *in vivo* Kalziummessung liegen die Vorteile der hier vorgestellten Methode der Injektion membranpermeabler AM-Kalziumindikatorfarbstoffe vor allem in der schnellen nichtinvasiven Beladung großer Geweberegionen. Diese Beladungsmethode bietet die idealen Voraussetzungen zur Untersuchung grundlegender Mechanismen der Entwicklung als auch der Signalverarbeitung neuronaler Netzwerke intakter vitaler Tiere.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen außerdem zum ersten Mal GABA- und Glyzin-vermittelte Kalziumsignale *in vivo*. Diese Beobachtung im Rückenmark von Zebrafischlarven bestätigt die Befunde aus Schnittpräparaten verschiedener Gehirnregionen während der neuronalen Entwicklung (zur Übersicht siehe (Leinekugel et al., 1999; Ben-Ari, 2002)).

Basierend auf den hier gezeigten Ergebnissen könnten weitere Untersuchungen Aufschluss geben über die Bedeutung GABA-/Glyzin-vermittelter Kalziumsignale für den exakten Ablauf der neuronalen Entwicklung.

4.7 Zwei-Photonen Messungen dynamischer Chloridänderungen in intakten Neuronen

Die hier vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig Chloridmessungen unter Zwei-Photonen-Anregung. Wie bei Untersuchungen transienter Änderungen intrazellulären Kalziums (Denk et al., 1990) und Natriums (Rose et al., 1999), ermöglicht die Zwei-Photonen-Mikroskopie lange andauernde kontinuierliche Chloridmessungen mit nahezu nicht vorhandenem Bleichen des Farbstoffes und phototoxischen Schäden. Die Verwendung von MQAE bietet sich an für hochauflösende Chloridmessungen wegen der schnellen Diffusion in die Zellen, der hohen Sensitivität und Selektivität für Chlorid. Die grundlegenden Eigenschaften von MQAE ähnelten unter Zwei-Photonen-Anregung denen, die für die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie beschrieben wurden. Beispielsweise ergab sich in den hier gezeigten *in vitro* Kalibrationsexperimenten mit 13 mM ein ähnlicher IC_{50} -Wert wie bei Messungen unter Ein-Photonen-Anregung (Verkman et al., 1989). Obwohl der IC_{50} *in situ* höher war (31 mM), erlaubte es die Sensitivität des Farbstoffes immer noch Veränderungen der $[Cl^-]_i$ im Bereich weniger mM aufzulösen. Folglich bietet unsere Methode eine gute Sensitivität und Selektivität für Chlorid in Verbindung mit einer verbesserten zeitlichen und räumlichen Auflösung, wodurch sie sich gut eignet für schnelle Chloridfluoreszenzmessungen in intakten Nervenzellen.

Vorteilhafte Eigenschaften von MQAE

Wie bereits in der Einführung beschrieben sind zur Zeit nur wenige Farbstoffe für nichtinvasive Chloridmessungen verfügbar. Sie können unterschieden werden in zwei Klassen: diejenigen, die auf einem Chinolium-Ring aufgebaut sind (MQAE und

MEQ) und diejenigen, die sich von *yellow fluorescent protein* ableiten (YFP-H148Q, Clomeleon, V163S). Obwohl MQAE vor über einem Jahrzehnt entwickelt wurde, hat es einige vorteilhafte Eigenschaften gegenüber später entwickelten Farbstoffen. Erstens kann MQAE direkt in der gebrauchsfertigen Form erworben werden und benötigt nur eine kurze Inkubationszeit (10 min) für die Beladung der Gehirnschnitte. Dieses Vorgehen resultiert in einem hellen Fluoreszenzsignal in allen untersuchten Zellen unabhängig vom Alter der Tiere.

Zweitens ist MQAE unter physiologischen Bedingungen insensitive gegenüber Veränderungen des pH und der Bikarbonatkonzentration (siehe auch (Koncz & Daugirdas, 1994)) und beschreibt damit selektiv Änderungen der $[Cl^-]_i$. Im Falle der hydrolysierten Form von MQAE (N-(6-methoxyquinolyl) acetic acid) wurde von Verkman und Mitarbeitern (Verkman et al., 1989) eine pH-Insensitivität oberhalb von 3.5 beschrieben. Diese Beobachtung legt nahe, dass das von MQAE emittierte Fluoreszenzsignal auch unter extremen experimentellen Bedingungen pH-unabhängig ist. Diese Eigenschaft unterscheidet MQAE von der Gruppe der YFP-basierten Chloridfarbstoffen. Beispielsweise hat Clomeleon eine sehr komplexe pH-Sensitivität, die abhängig ist von der $[Cl^-]_i$ (Kuner & Augustine, 2000). Selbst bei geringfügigen pH-Änderungen in der Größenordnung von 0.2 wird der Messfehler in einem Bereich zwischen 10 und 40% liegen in Abhängigkeit von der augenblicklichen $[Cl^-]_i$.

Als weitere vorteilhafte Eigenschaft besitzt MQAE eine hohe Chloridsensitivität. Unter den in dieser Arbeit vorliegenden Versuchsbedingungen besaß MQAE eine Dissoziationskonstante (IC_{50}) von 13 mM in der Küvette und 31 mM in Zellen. Dieser Unterschied rührt wahrscheinlich aus der im Vergleich zur Küvettenlösung intrazellulär größeren Viskosität und Polarität, die in einer

erniedrigten Chloridsensitivität resultiert (Jayaraman & Verkman, 2000). Außerdem unterliegt MQAE der Hydrolyse durch intrazelluläre Esterasen, deren Produkt, N-(6-methoxyquinolyl) acetic acid, eine geringfügig niedrigere Chloridsensitivität besitzt (Verkman et al., 1989; Koncz & Daugirdas, 1994). Allerdings ist der in dieser Studie intrazellulär ermittelte IC_{50} -Wert immer noch kleiner als die IC_{50} -Werte der anderen zur Zeit verfügbaren Chloridfluoreszenzfarbstoffe (Inglefield & Schwartz-Bloom, 1997; Kuner & Augustine, 2000; Galletta et al., 2001). Aus diesem Grunde scheint MQAE der Farbstoff zu sein, der für die Messung kleiner Veränderungen der $[Cl^-]_i$, beispielsweise in Folge synaptischer Aktivierung von GABA- oder Glyzin-Rezeptoren, am besten geeignet ist.

Messungen dynamischer Veränderungen der $[Cl^-]_i$

Physiologische Veränderungen intrazellulärer Ionenkonzentrationen geschehen oft innerhalb weniger Millisekunden, was an das Messverfahren den Anspruch der hohen zeitlichen Auflösung stellt. Die hier vorgestellte Technik ist bestens geeignet, diesem Anspruch gerecht zu werden. Zum einen reagiert MQAE auf eine veränderte $[Cl^-]_i$ innerhalb < 1 ms mit einem Fluoreszenzsignal (Verkman et al., 1989) und ist damit ein ungefähr 100mal schnellerer Chloridindikator als beispielsweise Clomeleon (Kuner & Augustine, 2000) oder V163S (Galletta et al., 2001). Außerdem liegt den Fluoreszenzänderungen von MQAE ein kollisionaler Abdämpfungsmechanismus zugrunde, der eine Chloridbindung durch das Farbstoffmolekül ausschließt (Verkman, 1990). Infolgedessen wird Chlorid durch MQAE nicht gepuffert, sodass eine Erhöhung der intrazellulären Farbstoffkonzentration in einem verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnis resultiert ohne Veränderungen des Zeitverlaufes der Chloridsignale.

Zum anderen geht die Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie im Vergleich zur Ein-Photonen Anregung mit deutlich verringerten photochemischen Gewebeschäden, einer geringeren Lichtbrechung innerhalb des Gewebes und damit mit einer deutlich höheren räumlichen Auflösung einher. Infolge des nicht vorhandenen starken Bleichen des Farbstoffes, das in der Vergangenheit schnelle dauerhafte Chloridmessungen verhinderte (Kaneko et al., 2001), war es mit der hier vorgestellten Methode möglich, Messungen an einzelnen Zellen und Zellkompartimenten kontinuierlich mit einer Frequenz von 1 Hz durchzuführen, wobei es während einer Stunde nur zu 10% Fluoreszenzabfall durch Bleichen des Farbstoffes kam. Beispielsweise erzeugten Messungen mit einer 10fach niedrigeren Bildwiederholungsrate bei Ein-Photonen Anregung einen Fluoreszenzabfall von mehr als 40% in weniger als 10 min (Kaneko et al., 2001). Starkes Bleichen des Farbstoffes limitierte bisher auch kontinuierliche Chloridmessungen mit MEQ (Inglefield & Schwartz-Bloom, 1997). Zur Vermeidung starken Bleichens durch eine Anregung im UV-Bereich wurden bisherige Chloridmessungen in Gehirnschnitten durchgeführt mit Intervallen von 30 sec bis 5 min zwischen einzelnen Datenmesspunkten, was nur die Erfassung von Prozessen ermöglichte, die sich über den Zeitraum mehrerer Minuten abspielten (Schwartz & Yu, 1995; Inglefield & Schwartz-Bloom, 1997; Fukuda et al., 1998; Inglefield & Schwartz-Bloom, 1998; Sah & Schwartz-Bloom, 1999). Die hier vorgestellte Methode macht es möglich, schnelle kontinuierliche Chloridmessungen durchzuführen, die nur durch die technischen Eigenschaften des Scanners limitiert sind.

Hochauflösende Chloridmessungen in Gehirnschnitten

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden Chloridmessungen durchgeführt mit MEQ, einem weiteren Chinolium-basierten, im UV-Bereich angeregten Chloridfarbstoff. Wie bereits erwähnt (siehe Einführung) muss dieser Farbstoff direkt vor der Beladung der Zellen zu der membranpermeablen Form dihydro-MEQ reduziert werden, wobei er im oxidierten Zustand vergleichsweise lange im Zytosol verbleibt mit einer Bleichrate von ungefähr 10% in der Stunde (Bowers & Verkman, 1991). In den bisherigen Studien konnten hippokampale, neokortikale und zerebelläre Nervenzellen mit diesem Farbstoff beladen und mit der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie gemessen werden (Schwartz & Yu, 1995; Inglefield & Schwartz-Bloom, 1997; Fukuda et al., 1998; Sah & Schwartz-Bloom, 1999). Dieses Vorgehen erlaubte die deutliche Darstellung neuronaler Somata und initialer dendritischer Segmente, während distale Anteile des Dendritenbaumes nicht sichtbar waren. Im Gegensatz dazu ermöglichte die Anwendung der Zwei-Photonen Mikroskopie die Darstellung von sekundären und tertiären Dendriten, die bis zu 120 μm vom Zellkörper entfernt waren (siehe Abb. 20B). Des Weiteren war es möglich, an diesen feinen Strukturen funktionelle Studien durchzuführen.

Die hochauflösenden Messungen zeigten auch eine inhomogene Verteilung der Fluoreszenzintensität innerhalb des Zytosols vieler Nervenzellen. Dieser Heterogenität liegt wahrscheinlich eine erhöhte Affinität von MQAE zu subzellulären Strukturen zugrunde. Es scheint, dass die derart „geclusterten“ MQAE-Moleküle frei für Chlorid zugänglich sind, da infolge einer GABA_A -Rezeptor-Aktivierung die Fluoreszenzänderung in allen Bereichen der Zelle homogen ist. Von Kaneko und Mitarbeitern (Kaneko et al., 2001) wurde erwähnt, dass diese Art der Affinität zu subzellulären Strukturen charakteristisch sei für die Klasse der

Methoxychinoliniumverbindungen und folglich auch für MEQ. In der Tat erscheint eine ähnliche Fluoreszenzverteilung auch in der Veröffentlichung von Inglefield und Schwartz-Bloom ((Inglefield & Schwartz-Bloom, 1997), siehe dortige Abb. 1A).

Interessanterweise konnten im Gegensatz zu einer Reihe von Kalziumindikatorfarbstoffen auch Nervenzellen in Gehirnschnitten von 14 bis 16 Tage alten Tieren ohne weiteres mit Farbstoff beladen werden. Ein Vergleich der Fluoreszenzintensität zwischen Zellkörpern und Dendriten in diesen Versuchspräparaten zeigte, dass sich Dendriten durchschnittlich 30% dunkler darstellten. Ähnliche Beobachtungen wurden von Hara und Mitarbeitern (Hara et al., 1992) in kultivierten hippokampalen Nervenzellen und von Inglefield und Schwartz-Bloom (Inglefield & Schwartz-Bloom, 1997) in Hippokampusgewebeschnitten berichtet. Die Autoren erklärten ihre Beobachtung durch das Vorhandensein eines intrazellulären Chloridgradienten entlang der somatodendritischen Achse. Obwohl der hier beschriebene Gradient der Fluoreszenzintensität im Falle der nicht-ratiometrischen Farbstoffe MQAE und MEQ aus einer ungleichen Farbstoffverteilung innerhalb der Zelle resultieren kann, scheint diese Erklärung eher unwahrscheinlich, da ähnliche Beobachtungen auch bei der Benutzung des ratiometrischen Farbstoffes Clomeleon (Kuner & Augustine, 2000) erfolgten. In kultivierten hippokampalen Clomeleon exprimierenden Nervenzellen konnte in dieser Studie eine graduelle Zunahme der $[Cl^-]_i$ von 7.9 mM im Zellkörper zu 25 mM in den periphersten Dendriten nachgewiesen werden (Kuner & Augustine, 2000). Da die hier dargestellte Methode hochauflösende Chloridmessungen in intakten Nervenzellen und ihren Fortsätzen in einem beinahe ausgereiften Entwicklungsstadium ermöglicht, könnte sie dazu beitragen, die Entstehung dieses

Gradienten und damit auch dessen Bedeutung für die neuronale Integration aufzuklären.

Grenzen des methodischen Ansatzes

Trotz der vielfältigen Vorteile hat die hier beschriebene neue Technik auch einige deutliche Beschränkungen. Erstens ist MQAE kein ratiometrischer Farbstoff, weshalb man sich während eines Experimentes versehen sollte vor Fluoreszenzsignalen infolge von Veränderungen des zellulären Volumens und der Farbstoffkonzentration als auch vor einer Instabilität des Anregungslichtes. In der Vergangenheit unternahmen Jayaraman und Kollegen Versuche, Chinolium-basierte ratiometrische Chloridindikatoren durch die Konjugation chloridsensitiver und chloridinsensitiver Farbstoffmoleküle mit unterschiedlichen „Spacern“ zu synthetisieren (Jayaraman et al., 1999). Leider war die Helligkeit und die Chloridsensitivität dieser ratiometrischen Farbstoffe im Vergleich zu MQAE und MEQ deutlich reduziert. Außerdem konnten Zellen nur mit einem dieser neuen Farbstoffe, Mqa4AQ, nichtinvasiv beladen werden durch den gleichen Reduktions-/Oxidationsmechanismus wie MEQ. Neben der Notwendigkeit, den Farbstoff direkt vor der Ladeprozedur zu synthetisieren, zeigte sich eine viermal geringere Chloridsensitivität als bei MQAE. Des Weiteren ist dieser Farbstoff zur Zeit nicht kommerziell verfügbar und muss deshalb selbst synthetisiert werden. Eine weitere Möglichkeit ratiometrischer Chloridmessungen besteht in der Anwendung von Clomeleon (Kuner & Augustine, 2000). Trotz aller Vorteile eines ratiometrischen Farbstoffes besitzt Clomeleon im Vergleich zu MQAE eine deutlich verringerte Chloridsensitivität ($IC_{50} = 160 \text{ mM}$), es puffert Chlorid durch seine Bindung, es ist pH-sensitiv und hat eine ungefähr 100mal langsamere Bindungskinetik (Verkman et al.,

1989; Kuner & Augustine, 2000). In der Originalarbeit wurden die Zellen durch einen Gentransfer (Elektroporation mit einem Clomeleon-kodierenden Plasmid) mit Clomeleon beladen. Dieses Vorgehen benötigte 24 Stunden für die Proteinexpression und ist deshalb nicht geeignet für Messungen in akuten Gehirnschnitten.

Ein anderer Nachteil MQAE-basierter Chloridmessungen ist die relativ hohe Leckrate des Farbstoffes, die den Farbstoffverlust aus der Zelle über die Zellmembran im Verlauf des Experimentes beschreibt. Diese Leckrate scheint im Falle von MQAE abhängig zu sein von der Art der Präparation und bewegt sich in einem Bereich von 3 %/h in Liposomen (Verkman et al., 1989) bis zu 30 %/h in den hier vorgestellten Versuchen. Wie zu erwarten bei einer lipophilen Substanz ist die Leckrate temperaturabhängig mit einem Q_{10} von 1.44. Es wäre zu erwarten, dass das membranimpermeable MEQ deutlich besser in Zellen gehalten wird, als MQAE. In der Arbeit, die diesen Farbstoff einführte, betrug die Leckrate in Fibroblasten < 10 %/h (Bowers & Verkman, 1991). Die Leckrate für Nervenzellen in Gehirnschnitten ist allerdings bisher noch nicht untersucht worden und kann deshalb mit der von MQAE nicht verglichen werden. Allerdings bemerkten Fukuda und Mitarbeiter eine starke Temperaturabhängigkeit der Leckrate von MEQ, die in neokortikalen Zellen bei 34°C besonders stark ausgeprägt war (Fukuda et al., 1998).

Zusammenfassend bietet die MQAE-basierte Zwei-Photonen-Mikroskopie erstmalig die Möglichkeit, schnelle kontinuierliche Messungen dynamischer Veränderungen der $[Cl^-]_i$ in intakten Nervenzellen durchzuführen. Obwohl diese Methode zur Untersuchung der Chloridhomöostase in Nervenzellen in akuten Gehirnschnitten entwickelt wurde, kann sie erfolgreich angewendet werden in allen

Versuchen, in denen eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung der Chloridmessung erforderlich ist.

4.8 Mögliche Konsequenzen für die klinische Therapie

Der Neurotransmitter GABA hemmt im reifen Gehirn neuronale Aktivität. Diese Hemmung kann durch eine Reihe von Pharmaka verstärkt werden, die direkt oder indirekt an GABA-Rezeptoren wirken. Dabei kommt es zur positiven Modulation am Rezeptor (Benzodiazepine, Barbiturate, Valproat, Topiramate), zur Erhöhung der extrazellulären Konzentration von GABA durch eine erhöhte Freisetzung (Gabapentin) oder zur Hemmung des Abbaus (Vigabatrin, Tiagabin) (Czuczwar & Patsalos, 2001). In der klinischen Therapie werden diese Substanzen unter anderem zur Behandlung von Epilepsien, von Angst- und Spannungszuständen und von Schlafstörungen eingesetzt. Wegen der entgegengesetzten Wirkung von GABA auf die Aktivität im unreifen Nervengewebe stellt sich die Frage, ob die Einnahme dieser Substanzen während einer Schwangerschaft zu einer Beeinflussung der Reifung des kindlichen Gehirns führt. Einige Studien berichteten ein erhöhtes Vorkommen teratogener Schäden infolge von Benzodiazepinen während der Schwangerschaft (Laegreid et al., 1990; Bergman et al., 1992). Allerdings bestand laut Aussage der Autoren kein eindeutiger kausaler Zusammenhang zwischen Benzodiazepinen und teratogenen Schäden, da häufig ein gleichzeitiger Mißbrauch von Alkohol und einer Reihe anderer Substanzen vorlag (Bergman et al., 1992).

Deutlichere Hinweise auf die Folgen einer pränatalen Exposition mit Benzodiazepinen auf die Gehirnentwicklung geben Studien an Tiermodellen. Beispielsweise beeinflussten trächtigen Ratten verabreichte Benzodiazepine die

Verhaltensentwicklung der Nachkommen bis in deren Erwachsenenalter. Es kam unter anderem zu einer erhöhten Aggressionsbereitschaft (Singh et al., 1998) und veränderten Bewegungs- und Eßgewohnheiten (Fiore et al., 1995). Molekularbiologische Untersuchungen an Rattengehirnen zeigten, dass der intrauterine Kontakt mit Benzodiazepinen eine veränderte Expression der mRNA von GABA-Rezeptoruntereinheiten in Feten zur Folge hatte (Roberts et al., 2001). Zusätzlich kam es in adulten Tieren zu einer verminderten Expression des Wachstumsfaktors BDNF (Kellogg et al., 2000).

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass eine Pharmakotherapie mit Tranquillantien und Antiepileptika in einem Reifestadium, in dem GABA Kalziumsignale in Nervenzellen hervorruft, deutliche Folgen für die Langzeitentwicklung des Gehirns haben kann.

5. Anhang

5.1 Beschreibung der Konzentrationsabhängigkeit Chlorid-vermittelter Fluoreszenzänderungen

Die von MQAE emittierte Gesamtfluoreszenz setzt sich zusammen aus der Fluoreszenz, die emittiert wird von ungebundenem (F_f) und chloridgebundenem MQAE (F_b).

$$F = F_f + F_b$$

Folglich ist die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Konzentration des freien [MQAE_f] und des chloridgebundenen MQAE [MQAE_b] gegeben durch die Gleichung

$$F = S_f * [MQAE_f] + S_b * [MQAE_b] \quad (2)$$

, in der S_f und S_b die Proportionalitätskoeffizienten für freien und gebundenen Farbstoff sind [Grynkiewicz, 1985 #76]. Die maximale Fluoreszenz ist demnach

$$F_0 = S_f * ([MQAE_f] + [MQAE_b]) \quad (3)$$

Die normalisierte Fluoreszenz wird beschrieben durch

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F_0 - F}{F_0}$$

Einfügen von F_0 und F aus (2) und (3) führt zu

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{S_f - S_b}{S_f * \frac{MQAE_f}{MQAE_b} + S_f} \quad (4)$$

In Anbetracht der Tatsache, dass MQAE und Chlorid einen 1:1 Komplex bilden [Verkman, 1989 #11] wird das Bindungsverhalten in Analogie zur Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben:

$$\frac{MQAE_f}{MQAE_b} = \frac{K_d}{[Cl^-]}, \quad (5)$$

hierbei ist IC_{50} die Dissoziationskonstante. Die Gleichungen (4) und (5) ergeben

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{(1 - \frac{S_b}{S_f}) * [Cl^-]}{K_d + [Cl^-]} \quad (6)$$

wenn $[Cl^-] \rightarrow \infty$, dann gilt

$$\lim \frac{\Delta F}{F_0} = (1 - \frac{S_b}{S_f}) \quad (7)$$

Dieser Koeffizient wird bezeichnet als $(\frac{\Delta F}{F_0})_{\max}$.

Die Gleichungen (6) und (7) ergeben

$$\frac{\Delta F}{F_0} = (\frac{\Delta F}{F_0})_{\max} * \frac{[Cl^-]}{K_d + [Cl^-]} \quad (8)$$

Diese Gleichung wurde angewandt um die Daten in Abb. 17A und 18B mit einer Näherungsfunktion zu beschreiben. Aus der Lineweaver-Burk-Darstellung ($\frac{1}{\frac{\Delta F}{F_0}}$ gegen $\frac{1}{[Cl^-]}$) ergaben sich für $(\frac{\Delta F}{F_0})_{\max}$ und

IC_{50} 1 und 13 mM.

Alternativ kann der IC_{50} durch eine Stern-Volmer-Darstellung ermittelt werden unter der Annahme, dass $(\frac{\Delta F}{F_0})_{\max}$ gleich 100% ist. Folglich ergibt Gleichung (8)

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{[Cl^-]}{K_d + [Cl^-]}$$

Weiteres Umformen ergibt

$$1 - \frac{F}{F_0} = \frac{[Cl^-]}{K_d + [Cl^-]} \text{ und}$$

$$\frac{F_0}{F} = \frac{[Cl^-]}{K_d} + 1.$$

Ersetzen von $1/K_d$ durch die Stern-Volmer-Konstante K_{SV} ergibt die Stern-Volmer-Gleichung:

$$\frac{F_0}{F} = K_{SV} * [Cl^-] + 1$$

Bei einer Darstellung der Datenpunkte als $\frac{F_0}{F}$ gegen $[\text{Cl}^-]$ entspricht die Steigung der Näherungsgerade K_{SV} .

5.2 Originalarbeiten

GABA-mediated Ca^{2+} signalling in developing rat cerebellar Purkinje neurones

Jens Eilers*, Tim D. Plant, Nima Marandi and Arthur Konnerth

*Institut für Physiologie, Ludwig-Maximilians Universität München, 80802 München
and * Abteilung Neurophysiologie, Max-Planck-Institut für Hirnforschung,
60528 Frankfurt, Germany*

(Resubmitted 2 April 2001; accepted after revision 22 June 2001)

1. Cellular responses to GABA_A receptor activation were studied in developing cerebellar Purkinje neurones (PNs) in brain slices obtained from 2- to 22-day-old rats. Two-photon fluorescence imaging of fura-2-loaded cells and perforated-patch recordings were used to monitor intracellular Ca^{2+} transients and to estimate the reversal potential of GABA-induced currents, respectively.
2. During the 1st postnatal week, focal application of GABA or the GABA_A receptor agonist muscimol evoked transient increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in immature PNs. These Ca^{2+} transients were reversibly abolished by the GABA_A receptor antagonist bicuculline and by Ni^{2+} , a blocker of voltage-activated Ca^{2+} channels.
3. Perforated-patch recordings were used to measure the reversal potential of GABA-evoked currents (E_{GABA}) at different stages of development. It was found that E_{GABA} was about -44 mV at postnatal day 3 (P3), it shifted to gradually more negative values during the 1st week and finally equilibrated at -87 mV at around the end of the 2nd postnatal week. This transition was well described by a sigmoidal function. The largest change in E_{GABA} was -7 mV day^{-1} , which occurred at around P6.
4. The transition in GABA-mediated signalling occurs during a period in which striking changes in PN morphology and synaptic connectivity are known to take place. Since such changes were shown to be Ca^{2+} dependent, we propose that GABA-evoked Ca^{2+} signalling is one of the critical determinants for the normal development of cerebellar PNs.

In the developing brain, neuronal gene expression (LoTurco *et al.* 1995), differentiation (Marty *et al.* 1996), migration (Komuro & Rakic, 1993) and synapse maturation (Spoerri, 1988) are regulated by transient changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Remarkably, these processes occur at a developmental stage at which in many regions of the brain the excitatory glutamatergic connectivity is sparse and weak, or even not yet established (e.g. Durand *et al.* 1996). Instead, GABA, which acts as the main inhibitory neurotransmitter in the mature brain, seems to provide the dominating excitatory drive in at least some regions of the developing central nervous system (for review see Leinekugel *et al.* 1999). Clear evidence of such a depolarising role of GABA has been obtained in the hippocampus, cortex, striatum, spinal cord, hypothalamus, retina, olfactory bulb (for review see Cherubini *et al.* 1991) and, more recently, the brainstem (Brockhaus & Ballanyi, 1998). In some instances, GABA-mediated excitation appears to be sufficiently strong to trigger increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Yuste & Katz, 1991; Wang *et al.* 1994; Owens *et al.* 1996; Kulik *et al.* 2000) and thereby perhaps to provide the cellular signals needed for normal development (Barker *et al.* 1998). Despite a

considerable amount of information concerning this apparently paradoxical property of GABAergic function, the accurate time course of the postnatal switch in GABA responsiveness has not yet been established in any type of neurone. Thus, related studies either focused only on the transition (e.g. Wu *et al.* 1992) or were performed on cultured neurones (e.g. Wang *et al.* 1994), a preparation that does not allow a faithful correlation with the postnatal development *in vivo*.

Moreover, little is known about the action of GABA on the various cell types in the developing cerebellum (Brickley *et al.* 1996). The cerebellum, which is remarkably immature at birth (Woodward *et al.* 1971), undergoes a striking period of maturation that lasts for about 2–3 weeks. This includes, as its most prominent features, the migration of granule cells from the outer germinal layer to the inner granule layer and a massive formation of synapses between the various cell types of the cerebellar cortex (for overview see Altman & Bayer, 1996). Purkinje neurones (PNs), the principal neurones of the cerebellar cortex, also undergo marked morphological and functional

changes during the first 2 postnatal weeks. They merge from two to three irregular rows into a single layer, evolve an extensive dendritic tree, and undergo a characteristic cycle of elimination of redundant climbing fibre (CF) synapses, followed by the formation of a large number of parallel fibre synapses (Woodward *et al.* 1971; Ito, 1984). In the study described here, we quantified the responsiveness of PNs to GABA during this early stage of massive synaptic reorganisation by using two-photon fluorescence microscopy (Denk *et al.* 1990) and perforated-patch recordings (Abe *et al.* 1994; Reichling *et al.* 1994; Owens *et al.* 1996).

METHODS

Electrophysiological and fluorometric recordings were performed at room temperature (21–22 °C) on visually identified PNs in cerebellar slices taken from 2- to 22-day-old Wistar rats. During recordings, slices were perfused with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ and 20 glucose, bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.3–7.4.

Tissue preparation

The animals were decapitated and the cerebella rapidly removed, in accordance with the rules of the institutional ethics committee. The tissue was placed in cold (0–2 °C) ACSF and 200 μm-thick parasagittal slices were cut with a vibratome. These slices were kept for 45 min at 37 °C and then at 20 °C in ACSF.

Ca²⁺ imaging

Changes in [Ca²⁺]_i in response to focal applications of GABA, the GABA_A agonist muscimol, or glutamate (all 100 μM in ACSF) were recorded in PNs loaded with the membrane-permeant Ca²⁺ indicator dye acetoxymethyl ester fura-2 (fura-2 AM, Molecular Probes). The slices were loaded for 15 min at 37 °C with 15 μM fura-2 AM (from a 5 mM stock solution in DMSO with 10% Pluronic; Molecular Probes). After wash-out of fura-2 AM, the Ca²⁺-dependent fluorescence was monitored with a custom-built two-photon imaging system (Denk *et al.* 1990) consisting of a Ti:sapphire laser system (Millenia and Tsunami, both from Spectra Physics; 780 nm excitation, < 100 fs pulse width) and a scanhead (MRC 1024, BioRad) mounted on an upright microscope (BX 50 WI, Olympus). During the experiments, 500 nM tetrodotoxin (TTX) was added to the bath solution. Fluorescence data were taken from the somatic region excluding the nucleus (see Fig. 1D and F) and are expressed as the background-corrected decrease in fluorescence divided by the prestimulus fluorescence (i.e. $-\Delta F/F$). Fluorescence images (Fig. 1A–C and F) were obtained by performing a maximum projection of 4–16 images taken at different *z* positions.

Gramicidin perforated-patch recordings

GABAergic currents were recorded with an EPC9 patch-clamp amplifier (HEKA, Lambrecht, Germany) using the perforated-patch technique. The chloride-impermeable ionophore gramicidin (gramicidin D, Dubos, Sigma) was chosen so as not to influence [Cl⁻]_i (Abe *et al.* 1994; Reichling *et al.* 1994). The bath solution consisted of ACSF to which 10 μM 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, 50 μM D-2-amino-5-phosphopentanoic acid and 500 nM TTX were added. The standard pipette solution into which the tip of the pipette was immersed for 5–7 s contained 150 mM KCl and 10 mM Hepes. The pipette was then back-filled with the same solution to which 25 μg ml⁻¹ of gramicidin had been added (from a 25 mg ml⁻¹ stock solution in DMSO). In one-third of the recordings, the fluorescent dye

lucifer yellow (0.5 mg ml⁻¹) was added to the pipette solution and standard epifluorescence imaging was used to rule out spontaneous rupturing of the patch membrane.

Throughout the experiments, the series resistance (*R_s*) was monitored by measuring the peak current in response to a small hyperpolarising voltage pulse. When *R_s* reached 100 MΩ, the resting potential of the cell was determined by estimating the zero-current potential. Recordings of GABAergic responses were started when *R_s* was lower than 25 MΩ. GABA (10 μM in ACSF) was applied focally by brief pressure application (5–20 ms, ~70 kPa; Picospritzer, General Valve, Fairfield, NJ, USA) from a pipette with a resistance of 4–6 MΩ that was positioned close to the soma. The resulting currents, filtered at 3 kHz, were sampled at 5 kHz. Two additive components of the liquid junction potential need to be considered during such recordings: one component between the pipette and the bath solution (while the pipette was in the bath and the amplifier was zeroed), and the second one between the pipette solution and the intracellular environment (during the actual recording). The first one was measured to be 3 mV and was subtracted offline, the second one was calculated to be less than 1 mV (assuming 140 mM [K⁺]_i and 10 mM [Na⁺]_i) and was neglected. *R_s* correction of the membrane potential was performed offline. Unless otherwise noted, all chemicals were purchased from Sigma. Data analysis was performed using Igor Pro software (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). Data are expressed as means ± S.E.M.

RESULTS

GABA_A receptor-mediated Ca²⁺ transients in immature PNs

For investigating GABA-mediated Ca²⁺ signalling in intact cerebellar PNs, we used the membrane-permeable fluorometric Ca²⁺ indicator dye fura-2 AM and two-photon imaging (Denk *et al.* 1990). Immediately after staining, PNs near the top surface of acute cerebellar slices from immature rats were readily detected (Fig. 1A–D). They were identified unambiguously even in the absence of the elaborate dendritic tree, their characteristic feature later in development (compare Fig. 1C and F), based on their relative position within the slice, their size and their typical shape (Altman & Bayer, 1996). The two-photon imaging approach ensured that fluorescence signals were sampled exclusively from the neurone of interest and not from surrounding cells. It should be noted that staining of PNs, even within the immature cerebellar tissue, was less effective than that of other cell types, like for example that of cerebellar granule cells (Fig. 1B).

Brief (100–1000 ms) applications of GABA (100 μM in the application pipette), pressure-ejected focally onto individual cells, evoked transient increases in [Ca²⁺]_i in immature PNs (Fig. 1D). The rise time of the transients was confined to the duration of the GABA application. The transients decayed exponentially with a time constant of about 2–4 s. Repetitive stimulation produced responses that were stable in both their amplitude and their kinetics (see Fig. 2A and D) when the interval between GABA applications was at least 2 min. GABA-receptor activation reliably evoked Ca²⁺ transients in PNs from 3- to 6-day-old (P3–6) animals. While the amplitudes of

GABA-evoked Ca^{2+} transients were dependent on many factors including the relative position of the tip of the application pipette and the parameters of the application pulse, most responses had an amplitude of more than

$\sim 5\%$ $-\Delta F/F$ and were clearly resolved from the intrinsic noise of the fluorescence recordings (root-mean-square value $< 2.5\%$). Due to the spectral properties of two-photon-excited fura-2 (Xu *et al.* 1996), ratiometric

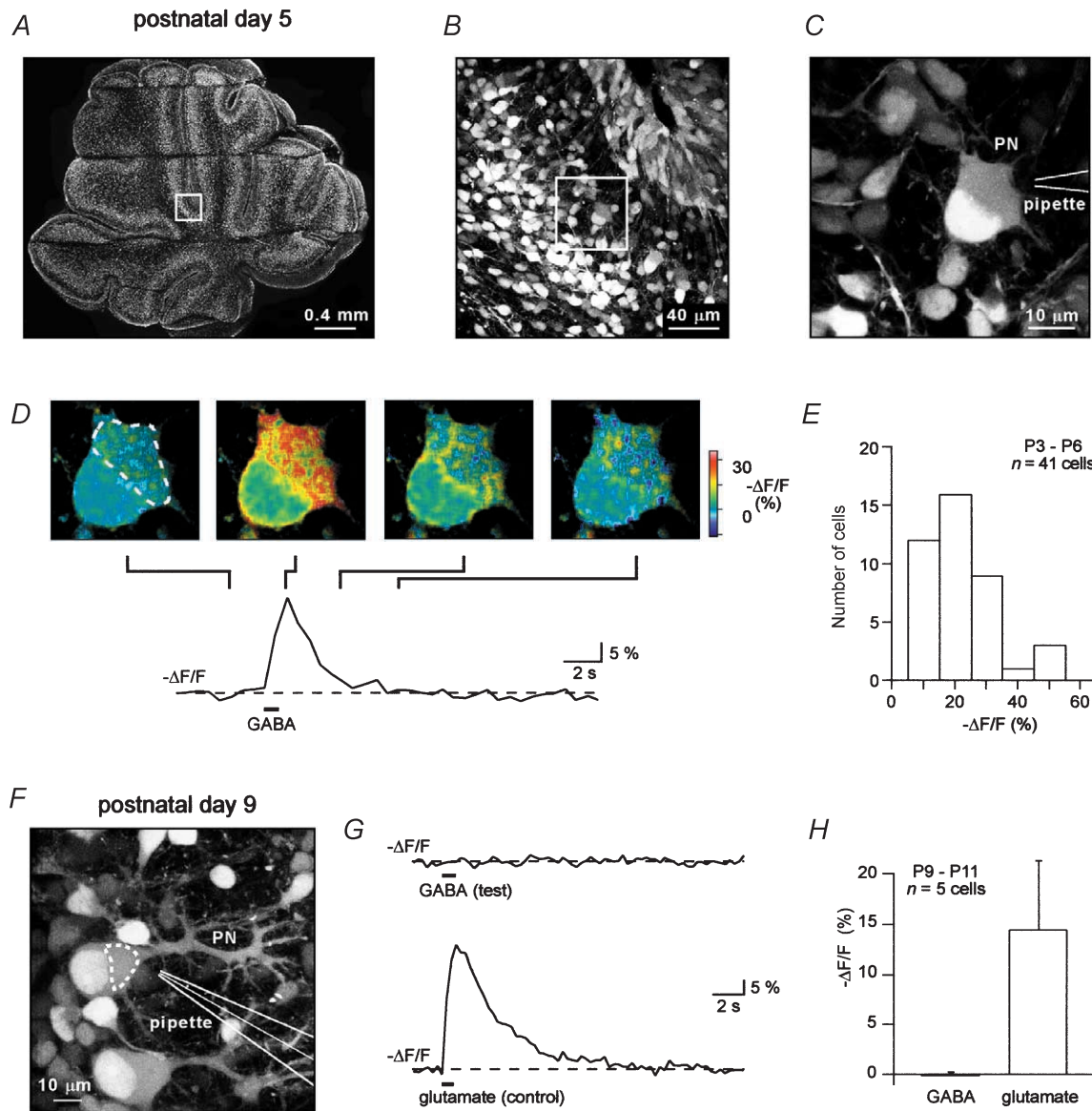


Figure 1. GABA-mediated Ca^{2+} transients in immature PNs

A–C, two-photon fluorescence images of a cerebellar slice from a 5-day-old rat (P5) loaded with the Ca^{2+} indicator dye fura-2 AM. The images were taken at increasingly higher magnification ($\times 2.5$, $\times 10$ and $\times 60$ objective in *A–C*, respectively) at the locations indicated by rectangles in *A* and *B*. The slice was immobilised by thin nylon threads that caused the three horizontal indentations visible in *A*. In *C*, a single Purkinje neurone (PN) is shown. The position of the pipette that was used for puff application of GABA is indicated. Note that the bright structure within the cell body of the PN represents the nucleus, which appears characteristically enlarged and swollen at this stage of development. *D*, brief applications of $100\ \mu\text{M}$ GABA evoked a transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Top, colour-coded images of $[\text{Ca}^{2+}]_i$; bottom, time course of the transient recorded in the region outlined in the top left image. *E*, bar graph showing the peak amplitudes of the fluorescence transients evoked by application of GABA or the GABA_A receptor agonist muscimol. *F*, fluorescence image of a PN from a P9 rat. The position of the double-barrelled pipette that was used for puff application of GABA and glutamate is indicated on the right. *G*, brief applications of GABA did not evoke any Ca^{2+} transients, while a clear Ca^{2+} signal resulted from the application of glutamate ($100\ \mu\text{M}$). *H*, bar graph summarising the results of five such experiments.

recordings, as routinely performed with single-photon excitation, were not possible. Thus, no absolute quantification of the changes in $[Ca^{2+}]_i$ was feasible under our recording conditions. Nevertheless, from the *in vitro* Ca^{2+} sensitivity of fura-2 (Grynkiewicz *et al.* 1985; Xu *et al.* 1996) we estimated that the largest Ca^{2+} transients ($> 50\% -\Delta F/F$, Fig. 1E) reached micromolar values and that even the 'small' responses reached peak levels of $[Ca^{2+}]_i$ of several hundred nanomolar.

Only a few postnatal days later, GABA applications no longer evoked Ca^{2+} transients. Figure 1F and G shows a representative experiment obtained in a cerebellar slice from a 9-day-old rat. In these experiments we used double-barrelled application pipettes to apply alternately GABA and glutamate (100 μM), the latter serving as a control for the cell's viability. While glutamate

applications evoked Ca^{2+} transients in all cells tested, GABA invariably failed to produce detectable responses at stages later than P8 (Fig. 1G and H).

Mechanisms underlying GABA-evoked Ca^{2+} transients

The GABA_A receptor-specific agonist muscimol (Bowery *et al.* 1983) was as effective in generating Ca^{2+} signals as GABA, with no apparent difference in the kinetics of the evoked transients (compare, for example, Fig. 2B and E). Furthermore, as shown in Fig. 2A–C, the competitive GABA_A receptor-specific antagonist bicuculline reversibly suppressed GABA-evoked Ca^{2+} transients (average block of $92 \pm 8\%$ of the initial amplitude; $n = 5$). Thus, GABA-evoked Ca^{2+} signalling requires the activation of GABA_A receptors. We next tested whether voltage-operated Ca^{2+} channels (VOCCs) were activated during GABAergic

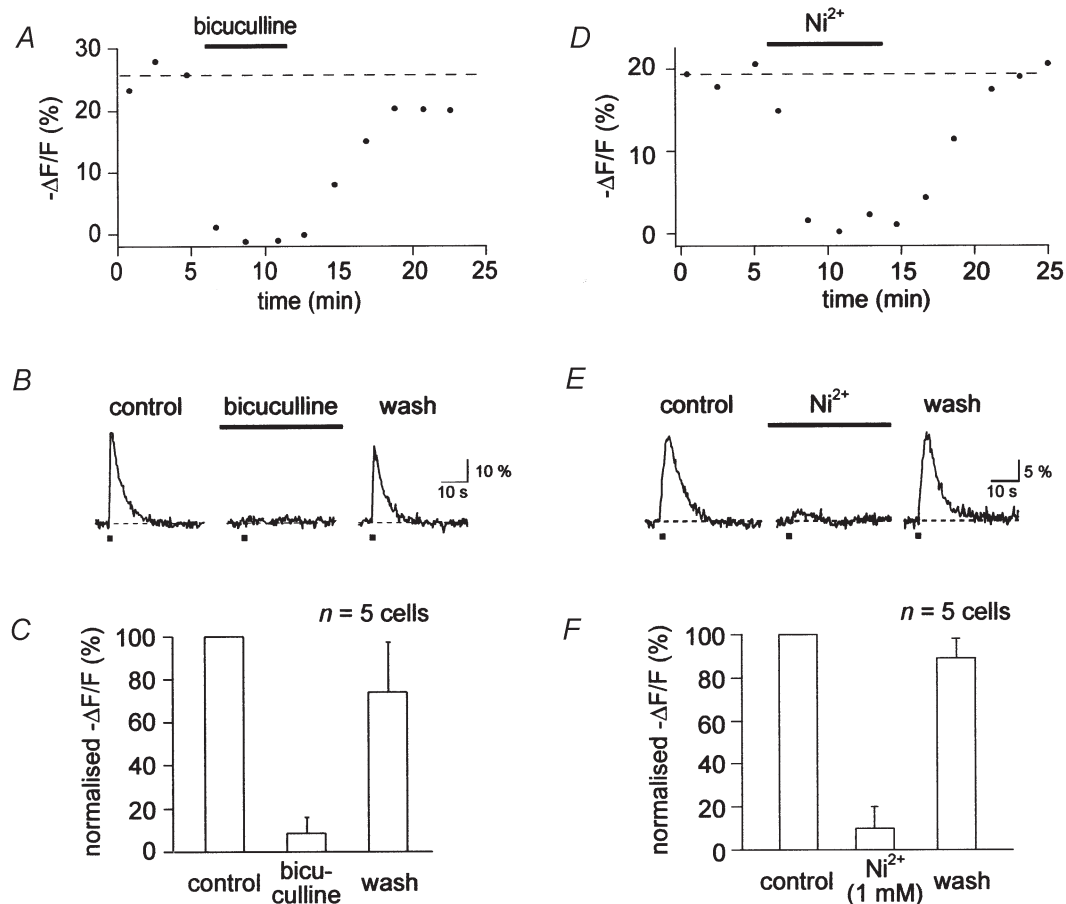


Figure 2. Pharmacological properties of GABA-mediated Ca^{2+} transients

A, plot of peak amplitudes of Ca^{2+} responses in an immature PN (P3) during successive GABA applications (100 μM). The transients were reversibly blocked by bath application of the GABA_A receptor antagonist bicuculline (100 μM). The dashed line represents the mean amplitude of the responses during the control recordings. B, Ca^{2+} transients (averages of 3) recorded before, during and after application of bicuculline (same experiment as in A). C, bar graph summarising the effect of bicuculline on GABA-mediated Ca^{2+} transients ($n = 5$ cells, P3–6). D and E, Ca^{2+} transients evoked by muscimol (100 μM) were reversibly blocked by bath application of 1 mM Ni^{2+} . Representative experiment from a P3 rat. F, bar graph summarising the effect of Ni^{2+} on muscimol-mediated Ca^{2+} transients ($n = 5$ cells, P3–6).

stimulation and, thus, whether they underlie the observed Ca^{2+} transients. Figure 2D and E shows a representative experiment in which the Ca^{2+} channel antagonist Ni^{2+} (1 mM, a concentration that effectively blocks all subtypes of VOCCs in PNs) reversibly abolished muscimol-evoked Ca^{2+} transients. On average, Ni^{2+} blocked $90 \pm 10\%$ of the GABA-evoked responses ($n = 5$, Fig. 2F).

Perforated-patch recordings of GABAergic currents

In the next set of experiments, we performed whole-cell patch-clamp recordings to quantify the developmental changes in GABA responsiveness. In order not to alter the $[Cl^-]_i$ concentration during these recordings, we used the perforated-patch technique with gramicidin D as the ionophore (Fig. 3A; Abe *et al.* 1994; Reichling *et al.* 1994). Figure 3B illustrates the time course of the patch 'perforation'. As in conventional whole-cell recordings, perforation was accompanied by an increase in 'leak' current and an increase in the amplitude of the current transients associated with the test potential pulse. The peak amplitudes of these transients were used to determine R_s . In the experiment illustrated in Fig. 3B, R_s reached a stable value of about 20 M Ω at 35 min after seal formation. The steady-state R_s values of the successful

perforated whole-cell recordings ranged from 10 to 25 M Ω .

Under these conditions, brief somatic applications of GABA (10 μ M, 5–20 ms) elicited inward current responses, as in the experiment illustrated in Fig. 3C. Depending on the age of the animals and the holding potential, either inward or outward currents were obtained (see below). The GABA-mediated currents were reversibly abolished ($98 \pm 2\%$ inhibition, $n = 5$) by bicuculline (10 μ M; Fig. 3C and D). In agreement with previous work (Sorimachi *et al.* 1991; Vigot & Batini, 1997), currents mediated by GABA_B receptors, which would be expected to be slow outward currents, were not observed.

Developmental shift in E_{GABA} in PNs

The voltage-dependence of the GABA-mediated responses was studied in 45 PNs from rats ranging in age from P2 to P22. Pulse-like applications of GABA to the soma elicited currents that had a similar time course at all ages tested. At a holding voltage near the resting membrane potential (–60 to –65 mV), large inward currents were observed early in the 1st postnatal week (e.g. at P3; Fig. 4A). In contrast, at stages later than the 1st postnatal week,

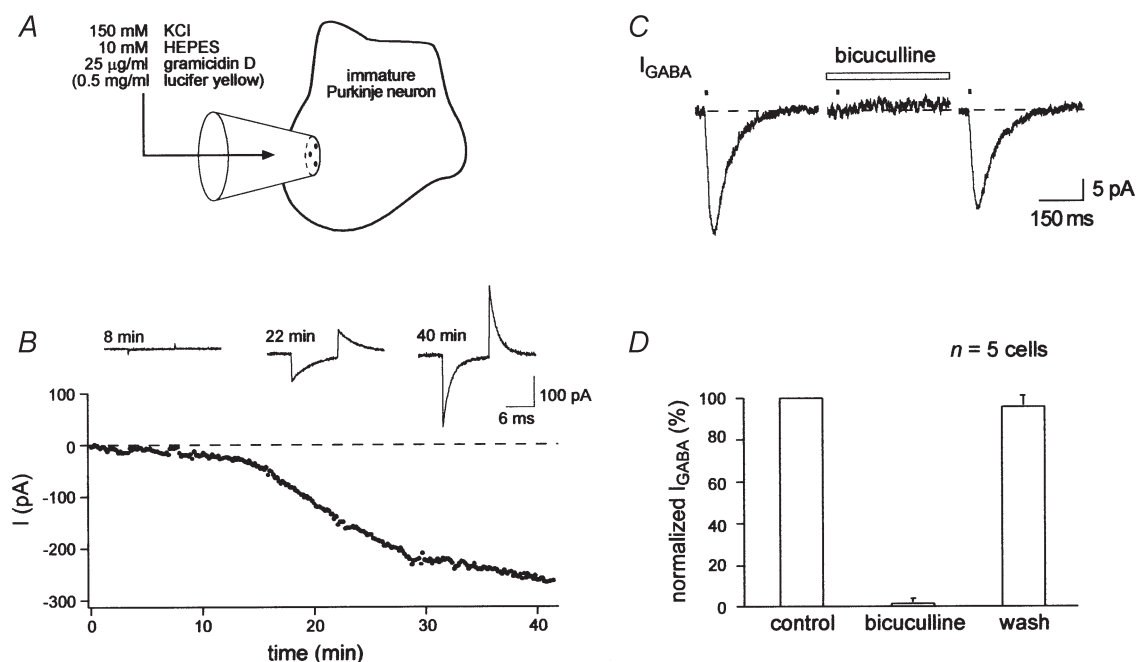


Figure 3. Perforated-patch recordings with gramicidin

A, schematic diagram of the experimental arrangement; the composition of the pipette solution is given. B, amplitude of the transient current at the start of membrane hyperpolarisation (which is inversely proportional to the series resistance) as a function of time after gigaseal formation. Representative traces are shown the insets. C, brief applications of 10 μ M GABA to the soma elicited current responses in all PNs studied, irrespective of age. Bars indicate the time point of GABA application. Currents represent averages of five responses recorded in a PN from a P7 rat. The currents were reversibly blocked by bicuculline (10 μ M). D, bar graph summarising the effect of bicuculline on I_{GABA} ($98 \pm 2\%$ inhibition, mean \pm S.E.M., P7–8).

currents at this holding voltage were outward (e.g. at P8; Fig. 4*B*). E_{GABA} was determined by applying GABA to the cell while it was clamped at different holding voltages. Thus, in the examples shown in Fig. 4, E_{GABA} was found to be -44 mV at P3 and -70 mV at P8.

Figure 4*E* demonstrates that E_{GABA} becomes progressively more negative during the course of postnatal development, shifting from a value of around -40 mV at P2–3, to values around -80 mV at P9–10 and eventually to about -85 mV after P12. These data could be well fitted with a sigmoidal function that assumes E_{GABA} values of -33 mV at birth and -87 mV after P15. The curve had a maximal

slope of -7 mV day $^{-1}$ at P5.6. The plot of the residuals (i.e. data points after subtraction of the fit; Fig. 4*E*, upper trace) confirms that the sigmoidal function faithfully describes the data.

DISCUSSION

GABA-mediated Ca^{2+} signalling in immature PNs

Our results are the first demonstration of GABA-mediated Ca^{2+} signalling in PNs and in the cerebellum in general. We identified precisely the period of the switch of GABAergic transmission in PNs from depolarising to hyperpolarising. Our findings are in contrast with the

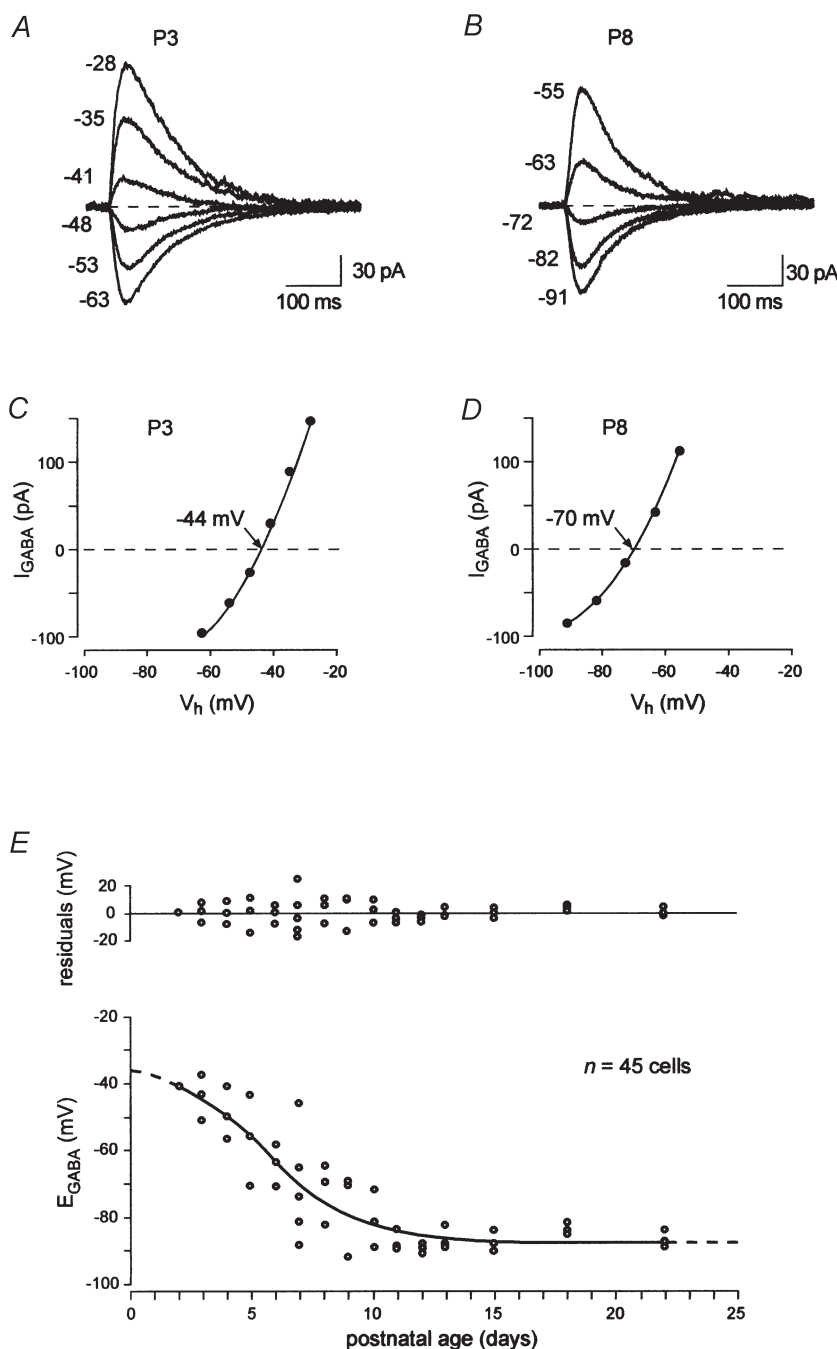


Figure 4. Developmental shift in the reversal potential of the GABA-mediated currents (E_{GABA})

A and B, responses to 5 ms applications of GABA ($10 \mu\text{M}$) to the somata of PNs from a P3 and a P8 rat, respectively, held at the membrane potentials (mV) indicated to the left of the traces. C and D, current–voltage relationship estimated from the peak current during the responses in A and B, respectively. E_{GABA} was determined by the x -intercept of a polynomial fit (continuous lines) of the data points. E, lower part, the values for E_{GABA} at different postnatal ages. Each data point is from one cell. The continuous line represents a sigmoidal fit of the data. The dashed line represents the fit that was extended to P0 and P25 (see text for details). Upper part, plot of the residuals (i.e. the data points after subtraction of the fit). Note that the residuals are distributed randomly, indicating that the fit accurately describes the data.

conclusions of the only two other studies investigating GABAergic transmission in immature PNs. Both Woodward *et al.* (1971) and Sorimachi *et al.* (1991) failed to obtain evidence for a depolarising action of GABA in immature cerebellar PNs. Woodward *et al.* (1971) performed an extensive study on synapse formation and neurotransmitter responsiveness in developing PNs *in vivo*. The technical difficulty of those experiments may have precluded the detection of the depolarising action of GABA. Sorimachi *et al.* (1991) studied PNs from rats at P5–11 and did not find evidence for GABA-mediated Ca^{2+} transients. However, since these authors did not state the specific age of the rats used for these recordings, it remains unclear whether our results are in conflict with theirs. We presume that they focused on a more mature age group.

Our conclusions concerning the depolarising action of GABA in immature PNs are based on two independent sets of experiments. These experiments involved Ca^{2+} imaging in fura-2 AM-loaded PNs and perforated-patch recordings. Both approaches delivered robust and highly reproducible results. The variability of the E_{GABA} values during the transition period (around P6) probably resulted from the differences in the stage of maturation of individual PNs. In no case was GABA-mediated Ca^{2+} signalling detected in PNs from rats older than P8/9, that is at a stage at which PNs have a more elaborate dendritic tree (see for example Fig. 1).

Our results indicate that PNs are members of a larger family of neurones that exhibit GABA-mediated depolarisation during early postnatal stages of life (for reviews see Cherubini *et al.* 1991 and Leinekugel *et al.* 1999). The functional role(s) of the depolarising action is (are), however, unclear. One of the obstacles for testing earlier hypotheses, including the role of GABA in dendritic growth and synaptic wiring, results from the difficulty of monitoring activity in defined types of neurone. This is a challenging task even in a layered structure like the hippocampus, due to the lack of clear-cut morphological hallmarks for most immature neurones. Our study overcomes these problems by identifying PNs as a cellular model system, which allows the establishment of an unusually good correlation between changes in morphology, as well as changes in the synaptic connectivity, with the rather sharply timed changes in GABA responsiveness.

Mechanisms underlying GABA-mediated Ca^{2+} signalling

Since GABA_A receptor channels (GABA_A-Rs) are permeable to both HCO_3^- and Cl^- (Bormann *et al.* 1987), several mechanisms could potentially underlie the depolarising GABA responses in PNs. Thus, a strengthening of HCO_3^- efflux through GABA_A-Rs would shift E_{GABA} to more positive potentials. This could be accomplished either by a change in the HCO_3^- permeability of GABA_A-Rs (Perkins

& Wong, 1996) or by an increase in $[\text{HCO}_3^-]_i$ (Sun *et al.* 1999). A more likely mechanism, however, is an elevated $[\text{Cl}^-]_i$ in immature PNs, which would lead to a reduction in Cl^- influx through GABA_A-Rs and, thus, to a more positive E_{GABA} . Thus, various immature neurones that lack a Cl^- extrusion mechanism (Zhang *et al.* 1991; Rivera *et al.* 1999) or even actively accumulate Cl^- (Rohrbough & Spitzer, 1996; Kakazu *et al.* 1999) respond with a depolarisation to GABAergic stimulation. Indeed, the developmental upregulation of the cerebellar K^+ - Cl^- cotransporter (Lu *et al.* 1999) would be compatible with our findings. Undoubtedly, more detailed studies on the molecular mechanisms controlling Cl^- and HCO_3^- homeostasis in PNs are necessary. However, from our data it seems safe to conclude that as in other brain regions (Yuste & Katz, 1991; Lin *et al.* 1994; Reichling *et al.* 1994; Owens *et al.* 1996; Kulik *et al.* 2000), GABA-mediated Ca^{2+} signalling is entirely caused by GABA_A receptor-evoked depolarisation and the subsequent activation of VOCCs. Preliminary observations suggest that GABA-mediated Ca^{2+} signalling is produced through both the subthreshold activation of T-type channels and action potential-evoked activation of P-type Ca^{2+} channels (A. Konnerth, unpublished observations).

Functional implications and perspectives

The time window during which GABA is depolarising overlaps with a critical period in the development of PNs. Between P1 and P4, PNs merge from two to three irregular rows to a single layer (Ito, 1984) and form at their final destination first GABAergic and then glutamatergic synapses. This is the beginning of a developmental period lasting from P3 until P5/6, during which PNs undergo a dramatic change in their morphology (see Fig. 1) and synaptic connectivity (Altman & Bayer, 1996). In this period, PNs switch from their multipolar dendritic phenotype into the mature form, consisting of a dendritic tree that is usually connected to the PN cell body through a single dendrite. The change in dendritic morphology is paralleled by a switch in the number of afferent CF axons (Mariani & Changeux, 1981). This process of synaptic reorganisation involves a Ca^{2+} -dependent long-term synaptic potentiation of the 'winner' CF input (H. Takechi, J. Eilers & A. Konnerth, unpublished observations). We propose that GABA-mediated synaptic Ca^{2+} signalling, which is present during the period of most intensive reorganisation, contributes to the activity-dependent maturation of the excitatory CF synaptic system. Another mechanism through which GABA-mediated Ca^{2+} signalling may control the wiring of the immature cerebellum is a homosynaptic potentiation of the GABAergic synapses themselves. Thus, at GABAergic inputs to PNs, GABA-mediated increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ could lead to a self-reinforcement via the previously described calcium-dependent process of rebound potentiation (Kano *et al.* 1992). Whatever the detailed roles of the depolarising GABA action in PNs are, the narrow time window and

rapid shift towards the mature hyperpolarising response make it an attractive model for neuronal development and synaptic physiology. The quantification of $[Cl^-]_i$ as well as the identification of Cl^- transporters will be important next steps in understanding the physiology of the GABAergic system in the immature cerebellum.

- ABE, Y., FURUKAWA, K., ITOYAMA, Y. & AKAIKE, N. (1994). Glycine response in acutely dissociated ventromedial hypothalamic neuron of the rat: new approach with gramicidin perforated patch-clamp technique. *Journal of Neurophysiology* **72**, 1530–1537.
- ALTMAN, J. & BAYER, S. A. (1996). *Development of the Cerebellar System in Relation to its Evolution, Structure, and Function*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- BARKER, J. L., BEHAR, T., LI, Y. X., LIU, Q. Y., MA, W., MARIC, D., MARIC, I., SCHAFFNER, A. E., SERAFINI, R., SMITH, S. V., SOMOGYI, R., VAUTRIN, J. Y., WEN, X. L. & XIAN, H. (1998). GABAergic cells and signals in CNS development. *Perspectives on Developmental Neurobiology* **5**, 305–322.
- BORMANN, J., HAMILL, O. P. & SACKMANN, B. (1987). Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and γ -aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *Journal of Physiology* **385**, 243–286.
- BOWERY, N. G., HILL, D. R. & HUDSON, A. L. (1983). Characteristics of GABA_B receptor binding sites on rat whole brain synaptic membranes. *British Journal of Pharmacology* **78**, 191–206.
- BRICKLEY, S. G., CULL-CANDY, S. G. & FARRANT, M. (1996). Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABA_A receptors. *Journal of Physiology* **497**, 753–759.
- BROCKHAUS, J. & BALLANYI, K. (1998). Synaptic inhibition in the isolated respiratory network of neonatal rats. *European Journal of Neuroscience* **10**, 3823–3839.
- CHERUBINI, E., GAIARSA, J. L. & BEN-ARI, Y. (1991). GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends in Neurosciences* **14**, 515–519.
- DENK, W., STRICKLER, J. H. & WEBB, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**, 73–76.
- DURAND, G. M., KOVALCHUK, Y. & KONNERTH, A. (1996). Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* **381**, 71–75.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. & TSIEN, R. Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 3440–3450.
- ITO, M. (1984). *The Cerebellum and Neuronal Control*. Raven Press, New York.
- KAKAZU, Y., AKAIKE, N., KOMIYAMA, S. & NABEKURA, J. (1999). Regulation of intracellular chloride by cotransporters in developing lateral superior olive neurons. *Journal of Neuroscience* **19**, 2843–2851.
- KANO, M., REXHAUSEN, U., DREESSEN, J. & KONNERTH, A. (1992). Synaptic excitation produces a long-lasting rebound potentiation of inhibitory synaptic signals in cerebellar Purkinje cells. *Nature* **356**, 601–604.
- KOMURO, H. & RAKIC, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* **260**, 95–97.
- KULIK, A., NISHIMARU, H. & BALLANYI, K. (2000). Role of bicarbonate and chloride in GABA- and glycine-induced depolarization and $[Ca^{2+}]_i$ rise in fetal rat motoneurons in situ. *Journal of Neuroscience* **20**, 7905–7913.
- LEINEKUGEL, X., KHALILOV, I., MCLEAN, H., CAILLARD, O., GAIARSA, J. L., BEN-ARI, Y. & KHAZIPOV, R. (1999). GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Advances in Neurology* **79**, 189–201.
- LIN, M. H., TAKAHASHI, M. P., TAKAHASHI, Y. & TSUMOTO, T. (1994). Intracellular calcium increase induced by GABA in visual cortex of fetal and neonatal rats and its disappearance with development. *Neuroscience Research* **20**, 85–94.
- LOTURCO, J. J., OWENS, D. F., HEATH, M. J., DAVIS, M. B. E. & KRIEGSTEIN, A. R. (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* **15**, 1287–1298.
- LU, J., KARADSHAH, M. & DELPIRE, E. (1999). Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *Journal of Neurobiology* **39**, 558–568.
- MARIANI, J. & CHANGEUX, J. P. (1981). Ontogenesis of olivocerebellar relationships. I. Studies by intracellular recordings of the multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the developing rat cerebellum. *Journal of Neuroscience* **1**, 696–702.
- MARTY, S., BERNINGER, B., CARROLL, P. & THOENEN, H. (1996). GABAergic stimulation regulates the phenotype of hippocampal interneurons through the regulation of brain-derived neurotrophic factor. *Neuron* **16**, 565–570.
- 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.
- PERKINS, K. L. & WONG, R. K. (1996). Ionic basis of the postsynaptic depolarizing GABA response in hippocampal pyramidal cells. *Journal of Neurophysiology* **76**, 3886–3894.
- REICHLING, D. B., KYROZIS, A., WANG, J. & MACDERMOTT, A. B. (1994). Mechanisms of GABA and glycine depolarization-induced calcium transients in rat dorsal horn neurons. *Journal of Physiology* **476**, 411–421.
- RIVERA, C., VOIPIO, J., PAYNE, J. A., RUUSUVUORI, E., LAHTINEN, H., LAMSA, K., PIRVOLA, U., SAARMA, M. & KAILA, K. (1999). The K^+/Cl^- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251–255.
- 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.
- SORIMACHI, M., YAMAGAMI, K., MORITA, Y. & KURAMOTO, K. (1991). GABA inhibits the rise in cytosolic free calcium concentration in depolarized immature cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience Letters* **122**, 229–232.
- SPOERRI, P. E. (1988). Neurotrophic effects of GABA in cultures of embryonic chick brain and retina. *Synapse* **2**, 11–22.
- SUN, M. K., NELSON, T. J., XU, H. & ALKON, D. L. (1999). Calectin transformation of GABAergic synapses: from excitation filter to amplifier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**, 7023–7029.
- VIGOT, R. & BATINI, C. (1997). GABA(B) receptor activation of Purkinje cells in cerebellar slices. *Neuroscience Research* **29**, 151–160.

- WANG, J., REICHLING, D. B., KYROZIS, A. & MACDERMOTT, A. B. (1994). Developmental loss of GABA- and glycine-induced depolarization and Ca²⁺ transients in embryonic rat dorsal horn neurons in culture. *European Journal of Neuroscience* **6**, 1275–1280.
- WOODWARD, D. J., HOFFER, B. J., SIGGINS, G. R. & BLOOM, F. E. (1971). The ontogenic development of synaptic junctions, synaptic activation and responsiveness to neurotransmitter substances in rat cerebellar Purkinje cells. *Brain Research* **34**, 73–97.
- 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.
- XU, C., ZIFFEL, W., SHEAR, J. B., WILLIAMS, R. M. & WEBB, W. W. (1996). Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**, 10763–10768.
- YUSTE, R. & KATZ, L. C. (1991). Control of postsynaptic Ca²⁺ influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron* **6**, 333–344.
- 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.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to J.E. and A.K.

Corresponding author

J. Eilers: Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Abteilung Neurophysiologie, 60528 Frankfurt, Germany.

Email: eilers@mpih-frankfurt.mpg.de

Author's present address

T. D. Plant: Institut für Pharmakologie, Freie Universität Berlin, 14195 Berlin, Germany.

Nima Marandi · Arthur Konnerth · Olga Garaschuk

Two-photon chloride imaging in neurons of brain slices

Received: 5 June 2002 / Revised: 1 August 2002 / Accepted: 14 August 2002 / Published online: 20 September 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract Two-photon laser scanning microscopy has been used successfully for imaging activity-dependent changes of intracellular calcium and sodium levels. Here we introduce a simple technique for two-photon chloride imaging in intact neurons. It involves the use of the membrane-permeable Cl^- indicator dye MQAE [*N*-(6-methoxyquinolyl) acetoethyl ester]. Brief incubation with MQAE produced a robust loading of cells in slices from various brain regions including hippocampus, cortex and cerebellum. In contrast to conventional fluorescence measurements using MQAE, two-photon imaging was not affected in a major way by dye bleaching and phototoxic damage. Instead, it allowed prolonged recordings of time-resolved changes in intracellular chloride concentration in somata and dendrites. As an example of an application we imaged GABA-mediated Cl^- transients in pyramidal cells of cortical and hippocampal slices as well as in cerebellar Purkinje neurons. By combining Cl^- imaging with the gramicidin-based perforated-patch-clamp technique we showed that changes in MQAE fluorescence are proportional to the magnitudes of GABA-evoked transmembrane Cl^- fluxes. Thus, MQAE-based two-photon microscopy promises to be a valuable technique for many applications requiring chloride imaging in single cells.

Keywords Cl^- imaging · Dendrite · MQAE · Two-photon excitation

Introduction

Chloride ions represent a major physiological anion in living tissue and are critically involved in the regulation of cell volume [23], intracellular pH [9], acid-base

balance [40] and fluid secretion [32]. Failures in Cl^- regulation are implicated in several human diseases such as cystic fibrosis [31], congenital chloride diarrhoea [30], sickle cell disease [6], myotonia congenita [33], and Bartter's and Gitelman's syndromes [43]. In the central nervous system the activation of receptor- as well as voltage-activated Cl^- channels directly controls neuronal excitability.

Despite the importance of Cl^- for many cellular functions, there is little knowledge available on the mechanisms regulating the intracellular Cl^- concentration ($[\text{Cl}^-]_i$). This lack of information is primarily due to technical difficulties in the measurement of $[\text{Cl}^-]_i$. Measurements of $[\text{Cl}^-]_i$ with Cl^- -selective microelectrodes, for example, can only be performed in neurons with large cell bodies [28, 35]. In addition, these recordings are often distorted by the interference of the electrode with intracellular anions and anion leakage from the reference barrel [1]. A second possibility is to measure $[\text{Cl}^-]_i$ using quinoline-based fluorescent dyes sensitive to Cl^- such as 6-methoxy-*N*-(3-sulphopropyl)quinolinium (SPQ), MQAE or 6-methoxy-*N*-ethylquinolinium chloride (MEQ). These dyes have been used for measurements of $[\text{Cl}^-]_i$ in a variety of preparations, including isolated growth cones [17], neurons [8, 14, 15, 22, 42], glia [2], different types of epithelial/endothelial cells [5, 35, 37, 38, 44], fibroblasts [7, 49] and pancreatic beta-cells [11]. Of these dyes MQAE has the highest Cl^- sensitivity and, unlike SPQ, easily permeates through the plasma membrane. The major disadvantage of all quinoline-based indicator dyes is, however, that they are prone to unusually strong bleaching [24, 39]. This restricts the duration of the measurements and allows only a low data acquisition rate (0.2–2 frames per minute) [16, 24, 41].

An elegant approach of fluorometric Cl^- measurements is based on the Cl^- sensitivity of yellow fluorescent protein (YFP) [18, 26, 48]. The construction of a fusion protein containing YFP combined with the Cl^- -insensitive cyan fluorescent protein (CFP) allows fluorescence-resonance-energy-transfer- (FRET-) based ratiometric measurements of $[\text{Cl}^-]_i$ in neurons [36]. This new indicator,

N. Marandi · A. Konnerth (✉) · O. Garaschuk
Institut für Physiologie, Ludwig-Maximilians Universität München,
Pettenkoflerstrasse 12, 80336 Munich, Germany
e-mail: office-konnerth@lrz.uni-muenchen.de
Tel.: +49-89-5996510
Fax: +49-89-5996512

termed Clomeleon, is excited by visible light and it shows little bleaching. However, Clomeleon is less Cl^- -sensitive than MQAE or MEQ [3, 42, 47]. Furthermore, it is quite pH-sensitive and it has, like many other YFP-related proteins, slow binding kinetics (it binds Cl^- over a time course of 100 ms [26]).

Here we introduce a new approach for measuring $[\text{Cl}^-]_i$ by demonstrating that MQAE is suitable for fluorescence measurements with two-photon excitation. Favourable features of this technique include convenient cell loading, staining of both cell bodies and dendrites, insensitivity to changes in bicarbonate concentration and pH, and the possibility of prolonged continuous measurements.

Materials and methods

Slice preparation and solutions

Brain slices were prepared from 1- to 17-day-old (P1–17) Sprague-Dawley rats as described previously [12]. After decapitation cerebella or brain hemispheres were quickly removed and placed in ice-cold sucrose-based saline containing (in mM): 234 sucrose, 5.3 KCl, 26 NaHCO_3 , 1 NaH_2PO_4 , 8 MgSO_4 , 10 glucose, pH 7.4, when bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2 . Slices of the cerebellum, hippocampus or cortex (300–500 μm thick) were cut with a vibrotome and incubated for half an hour at 34°C in a storage chamber filled with standard saline containing (in mM): 125 NaCl, 4.5 KCl, 26 NaHCO_3 , 1.25 NaH_2PO_4 , 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 20 glucose, pH 7.4, when bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2 . The slices were kept in the chamber at 24°C until used for experiments.

Solutions for in vitro calibration experiments contained ion concentrations as indicated in the Results, 30 mM HEPES and 5 mM MQAE (Molecular Probes, Eugene, Ore., USA). The osmolarity was adjusted to 310 mosmol/l with sucrose, pH was adjusted to 7.4 (in Fig. 2D from 6.0 to 8.0) using KOH. Solutions for the experiments shown in Fig. 1C contained either 0 or 26 mM Cl^- and those for the experiments illustrated in Fig. 2C and D contained 0 and 26 mM Cl^- , respectively. For the experiments illustrated in the Fig. 5C and D we added picrotoxin (20 or 50 μM) to the standard saline. The pipette solution used for perforated-patch recordings contained (in mM): 160 K^+ -gluconate, 10 HEPES and 50 $\mu\text{g/ml}$ gramicidin D (pH was set to 7.3 with KOH).

All in vitro experiments were performed using a custom-made cuvette that had a volume of 70 μl , a diameter of 12 mm and was covered by a quartz cover slip. If not indicated otherwise, chemicals were purchased from Sigma (Deisenhofen, Germany).

Imaging

MQAE fluorescence measurements were performed using a custom-built two-photon laser-scanning microscope based on a mode-locked laser system operating at 720–850 nm wavelength, 80 MHz pulse repeat, <130 fs pulse width (Tsunami and Millennia, Spectra Physics, Mountain View, Calif., USA) and a laser-scanning system (MRC 1024, Bio-Rad, UK) coupled to an upright microscope (BX50WI, Olympus, Tokyo, Japan) and equipped with a 60 \times 1.0 NA water immersion objective (Fluor 60 \times , Nikon, Tokyo, Japan).

For dye loading, brain slices were incubated in standard saline containing 6 mM MQAE for 10 min at 37°C and then perfused with dye-free saline for 10 min.

Background-corrected images were analyzed off-line with a LabView-based software package (National Instruments, Austin, Tex., USA) and Igor software (WaveMetrics, Lake Oswego, Ore., USA). Changes of $[\text{Cl}^-]_i$ were calculated as $-\Delta F/F$, which is the negative ratio between the fluorescence change (ΔF) and the

baseline fluorescence before stimulation (F). Data are presented as mean \pm SEM.

Intracellular calibration of MQAE

To measure the Cl^- sensitivity of MQAE within stained neurons we used the calibration protocol introduced by Krapf et al. [35]. The K^+/H^+ ionophore nigericin (10 μM) and the Cl^-/OH^- antiporter tributyltin chloride (10 μM) were used to equilibrate extra- and intracellular $[\text{Cl}^-]$ and pH. This procedure allowed the calibration of MQAE-mediated fluorescence changes inside the cells by performing stepwise changes in the extracellular $[\text{Cl}^-]$. The calibration solutions contained (in mM): 0–40 KCl, 10 HEPES, 10 Na^+ -gluconate. The pH value was set to 7.4 with KOH and osmolarity was set to 310 mosmol/l with K^+ -gluconate.

Electrophysiological recordings and drug application

Gramicidin-based perforated-patch-clamp recordings were performed as reported previously [13]. Membrane currents were recorded with an EPC-9 patch-clamp amplifier (HEKA, Lambrecht, Germany) using patch pipettes made of borosilicate glass (Hilgenberg, Malsfeld, Germany). The pipette resistance was 6–8 M Ω when filled with the pipette solution (composition see above) and the series resistance was 20–35 M Ω . Data acquisition was performed using Pulse software (HEKA, Lambrecht, Germany).

GABA was pressure ejected (application device: PDES-2L, npi, Tamm, Germany) from a fine pipette (6–12 M Ω) filled with standard saline containing 1 mM GABA. In experiments illustrated in Fig. 5C and D 20 or 50 μM picrotoxin was added to the GABA-containing pipette solution. The pulse duration ranged from 500 to 1000 ms, except for perforated-patch recordings in which the pulse duration was 100–150 ms. The application pipettes were positioned approximately 10 μm from the soma of the cell of interest.

Results

Properties of MQAE

MQAE (Fig. 1A) is a membrane-permeable Cl^- -sensitive fluorescent dye that belongs to N-substituted quinoline compounds [47]. It was originally developed for Cl^- recordings using conventional fluorophore excitation. Under these conditions MQAE is excited at wavelengths from 320 to 400 nm with a maximum emission intensity at 460 nm [2, 47]. To test the suitability of MQAE for two-photon imaging (Fig. 1B–D) we first obtained the two-photon excitation spectrum by measuring the intensities of the emitted fluorescence from a solution containing 26 mM Cl^- and 5 mM MQAE. The solution was excited between 740 and 800 nm, the wavelengths that are approximately twice the one-photon excitation maxima. This protocol resulted in a bright fluorescence at all excitation wavelengths. When the intensity of the emitted fluorescence light was kept constant by adjusting the power of the excitation light, a progressive increase in the power was needed when shifting to longer wavelengths (Fig. 1C, squares).

To determine whether the amplitudes of Cl^- signals depend on the wavelength of excitation light, $-\Delta F/F$ values caused by an increase in $[\text{Cl}^-]$ from 0 to 26 mM were measured at different wavelengths by switching

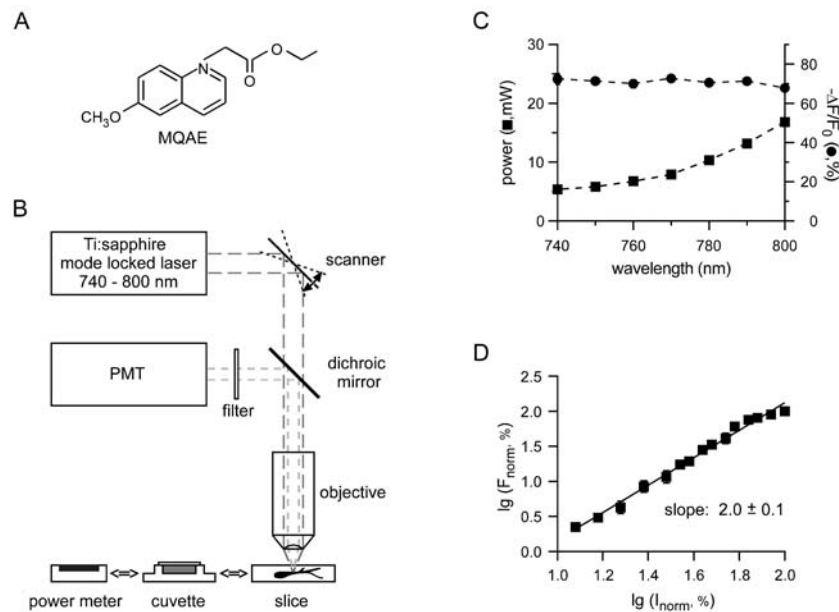


Fig. 1A–D Fluorescence properties of *N*-(6-methoxyquinolyl) acetoethyl ester (MQAE). **A** Chemical structure of MQAE. **B** Illustration of the experimental arrangement. MQAE was excited by pulsed laser light generated by the Ti:Sapphire laser system and directed through a galvanometric scanner. Emitted light was collected by a photomultiplier tube (PMT), situated close to the probe. For in vitro measurements a cuvette, filled with the respective solution, was placed under the objective. The power of excitation light on the specimen was measured with a power meter. **C** Spectral properties of MQAE. Changes in $-\Delta F/F_0$ (circles) and excitation power (squares) were plotted against the wavelength of

the excitation light. To obtain $-\Delta F/F_0$ values MQAE fluorescence was measured in solutions containing 0 (F_0) or 26 mM Cl^- (F). The power of the excitation light was adjusted to keep F_0 constant. **D** Logarithmic plot of MQAE fluorescence versus excitation intensity. Recordings were made from somata of five deliberately chosen Purkinje cells. X values were normalized to the maximum intensity of the excitation light and Y values were normalized to the maximum intensity of MQAE fluorescence. The linear least-squares fit of the data points has a slope of 2.0, suggesting that MQAE fluorescence results from two-photon excitation

between two cuvettes, filled with the respective solutions. As shown in Fig. 1C the $-\Delta F/F$ values were constant at wavelengths from 740 to 800 nm (circles). Thus, the lowest levels of excitation light needed for a certain intensity of the emitted light, and thus the lowest photobleaching and photodamage [45], were obtained at wavelengths of 740 and 750 nm, whereas Cl^- -dependent changes in fluorescence were constant at all wavelengths tested. Because our laser system is able to deliver more excitation power at 750 compared to 740 nm, subsequent experiments were performed at 750 nm.

To evaluate the physical basis of MQAE excitation, the intensity of the emitted light was measured as a function of the excitation intensity in rat cerebellar Purkinje cells (Fig. 1D). The intensity of MQAE emission was dependent on the second order of the excitation intensity, thus indicating that it was generated by two-photon excitation [10].

Next we examined the sensitivity and ion selectivity of MQAE under conditions of two-photon excitation. First we tested its ability to discriminate between Cl^- and HCO_3^- , the anion that competes with Cl^- in many biological processes [4, 9]. To address this issue, we analyzed the dependence of the fluorescence intensity of MQAE on Cl^- and HCO_3^- concentrations in vitro (Fig. 2A and C, respectively). As expected, Cl^- effectively quenched MQAE (Fig. 2A). The data points were well

fitted by the following equation (see Appendix for further explanations):

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_{\max} * \frac{[\text{Cl}^-]}{K_d + [\text{Cl}^-]}$$

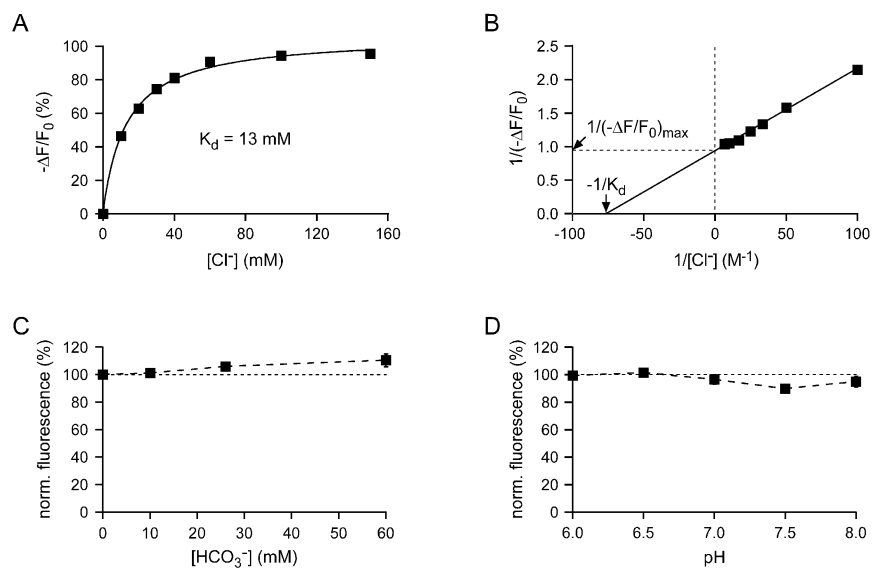
suggesting that the interaction between Cl^- and the dye can be described in analogy to Michaelis–Menten behavior.

Using a Lineweaver-Burk plot (Fig. 2B, see Appendix for further explanations) we obtained $\left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_{\max}$ close to 1 and an apparent dissociation constant (K_d)_{max} of MQAE of 13 mM. Alternatively, the apparent K_d can be obtained from the Stern-Volmer plot (see Appendix). These calculations gave a very close K_d value of 9.5 mM for the same set of data. In contrast to changes in $[\text{Cl}^-]$, large alterations in HCO_3^- concentration within the physiological range (0–60 mM) caused only very small changes of the fluorescence signal (Fig. 2C). As shown in Fig. 2D there was also virtually no change in MQAE fluorescence in response to pH changes within the physiologically relevant pH range.

In another series of experiments we estimated the Cl^- sensitivity of MQAE inside neurons (Fig. 3A). The wash-in of the calibration solution containing 10 μM of nigericin and tributyltin chloride caused an immediate reduction of the MQAE-mediated fluorescence by

360

Fig. 2 Ion sensitivity of MQAE. Plots of MQAE-dependent fluorescence versus concentration of Cl^- in **A** and HCO_3^- in **C**, and versus pH in **D**. In **A** data points were fitted using Eq. 8 (see Appendix). **B** A Lineweaver-Burk plot of the data. Reciprocals of the apparent dissociation constant K_d and $(-\Delta F/F_0)_{\max}$ were obtained as intercepts with the X and Y axis, respectively



$19 \pm 7.8\%$ ($n=42$ cells), probably because of photon absorption caused by the drugs [16]. This reduction precluded the calibration of resting intracellular Cl^- levels. Therefore, we restricted our study to measurements of relative changes in $[\text{Cl}^-]_i$. As shown in Fig. 3B, an increase of the $[\text{Cl}^-]_i$ by 10 mM caused an almost 20% reduction in MQAE fluorescence. Moreover, within the physiologically relevant concentration range, the dependence between MQAE-mediated fluorescence changes ($\Delta F/F$) and changes in $[\text{Cl}^-]_i$ was still almost linear (Fig. 3B). This allowed a rough estimation of changes in $[\text{Cl}^-]_i$ from the corresponding $\Delta F/F$ changes. We further estimated the apparent K_d value of MQAE inside cells using a Stern-Volmer plot (Fig. 3C). It equaled 40 mM. Thus, also inside cells, MQAE has a high Cl^- sensitivity allowing one to measure changes in $[\text{Cl}^-]_i$ that are in the range of a few millimolar.

Two-photon imaging of neurons labeled with MQAE

To stain neurons in brain slices we used the procedure developed by Garaschuk et al. [19] for staining cells with the Ca^{2+} indicator dye fura-2 AM. This procedure allowed us to stain neurons in the hippocampus, cortex and cerebellum from 1-day-old to 17-day-old rats (Figs. 4, 5). Within the upper 70–100 μm of a slice the image quality obtained allowed easy identification of the different types of neurons based on their morphology. We have not noticed any difference in the quality of staining between different types of neurons. However, we noticed that the intensity of MQAE fluorescence within the cytosol was not homogeneous (see, for example, Fig. 5A). The nuclei were stained weaker than the cytosol and the cytosol itself contained brighter and darker regions alternating irregularly. To examine whether the inhomogeneous appearance was accompanied by a heterogeneity in Cl^-

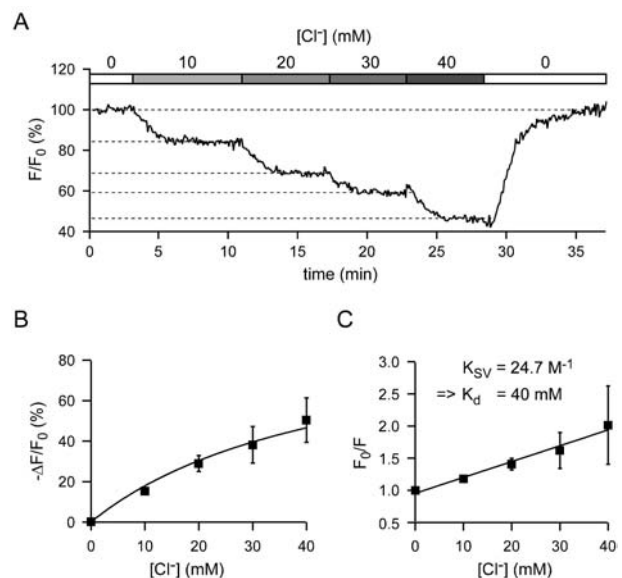


Fig. 3A–C Intracellular Cl^- sensitivity of MQAE. **A** An illustration of a calibration experiment in CA1 hippocampal pyramidal neurons from a 9-day-old rat. The *trace* is an average of five original traces obtained from deliberately chosen neurons. The data are obtained in the presence of 10 μM nigericin and 10 μM tributyltin chloride. The *bar* at the *top* indicates when different calibration solutions were applied. Data were corrected for rundown of fluorescence having a slope of 0.08%/min. **B** A dose–response curve (each data point is the mean \pm SD, $n=5$ slices, 42 cells). *Solid line* represents a fit to the data using Eq. 8. **C** Stern-Volmer plot of the data. The slope of the fit line gives the Stern-Volmer constant (K_{SV}) that is the reciprocal of the dissociation constant K_d

sensitivity we compared fluorescence changes caused by GABA_A receptor activation in dark and bright cellular regions. The normalized amplitudes of fluorescence changes ($\Delta F/F$) were nearly equal in dark ($16.97 \pm 1.15\%$) and bright regions ($16.28 \pm 1.33\%$; $n=9$ cells) of the cytosol and were comparable to those

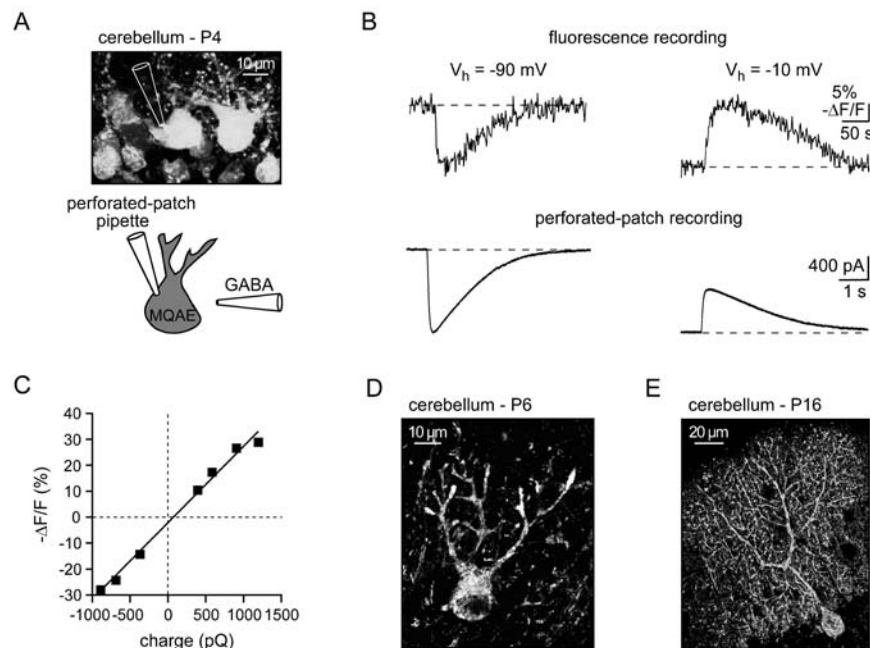


Fig. 4A–E Cl⁻ efflux-influx studies in cerebellar neurons. **A** High-resolution image of two cerebellar Purkinje cells in a slice from a 4-day-old rat (*top*). Schematic illustration of the experimental arrangement for the gramicidin-based perforated-patch recordings (*bottom*). **B** Opposite directions of GABA-evoked Cl⁻ fluxes at holding potentials (V_h) of -90 mV (*left*) and -10 mV (*right*). Changes in fluorescence (*top*) and corresponding transmembrane

currents (*bottom*) are caused by 150-ms-long pressure applications of GABA. **C** Correlation between the amplitude of Cl⁻ transients and corresponding transmembrane charges in another experiment. **D, E** High-resolution two-photon images of Purkinje neurons in MQAE-loaded cerebellar slices from 6- and 16-day-old rats. Images represent a maximal projection of six images in **D** and nine images in **E** taken with a step of 1 μm

recorded from nuclear regions of interest ($21.65 \pm 1.72\%$). Thus, Cl⁻ ions seem to move freely within a cell and to be able to reach both dark and bright “compartments”. Based on these data average changes in fluorescence intensities measured over the entire somata were used for further analyses.

Next we determined the extent of dye leakage and photobleaching during two-photon imaging in MQAE-loaded hippocampal CA1 pyramidal neurons and layer 5 pyramidal cells of the cortex. The leakage of MQAE was measured as a spontaneous reduction of the fluorescence intensity during periods devoid of cell illumination. The rate of photobleaching was obtained as the difference between the rundown of the fluorescence intensity during prolonged periods of continuous illumination (15–45 min at 1 Hz) and the leakage rate. Recalculated for 1 h, the leakage caused a decrease in fluorescence of about 30% whereas bleaching caused a decrease of about 10% ($n=54$ cells). Thus, as expected, the use of two-photon microscopy significantly decreased bleaching of the dye and allowed us to conduct prolonged (30–60 min) non-stop recordings at a relatively high repetition rate when compared to previous experiments [16, 29, 41, 42].

Intracellular Cl⁻ measurements

Figure 4 illustrates MQAE-mediated Cl⁻ imaging experiments performed in cerebellar Purkinje neurons. In these

experiments GABA-evoked changes in Cl⁻-sensitive MQAE fluorescence and accompanying transmembrane currents were recorded simultaneously. The use of gramicidin-based perforated-patch-clamp measurements (Fig. 4A–C) allowed us to perform electrophysiological recordings in the whole-cell mode without interfering with the intracellular Cl⁻ concentration [13]. As shown in Fig. 4B, activation of GABA_A receptors at a holding potential of -90 mV triggered a fluorescence increase (inverted on the figure to have the same direction as the change in [Cl⁻]_i) and an inward current, both indicating that Cl⁻ transients arise from Cl⁻ efflux through GABA_A receptor channels. When the holding potential was shifted to -10 mV the direction of both signals reversed. The relation between MQAE-mediated fluorescence changes and the net ion charge transferred through the cell membrane in response to activation of GABA_A receptors was linear and had the same slope for either direction of charge movement (Fig. 4C), indicating that MQAE is an accurate reporter of the transmembrane Cl⁻ charge transfer. In individual trials clear fluorescence changes were caused by ion charges down to 260 pC (and corresponding transmembrane currents with amplitudes around 200 pA), whereas it was necessary to average data obtained in a few consecutive trials if the transfer of smaller charges had to be visualized.

At the resting membrane potential GABA-evoked changes in the fluorescence of MQAE were easily resolved at all ages tested (P1–16). However, their

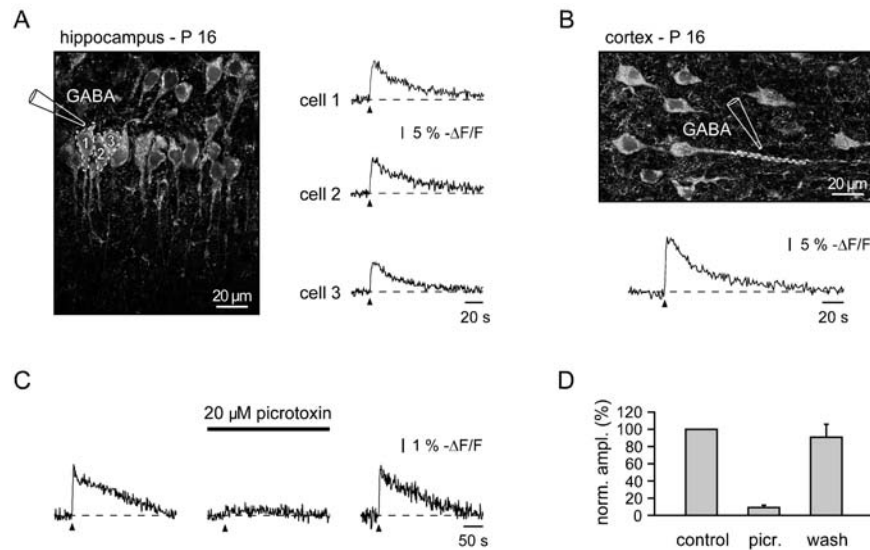


Fig. 5A–D GABA-mediated Cl⁻ transients in juvenile neurons. **A** GABA-mediated Cl⁻ transients in somata of CA1 pyramidal cells. *Left panel:* an image of the cell body layer in a slice from a 16-day-old rat (maximal projection of a stack of seven images taken with a step of 1 μm). *Right panel:* Cl⁻ transients in somata of three neurons, situated near an application pipette. **B** Dendritic GABA-mediated Cl⁻ transient (*bottom*) in a layer 5 pyramidal neuron of the cortex. *Top:* an image of the layer 5 in the cortical slice obtained

from a 16-day-old rat (maximal projection of a stack of seven images taken with a step of 1 μm). **C** GABA-mediated Cl⁻ transients were reversibly blocked by picrotoxin (*left* – control, *middle* – in picrotoxin, *right* – washout of picrotoxin). **D** Bar graph summarizing the effect of picrotoxin ($n=5$). *Traces in A, B and C* are averages of five consecutive trials, *arrowheads* indicate the time point of GABA application

direction reversed during this developmental period. During the first few postnatal days GABA applications to somata of hippocampal CA1 pyramidal neurons caused fluorescence transients reflecting a decrease in the intracellular Cl⁻ concentration ($-\Delta F/F$ of $-11.0 \pm 1.7\%$, $n=4$, P1–4). During the second postnatal week, however, the same experimental protocol caused an increase in the intracellular Cl⁻ concentration ($-\Delta F/F$ of $8.4 \pm 0.7\%$, $n=44$, P16–17, Fig. 5A). Similar GABA-mediated Cl⁻ transients were also recorded in main apical dendrites of juvenile hippocampal (not shown) as well as neocortical (Fig. 5B) pyramidal neurons up to 120 μm away from cell somata. These Cl⁻ transients were reversibly blocked by bath application of 20 or 50 μM picrotoxin ($n=5$ cells, Fig. 5C, D) or 20 μM bicuculline ($n=4$ cells, not shown), indicating that they are caused by activation of GABA_A receptor channels. It is important to note that staining, sufficient to resolve intact cells and their processes (Figs. 4D, E, 5A, B), was routinely obtained even in slices from 14- to 17-day-old animals.

Discussion

Our study introduces an approach of two-photon Cl⁻ imaging. Advantages of this technique include simplicity of dye loading, fast diffusion of the dye inside the cells, its relatively high sensitivity and selectivity for Cl⁻, low background fluorescence and the possibility of long-lasting continuous recordings. These features, combined with the improved spatial resolution of two-photon

microscopy, render the technique well suited for Cl⁻ imaging in intact neurons, but certainly also in other cell types.

MQAE as a useful indicator for two-photon Cl⁻ imaging

Cl⁻ indicator dyes, available for noninvasive measurements of $[Cl^-]_i$, can be divided into two classes: those derived from quinoline (MQAE and MEQ) and those derived from yellow fluorescence protein (YFP-H148Q, Clomeleon, V163S [18, 26, 36]). Although synthesized a decade ago, MQAE has many properties that are advantageous even if compared with recently developed dyes. First, MQAE can be bought ready to use and it requires only a short (10 min) incubation time for staining of brain slices. This procedure results in a bright fluorescence in all cells tested independent of the animal's age. For comparison, MEQ is membrane-permeable only in a reduced form (dihydro-MEQ), which needs to be synthesized just before loading [3]. According to the literature, 30–90 min are required to stain brain slices with MEQ [3, 47].

Second, MQAE is insensitive to physiological changes in pH and bicarbonate concentration (see also [34]). For a hydrolyzed form of MQAE [*N*-(6-methoxyquinolyl) acetic acid] Verkman et al. [47] reported the absence of pH sensitivity down to a pH of 3.5. This feature favorably distinguishes MQAE from all YFP-derived Cl⁻-sensitive dyes. Clomeleon, for example, has a very complex pH

sensitivity, which depends on the intracellular Cl^- concentration [36]. Even for slight pH changes of 0.2 the detection error will vary from 10 to 40% depending on the actual $[\text{Cl}^-]_i$.

Another advantageous characteristic of MQAE is its relatively high sensitivity to Cl^- . Under our experimental conditions the dissociation constant (K_d) of MQAE was 13 mM in the cuvette and 40 mM inside cells. This difference could be explained by a higher intracellular viscosity and polarity as compared to cuvette experiments, known to cause a lower Cl^- sensitivity of all *N*-substituted quinoline derivatives [27]. In addition, MQAE was probably partially hydrolyzed by intracellular esterases. The product of the hydrolysis, *N*-(6-methoxyquinolyl) acetic acid, has a somewhat lower Cl^- sensitivity (Stern-Volmer constant, a reciprocal of the K_d value, of 113 M^{-1} compared with 200 M^{-1} for MQAE, [34, 47]). Nevertheless, the apparent intracellular K_d value, measured in this study, is lower than K_d values of other available Cl^- indicator dyes [18, 24, 36]. Therefore, MQAE is better suited to detect the relatively small changes in $[\text{Cl}^-]_i$; due, for example, to synaptic activation of GABA or glycine receptors.

Finally, MQAE is quenched by Cl^- in $<1 \text{ ms}$ [47] and is thus well suited to monitor physiological changes in $[\text{Cl}^-]_i$, which often occur in the millisecond or second range. Furthermore, MQAE is quenched by a collisional quenching mechanism, which does not involve the binding of Cl^- to the indicator dye molecule [46]. Therefore, MQAE cannot buffer Cl^- and an increase in the intracellular dye concentration will only improve the signal-to-noise ratio without any disturbance of the time course of Cl^- transients. Its use in the combination with two-photon microscopy strongly reduces photochemical damage and allows one to minimize bleaching, which precluded the use of MQAE for fast continuous recordings in the past [29].

Cl^- imaging in brain slices

As already shown for two-photon Ca^{2+} imaging of intact neurons [20], the use of two-photon microscopy significantly improves the ability to detect fine dendritic structures. In scattering tissues like brain slices, the number of ballistic photons emitted by these structures is too low to be detected by more conventional imaging techniques. In the present study, the use of two-photon microscopy allowed us to visualize dendrites up to $120 \mu\text{m}$ away from the cell body revealing secondary and tertiary branches (see Figs. 4, 5). As shown in Fig. 5B, it was possible to conduct functional studies on these processes.

The image quality further benefited from the virtual absence of background fluorescence. This resulted in a very high contrast of recordings. A likely reason for the low background fluorescence levels is the high water solubility of MQAE [47], which provides effective washout of the dye from the extracellular space. In

addition, residual MQAE is completely quenched by 135 mM Cl^- present in the external solution (see Fig. 2A).

MQAE-stained neurons in brain slices exhibited heterogeneous intensity distribution within the cytosol. This heterogeneity is probably due to binding of MQAE to yet unidentified subcellular structures. It seems that “bound” MQAE molecules are easily accessible to Cl^- , because in response to activation of GABA_A receptors their concentration changes homogeneously throughout the cell. As suggested by Kaneko et al. [29] this kind of binding should be characteristic for the whole class of methoxyquinoline compounds and, consequently, also for MEQ (6-methoxy-*N*-ethylquinolinium chloride). Indeed, in the study of Inglefield and Schwartz-Bloom [24] an irregular bright punctual staining of the cytosol, similar to that found in our study, can be detected (see their Fig. 1A).

Limitations of the technique

Despite many advantages, two-photon Cl^- imaging also has some limitations. First, MQAE is a nonratiometric dye, and is, thus, limited in terms of quantitative Cl^- measurements. Although Jayaraman and colleagues made an effort to synthesize quinoline-based ratiometric Cl^- indicators by conjugating Cl^- -sensitive and Cl^- -insensitive dye molecules by different spacers [25], the quantum yield and Cl^- sensitivity of these “chimeric” dual-wavelength indicators were reduced when compared with the parent Cl^- -sensitive indicator. Moreover, only one “chimera” (MQA₄AQ) was cell permeant utilizing the same mechanism of reduction/reoxidation as MEQ. In addition to the need of fresh synthesis directly before loading, MQA₄AQ turned out to be four times less Cl^- sensitive than MQAE. Another possibility for ratiometric Cl^- imaging is to use Clomeleon [36]. Having all advantages of a ratiometric dye, Clomeleon, however, has a significantly lower Cl^- sensitivity (K_d of 160 mM), is pH sensitive and has 100 times slower binding kinetics than MQAE [36, 47]. In addition, in the original study Clomeleon was loaded into the cells by gene transfer (electroporation with a Clomeleon-encoding plasmid). This method required 24 h for protein expression and is, therefore, not easy to use in acute brain slices.

Another limitation of MQAE-based Cl^- imaging lies in the significant leakage rate of the dye. The leakage rate seems to be preparation-specific, ranging from 3% per hour in liposomes [47] to 30% per hour in brain slices (see above). As can be expected for a lipophilic compound, its leakage rate was temperature-dependent with a Q_{10} of 1.44.

Despite these limitations, MQAE-based two-photon Cl^- imaging represents a straightforward and useful approach for recording dynamic changes in $[\text{Cl}^-]_i$ in intact neurons. Although developed to study Cl^- homeostasis in neurons in acute brain slices, this technique may be easily adapted for use in any type of biological tissue.

Acknowledgements We thank Drs. Y. Kovalchuk and C.R. Rose for comments on the manuscript and R. Maul, S. Schickle and I. Schneider for technical assistance. The work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 391) to O.G. and A.K.

Appendix

Fitting the dose–response curve of Cl^- -dependent fluorescence changes

The total fluorescence of a MQAE-containing solution consists of the fluorescence of free MQAE (F_f) and of Cl^- -bound MQAE (F_b)

$$F = F_f + F_b \quad (1)$$

The dependence between the fluorescence and the concentrations of free $[\text{MQAE}_f]$ and bound MQAE $[\text{MQAE}_b]$ is given by

$$F = S_f * [\text{MQAE}_f] + S_b * [\text{MQAE}_b] \quad (2)$$

where S_f and S_b are the proportionality coefficients for free and bound dye, respectively [21]. In the absence of Cl^- the fluorescence of MQAE (F_0) depends on the total concentration of MQAE:

$$F_0 = S_f * ([\text{MQAE}_f] + [\text{MQAE}_b]) \quad (3)$$

The normalized fluorescence is described as

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F_0 - F}{F_0}$$

Introducing F_0 and F from Eqs. 2 and 3, respectively, yields

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{S_f - S_b}{S_f * \frac{\text{MQAE}_f}{\text{MQAE}_b} + S_f} \quad (4)$$

Considering that MQAE and Cl^- form a 1:1 complex [47], the binding behavior is described in analogy to the Michaelis–Menten equation

$$\frac{\text{MQAE}_f}{\text{MQAE}_b} = \frac{K_d}{[\text{Cl}^-]}, \quad (5)$$

where K_d is the dissociation constant. Equations 4 and 5 yield

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{(1 - \frac{S_b}{S_f}) * [\text{Cl}^-]}{K_d + [\text{Cl}^-]} \quad (6)$$

if $[\text{Cl}^-] \rightarrow \infty$,

$$\lim \frac{\Delta F}{F_0} = (1 - \frac{S_b}{S_f}). \quad (7)$$

This coefficient is named $(\frac{\Delta F}{F_0})_{\max}$. Equations 6 and 7 give

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_{\max} * \frac{[\text{Cl}^-]}{K_d + [\text{Cl}^-]} \quad (8)$$

This equation was used to fit the data in Fig. 2A and 3B. Parameters $(\Delta F/F_0)_{\max}$ and K_d were obtained from a Lineweaver–Burk plot

$$\frac{1}{\frac{\Delta F}{F_0}} \text{ vs. } \frac{1}{[\text{Cl}^-]}$$

and equaled 1 and 13 mM, respectively.

Alternatively, the apparent K_d can be determined from a Stern–Volmer plot taking into account that $(\Delta F/F_0)_{\max}$ equals 100%. Thus, Eq. 8 gives

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{[\text{Cl}^-]}{K_d + [\text{Cl}^-]}.$$

Further transformation gives

$$1 - \frac{F}{F_0} = \frac{[\text{Cl}^-]}{K_d + [\text{Cl}^-]}$$

and

$$\frac{F_0}{F} = \frac{[\text{Cl}^-]}{K_d} + 1.$$

Replacing $1/K_d$ with the Stern–Volmer constant K_{SV} gives the Stern–Volmer equation

$$\frac{F_0}{F} = K_{SV} * [\text{Cl}^-] + 1$$

If data points were plotted as

$$\frac{F_0}{F} \text{ vs. } [\text{Cl}^-],$$

the slope of a fit line equals K_{SV} .

References

- Ballanyi K, Grafe P, Reddy MM, ten Bruggencate G (1984) Different types of potassium transport linked to carbachol and gamma-aminobutyric acid actions in rat sympathetic neurons. *Neuroscience* 12:917–927
- Bevensee MO, Apkon M, Boron WF (1997) Intracellular pH regulation in cultured astrocytes from rat hippocampus. II. Electrogenic Na/HCO_3 cotransport. *J Gen Physiol* 110:467–483
- Biwersi J, Verkman AS (1991) Cell-permeable fluorescent indicator for cytosolic chloride. *Biochemistry* 30:7879–7883
- Bormann J, Hamill OP, Sakmann B (1987) Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol (Lond)* 385:243–286
- Brochiero E, Banderali U, Lindenthal S, Raschi C, Ehrenfeld J (1995) Basolateral membrane chloride permeability of A6 cells: implication in cell volume regulation. *Pflügers Arch* 431:32–45
- Brugnara C (1997) Erythrocyte membrane transport physiology. *Curr Opin Hematol* 4:122–127
- Chao AC, Dix JA, Sellers MC, Verkman AS (1989) Fluorescence measurement of chloride transport in monolayer cultured cells. Mechanisms of chloride transport in fibroblasts. *Biophys J* 56:1071–1081
- Dallwig R, Deitmer JW, Backus KH (1999) On the mechanism of GABA-induced currents in cultured rat cortical neurons. *Pflügers Arch* 437:289–297
- Deitmer JW, Rose CR (1996) pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog Neurobiol* 48:73–103

10. Denk W, Strickler JH, Webb WW (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248:73–76
11. Eberhardson M, Patterson S, Grapengiesser E (2000) Microfluorometric analysis of Cl^- permeability and its relation to oscillatory Ca^{2+} signalling in glucose-stimulated pancreatic beta-cells. *Cell Signal* 12:781–786
12. Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi T (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch* 414:600–612
13. Eilers J, Plant TD, Marandi N, Konnerth A (2001) GABA-mediated Ca^{2+} signalling in developing rat cerebellar Purkinje neurones. *J Physiol (Lond)* 536:429–437
14. Engblom AC, Holopainen I, Akerman KE (1989) Determination of GABA receptor-linked Cl^- fluxes in rat cerebellar granule cells using a fluorescent probe SPQ. *Neurosci Lett* 104:326–330
15. Frech MJ, Deitmer JW, Backus KH (1999) Intracellular chloride and calcium transients evoked by gamma-aminobutyric acid and glycine in neurons of the rat inferior colliculus. *J Neurobiol* 40:386–396
16. Fukuda A, Tanaka M, Yamada Y, Muramatsu K, Shimano Y, Nishino H (1998) Simultaneous optical imaging of intracellular Cl^- in neurons in different layers of rat neocortical slices: advantages and limitations. *Neurosci Res* 32:363–371
17. Fukura H, Komiya Y, Igarashi M (1996) Signaling pathway downstream of GABA_A receptor in the growth cone. *J Neurochem* 67:1426–1434
18. Galiotta LJ, Haggie PM, Verkman AS (2001) Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities. *FEBS Lett* 499:220–224
19. Garaschuk O, Hanse E, Konnerth A (1998) Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *J Physiol (Lond)* 507:219–236
20. Garaschuk O, Linn J, Eilers J, Konnerth A (2000) Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nature Neurosci* 3:452–459
21. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450
22. Hara M, Inoue M, Yasukura T, Ohnishi S, Mikami Y, Inagaki C (1992) Uneven distribution of intracellular Cl^- in rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 143:135–138
23. Hoffmann EK, Dunham PB (1995) Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int Rev Cytol* 161:173–262
24. Inglefield JR, Schwartz-Bloom RD (1997) Confocal imaging of intracellular chloride in living brain slices: measurement of GABA_A receptor activity. *J Neurosci Methods* 75:127–135
25. Jayaraman S, Biwersi J, Verkman AS (1999) Synthesis and characterization of dual-wavelength Cl^- -sensitive fluorescent indicators for ratio imaging. *Am J Physiol* 276:C747–C757
26. Jayaraman S, Haggie P, Wachter RM, Remington SJ, Verkman AS (2000) Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. *J Biol Chem* 275:6047–6050
27. Jayaraman S, Verkman AS (2000) Quenching mechanism of quinolinium-type chloride-sensitive fluorescent indicators. *Biophys Chem* 85:49–57
28. Kaila K (1994) Ionic basis of GABA_A receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol* 42:489–537
29. Kaneko H, Nakamura T, Lindemann B (2001) Noninvasive measurement of chloride concentration in rat olfactory receptor cells with use of a fluorescent dye. *Am J Physiol* 280:C1387–C1393
30. Kere J, Lohi H, Hoglund P (1999) Genetic disorders of membrane transport III. Congenital chloride diarrhea. *Am J Physiol* 276:G7–G13
31. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245:1073–1080
32. Kidd JF, Thorn P (2000) Intracellular Ca^{2+} and Cl^- channel activation in secretory cells. *Annu Rev Physiol* 62:493–513
33. Koch MC, Steinmeyer K, Lorenz C, Ricker K, Wolf F, Otto M, Zoll B, Lehmann-Horn F, Grzeschik KH, Jentsch TJ (1992) The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257:797–800
34. Koncz C, Daugirdas JT (1994) Use of MQAE for measurement of intracellular $[\text{Cl}^-]$ in cultured aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol* 267:H2114–H2123
35. Krapf R, Berry CA, Verkman AS (1988) Estimation of intracellular chloride activity in isolated perfused rabbit proximal convoluted tubules using a fluorescent indicator. *Biophys J* 53:955–962
36. Kuner T, Augustine GJ (2000) A genetically encoded ratio-metric indicator for chloride: capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 27:447–459
37. Lau KR, Evans RL, Case RM (1994) Intracellular Cl^- concentration in striated intralobular ducts from rabbit mandibular salivary glands. *Pflugers Arch* 427:24–32
38. MacVinish LJ, Reanchaoren T, Cuthbert AW (1993) Kinin-induced chloride permeability changes in colony 29 epithelia estimated from ^{125}I efflux and MEQ fluorescence. *Br J Pharmacol* 108:469–478
39. Nakamura T, Kaneko H, Nishida N (1997) Direct measurement of the chloride concentration in newt olfactory receptors with the fluorescent probe. *Neurosci Lett* 237:5–8
40. Powers F (1999) The role of chloride in acid-base balance. *J Intraven Nurs* 22:286–291
41. Sah R, Schwartz-Bloom RD (1999) Optical imaging reveals elevated intracellular chloride in hippocampal pyramidal neurons after oxidative stress. *J Neurosci* 19:9209–9217
42. Schwartz RD, Yu X (1995) Optical imaging of intracellular chloride in living brain slices. *J Neurosci Methods* 62:185–192
43. Simon DB, Lifton RP (1996) The molecular basis of inherited hypokalemic alkalosis: Bartter's and Gitelman's syndromes. *Am J Physiol* 271:F961–F966
44. Tran QK, Watanabe H, Zhang XX, Takahashi R, Ohno R (1999) Involvement of myosin light-chain kinase in chloride-sensitive Ca^{2+} influx in porcine aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res* 44:623–631
45. Tsien RY, Waggoner A (1995) Fluorophores for confocal microscopy. In: Pawley JB (ed) *Handbook of biological confocal microscopy*. Plenum, New York, pp 267–279
46. Verkman AS (1990) Development and biological applications of chloride-sensitive fluorescent indicators. *Am J Physiol* 259:C375–C388
47. Verkman AS, Sellers MC, Chao AC, Leung T, Ketcham R (1989) Synthesis and characterization of improved chloride-sensitive fluorescent indicators for biological applications. *Anal Biochem* 178:355–361
48. Wachter RM, Remington SJ (1999) Sensitivity of the yellow variant of green fluorescent protein to halides and nitrate. *Curr Biol* 9:R628–R629
49. Woll E, Gschwentner M, Furst J, Hofer S, Buemberger G, Jungwirth A, Frick J, Deetjen P, Paulmichl M (1996) Fluorescence-optical measurements of chloride movements in cells using the membrane-permeable dye diH-MEQ. *Pflugers Arch* 432:486–493

6. Zusammenfassung

Im Verlaufe der zellulären Reifung wandern (migrieren) unreife Nervenzellen von der Germinalschicht in ihre Zielschicht, in der sie nach dem Auswachsen von Dendriten synaptische Verbindungen bilden. Diese Reifungsprozesse gehen mit Anstiegen der intrazellulären Kalziumkonzentration, sogenannten Kalziumsignalen, einher. Während die Neurotransmitter GABA und Glyzin Nervenzellen des adulten Gehirns hyperpolarisieren und dadurch Aktivität hemmen, depolarisieren sie paradoxerweise unreife Nervenzellen und rufen dadurch Kalziumsignale hervor. In der vorliegenden Arbeit wurden die Rolle und der Mechanismus dieser Signale während der Nervenzellreifung mit Hilfe hochauflösender Kalzium- und Chloridfluoreszenzmessungen in Gehirnschnitten und in Zebrafischlarven untersucht.

Es zeigte sich, dass GABA im Kleinhirn robuste Kalziumsignale sowohl in Körnerzellen während und nach Vollendung der Migration als auch in Purkinjezellen in einer Phase starken dendritischen Wachstums und ausgeprägter Synapsenbildung hervorruft. Als Mechanismus konnte in unreifen Nervenzellen ein Chloridausstrom identifiziert werden, der zu einer Depolarisation mit nachfolgender Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle führt. Im Gegensatz dazu ruft GABA in reifen Nervenzellen einen Chlorideinstrom und dadurch eine Hemmung von Aktivität durch eine Hyperpolarisation der Zellmembran hervor.

Neben der Untersuchung in Gehirnschnitten gelang in der vorliegenden Arbeit erstmals der Nachweis GABA-vermittelter Kalziumsignale in intakten Lebewesen. Dabei evozierten GABA und Glyzin Kalziumsignale in Rückenmarksneuronen von

Zebrafischlarven zu einem Zeitpunkt, zu dem sie die ersten koordinierten Schwimmbewegungen vollzogen.

Insgesamt zeigte sich, dass GABA, im Gegensatz zu seiner hemmenden Wirkung im adulten Gehirn, in unreifen Nervenzellen, die sich in einer Phase dramatischer morphologischer und funktioneller Veränderungen befinden, Kalziumsignale hervorruft. In Anbetracht der Bedeutung von Kalziumsignalen für die Reifung des Gehirns sprechen diese Ergebnisse für eine Rolle von GABA als trophischer Faktor.

7. Schrifttumverzeichnis

- Altman, J. (1972). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 3. Maturation of the components of the granular layer. *J Comp Neurol*, **145**, 465-513.
- Altman, J., & Bayer, S. A. (1996). *Development of the Cerebellar System in Relation to its Evolution, Structure, and Function*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Antonicek, H., Persohn, E., & Schachner, M. (1987). Biochemical and functional characterization of a novel neuron-glia adhesion molecule that is involved in neuronal migration. *J Cell Biol*, **104**, 1587-95.
- Ashworth, R., Zimprich, F., & Bolsover, S. R. (2001). Buffering intracellular calcium disrupts motoneuron development in intact zebrafish embryos. *Brain Res Dev Brain Res*, **129**, 169-79.
- Barker, J. L., Behar, T., Li, Y. X., Liu, Q. Y., Ma, W., Maric, D., Maric, I., Schaffner, A. E., Serafini, R., Smith, S. V., Somogyi, R., Vautrin, J. Y., Wen, X. L., & Xian, H. (1998). GABAergic cells and signals in CNS development. *Perspect Dev Neurobiol*, **5**, 305-22.
- Behar, T. N., Li, Y. X., Tran, H. T., Ma, W., Dunlap, V., Scott, C., & Barker, J. L. (1996). GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci*, **16**, 1808-18.
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 728-39.
- Bergman, U., Rosa, F. W., Baum, C., Wiholm, B. E., & Faich, G. A. (1992). Effects of exposure to benzodiazepine during fetal life. *Lancet*, **340**, 694-6.
- Bevensee, M. O., Apkon, M., & Boron, W. F. (1997). Intracellular pH regulation in cultured astrocytes from rat hippocampus. II. Electrogenic Na/HCO₃ cotransport. *J Gen Physiol*, **110**, 467-83.
- Biwarsi, J., & Verkman, A. S. (1991). Cell-permeable fluorescent indicator for cytosolic chloride. *Biochemistry*, **30**, 7879-83.
- Bormann, J., Hamill, O. P., & Sakmann, B. (1987). Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol*, **385**, 243-86.

- Bowery, N. G., Hill, D. R., & Hudson, A. L. (1983). Characteristics of GABA_B receptor binding sites on rat whole brain synaptic membranes. *Br J Pharmacol*, **78**, 191-206.
- Brickley, S. G., Cull-Candy, S. G., & Farrant, M. (1996). Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABA_A receptors. *J Physiol*, **497**, 753-9.
- Brickley, S. G., Cull-Candy, S. G., & Farrant, M. (1999). Single-channel properties of synaptic and extrasynaptic GABA_A receptors suggest differential targeting of receptor subtypes. *J Neurosci*, **19**, 2960-73.
- Brochiero, E., Banderali, U., Lindenthal, S., Raschi, C., & Ehrenfeld, J. (1995). Basolateral membrane chloride permeability of A6 cells: implication in cell volume regulation. *Pflugers Arch*, **431**, 32-45.
- Brockhaus, J., & Ballanyi, K. (1998). Synaptic inhibition in the isolated respiratory network of neonatal rats. *Eur J Neurosci*, **10**, 3823-39.
- Cherubini, E., Gaiarsa, J. L., & Ben-Ari, Y. (1991). GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci*, **14**, 515-9.
- Cox, K. J., & Fetcho, J. R. (1996). Labeling blastomeres with a calcium indicator: a non-invasive method of visualizing neuronal activity in zebrafish. *J Neurosci Methods*, **68**, 185-91.
- Czuczwar, S. J., & Patsalos, P. N. (2001). The new generation of GABA enhancers. Potential in the treatment of epilepsy. *CNS Drugs*, **15**, 339-50.
- Deitmer, J. W., & Rose, C. R. (1996). pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog Neurobiol*, **48**, 73-103.
- Denk, W., Strickler, J. H., & Webb, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, **248**, 73-6.
- Durand, G. M., Kovalchuk, Y., & Konnerth, A. (1996). Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature*, **381**, 71-5.
- Eberhardson, M., Patterson, S., & Grapengiesser, E. (2000). Microfluorometric analysis of Cl⁻ permeability and its relation to oscillatory Ca²⁺ signalling in glucose-stimulated pancreatic β-cells. *Cell Signal*, **12**, 781-6.
- Edwards, J. A., & Cline, H. T. (1999). Light-induced calcium influx into retinal axons is regulated by presynaptic nicotinic acetylcholine receptor activity in vivo. *J Neurophysiol*, **81**, 895-907.

- Ehrlich, I., Lohrke, S., & Friauf, E. (1999). Shift from depolarizing to hyperpolarizing glycine action in rat auditory neurones is due to age-dependent Cl^- regulation. *J Physiol*, **520 Pt 1**, 121-37.
- Eilers, J., Plant, T. D., Marandi, N., & Konnerth, A. (2001). GABA-mediated Ca^{2+} signalling in developing rat cerebellar Purkinje neurones. *J Physiol*, **536**, 429-37.
- Farrant, M., Feldmeyer, D., Takahashi, T., & Cull-Candy, S. G. (1994). NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature*, **368**, 335-9.
- Fetcho, J. R., & O'Malley, D. M. (1995). Visualization of active neural circuitry in the spinal cord of intact zebrafish. *J Neurophysiol*, **73**, 399-406.
- Fiore, M., Dell'Omo, G., Alleva, E., & Lipp, H. P. (1995). A comparison of behavioural effects of prenatally administered oxazepam in mice exposed to open-fields in the laboratory and the real world. *Psychopharmacology (Berl)*, **122**, 72-7.
- Fukuda, A., Tanaka, M., Yamada, Y., Muramatsu, K., Shimano, Y., & Nishino, H. (1998). Simultaneous optical imaging of intracellular Cl^- in neurons in different layers of rat neocortical slices: advantages and limitations. *Neurosci Res*, **32**, 363-71.
- Fukura, H., Komiya, Y., & Igarashi, M. (1996). Signaling pathway downstream of GABA_A receptor in the growth cone. *J Neurochem*, **67**, 1426-34.
- Galletta, L. J., Haggie, P. M., & Verkman, A. S. (2001). Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities. *FEBS Lett*, **499**, 220-4.
- Ganguly, K., Schinder, A. F., Wong, S. T., & Poo, M. (2001). GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell*, **105**, 521-32.
- Garaschuk, O., Hanse, E., & Konnerth, A. (1998). Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *J Physiol*, **507**, 219-36.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440-50.
- Gu, X., & Spitzer, N. C. (1995). Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca^{2+} transients. *Nature*, **375**, 784-7.

- Hara, M., Inoue, M., Yasukura, T., Ohnishi, S., Mikami, Y., & Inagaki, C. (1992). Uneven distribution of intracellular Cl⁻ in rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett*, **143**, 135-8.
- Hatten, M. E. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci*, **22**, 511-39.
- Inglefield, J. R., & Schwartz-Bloom, R. D. (1997). Confocal imaging of intracellular chloride in living brain slices: measurement of GABA_A receptor activity. *J Neurosci Methods*, **75**, 127-35.
- Inglefield, J. R., & Schwartz-Bloom, R. D. (1998). Optical imaging of hippocampal neurons with a chloride-sensitive dye: early effects of in vitro ischemia. *J Neurochem*, **70**, 2500-9.
- 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. *Neurosci Lett*, **134**, 75-8.
- Inoué, S. (1995). Confocal scanned imaging and light microscopy. In J. B. Pawley (Ed.), *Handbook of biological confocal microscopy* (pp. 1-17). New York: Plenum Press.
- Ito, M. (1984). *The Cerebellum and Neuronal Control*. New York: Raven Press.
- Jakab, R. L., & Hamori, J. (1988). Quantitative morphology and synaptology of cerebellar glomeruli in the rat. *Anat Embryol*, **179**, 81-8.
- Jayaraman, S., Bowers, J., & Verkman, A. S. (1999). Synthesis and characterization of dual-wavelength Cl⁻-sensitive fluorescent indicators for ratio imaging. *Am J Physiol*, **276**, C747-57.
- Jayaraman, S., Haggie, P., Wachter, R. M., Remington, S. J., & Verkman, A. S. (2000). Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. *J Biol Chem*, **275**, 6047-50.
- Jayaraman, S., & Verkman, A. S. (2000). Quenching mechanism of quinolinium-type chloride-sensitive fluorescent indicators. *Biophys Chem*, **85**, 49-57.
- Kaila, K. (1994). Ionic basis of GABA_A receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol*, **42**, 489-537.
- Kakazu, Y., Akaike, N., Komiyama, S., & Nabekura, J. (1999). Regulation of intracellular chloride by cotransporters in developing lateral superior olive neurons. *J Neurosci*, **19**, 2843-51.

- Kaneko, H., Nakamura, T., & Lindemann, B. (2001). Noninvasive measurement of chloride concentration in rat olfactory receptor cells with use of a fluorescent dye. *Am J Physiol Cell Physiol*, **280**, C1387-93.
- Kano, M., Rexhausen, U., Dreessen, J., & Konnerth, A. (1992). Synaptic excitation produces a long-lasting rebound potentiation of inhibitory synaptic signals in cerebellar Purkinje cells. *Nature*, **356**, 601-4.
- Kellogg, C. K., Yao, J., & Pleger, G. L. (2000). Sex-specific effects of in utero manipulation of GABA(A) receptors on pre- and postnatal expression of BDNF in rats. *Brain Res Dev Brain Res*, **121**, 157-67.
- Kerr, R., Lev-Ram, V., Baird, G., Vincent, P., Tsien, R. Y., & Schafer, W. R. (2000). Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron*, **26**, 583-94.
- Komuro, H., & Rakic, P. (1992). Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science*, **257**, 806-9.
- Komuro, H., & Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, **260**, 95-7.
- Komuro, H., & Rakic, P. (1995). Dynamics of granule cell migration: a confocal microscopic study in acute cerebellar slice preparations. *J Neurosci*, **15**, 1110-20.
- Komuro, H., & Rakic, P. (1996). Intracellular Ca^{2+} fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron*, **17**, 275-85.
- Komuro, H., & Rakic, P. (1998a). Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J Neurosci*, **18**, 1478-90.
- Komuro, H., & Rakic, P. (1998b). Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca^{2+} fluctuations. *J Neurobiol*, **37**, 110-30.
- Koncz, C., & Daugirdas, J. T. (1994). Use of MQAE for measurement of intracellular $[Cl^-]$ in cultured aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol*, **267**, H2114-23.
- Krapf, R., Berry, C. A., & Verkman, A. S. (1988). Estimation of intracellular chloride activity in isolated perfused rabbit proximal convoluted tubules using a fluorescent indicator. *Biophys J*, **53**, 955-62.

- Kulik, A., Nishimaru, H., & Ballanyi, K. (2000). Role of bicarbonate and chloride in GABA- and glycine-induced depolarization and $[Ca^{2+}]_i$ rise in fetal rat motoneurons in situ. *J Neurosci*, **20**, 7905-13.
- Kuner, T., & Augustine, G. J. (2000). A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, **27**, 447-59.
- Laegreid, L., Olegard, R., Conradi, N., Hagberg, G., Wahlstrom, J., & Abrahamsson, L. (1990). Congenital malformations and maternal consumption of benzodiazepines: a case-control study. *Dev Med Child Neurol*, **32**, 432-41.
- Lau, K. R., Evans, R. L., & Case, R. M. (1994). Intracellular Cl^- concentration in striated intralobular ducts from rabbit mandibular salivary glands. *Pflugers Arch*, **427**, 24-32.
- Laurie, D. J., Seeburg, P. H., & Wisden, W. (1992). The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J Neurosci*, **12**, 1063-76.
- Leinekugel, X., Khalilov, I., McLean, H., Caillard, O., Gaiarsa, J. L., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (1999). GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Adv Neurol*, **79**, 189-201.
- Lindner, J., Rathjen, F. G., & Schachner, M. (1983). L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature*, **305**, 427-30.
- 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**, 1287-98.
- Lu, J., Karadsheh, M., & Delpire, E. (1999). Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J Neurobiol*, **39**, 558-68.
- MacVinish, L. J., Reancharoen, T., & Cuthbert, A. W. (1993). Kinin-induced chloride permeability changes in colony 29 epithelia estimated from $^{125}I^-$ efflux and MEQ fluorescence. *Br J Pharmacol*, **108**, 469-78.
- Maglova, L. M., Crowe, W. E., Smith, P. R., Altamirano, A. A., & Russell, J. M. (1998). $Na^+K^+Cl^-$ cotransport in human fibroblasts is inhibited by cytomegalovirus infection. *Am J Physiol*, **275**, C1330-41.

- Marandi, N., Konnerth, A., Garaschuk, O. (2002). Two-photon chloride imaging in neurons of brain slices. *Pflugers Arch*, DOI 10.1007/s00424-002-0933-7.
- Mariani, J., & Changeux, J. P. (1981). Ontogenesis of olivocerebellar relationships. I. Studies by intracellular recordings of the multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the developing rat cerebellum. *J Neurosci*, **1**, 696-702.
- Marty, S., Berninger, B., Carroll, P., & Thoenen, H. (1996). GABAergic stimulation regulates the phenotype of hippocampal interneurons through the regulation of brain-derived neurotrophic factor. *Neuron*, **16**, 565-70.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., & Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, **309**, 261-3.
- Meinecke, D. L., & Rakic, P. (1990). Developmental expression of GABA and subunits of the GABA_A receptor complex in an inhibitory synaptic circuit in the rat cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res*, **55**, 73-86.
- Nakamura, T., Kaneko, H., & Nishida, N. (1997). Direct measurement of the chloride concentration in newt olfactory receptors with the fluorescent probe. *Neurosci Lett*, **237**, 5-8.
- Noll-Hussong, M. (2002). Entwicklungsabhängige Änderung neuronaler Kalziumsignale. -Als Ms. gedr.. - Berlin : dissertation.de.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, **307**, 462-5.
- O'Malley, D. M., Kao, Y. H., & Fetcho, J. R. (1996). Imaging the functional organization of zebrafish hindbrain segments during escape behaviors. *Neuron*, **17**, 1145-55.
- 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. *J Neurosci*, **16**, 6414-23.
- Perkins, K. L., & Wong, R. K. (1996). Ionic basis of the postsynaptic depolarizing GABA response in hippocampal pyramidal cells. *J Neurophysiol*, **76**, 3886-94.
- Rakic, P. (1990). Principles of neural cell migration. *Experientia*, **46**, 882-91.

- Rakic, P., Cameron, R. S., & Komuro, H. (1994). Recognition, adhesion, transmembrane signaling and cell motility in guided neuronal migration. *Curr Opin Neurobiol*, **4**, 63-9.
- Reichling, D. B., Kyzozis, A., Wang, J., & MacDermott, A. B. (1994). Mechanisms of GABA and glycine depolarization-induced calcium transients in rat dorsal horn neurons. *J Physiol*, **476**, 411-21.
- Rhee, J. S., Ebihara, S., & Akaike, N. (1994). Gramicidin perforated patch-clamp technique reveals glycine-gated outward chloride current in dissociated nucleus solitarii neurons of the rat. *J Neurophysiol*, **72**, 1103-8.
- Rio, C., Rieff, H. I., Qi, P., Khurana, T. S., & Corfas, G. (1997). Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron*, **19**, 39-50.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., & Kaila, K. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, **397**, 251-5.
- Roberts, A. A., Pleger, G. L., & Kellogg, C. K. (2001). Effect of prenatal exposure to diazepam on brain GABA(A) receptor mRNA levels in rats examined at late fetal or adult ages. *Dev Neurosci*, **23**, 135-44.
- 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. *J Neurosci*, **16**, 82-91.
- Rose, C. R., Kovalchuk, Y., Eilers, J., & Konnerth, A. (1999). Two-photon Na⁺ imaging in spines and fine dendrites of central neurons. *Pflugers Arch*, **439**, 201-7.
- Rossi, D. J., & Slater, N. T. (1993). The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. *Neuropharmacology*, **32**, 1239-48.
- Sah, R., & Schwartz-Bloom, R. D. (1999). Optical imaging reveals elevated intracellular chloride in hippocampal pyramidal neurons after oxidative stress. *J Neurosci*, **19**, 9209-17.
- Schwartz, R. D., & Yu, X. (1995). Optical imaging of intracellular chloride in living brain slices. *J Neurosci Methods*, **62**, 185-92.
- Singh, Y., Jaiswal, A. K., Singh, M., & Bhattacharya, S. K. (1998). Effect of prenatal diazepam, phenobarbital, haloperidol and fluoxetine exposure on foot shock induced aggression in rats. *Indian J Exp Biol*, **36**, 1023-4.

- Sorimachi, M., Yamagami, K., Morita, Y., & Kuramoto, K. (1991). GABA inhibits the rise in cytosolic free calcium concentration in depolarized immature cerebellar Purkinje cells. *Neurosci Lett*, **122**, 229-32.
- Spoerri, P. E. (1988). Neurotrophic effects of GABA in cultures of embryonic chick brain and retina. *Synapse*, **2**, 11-22.
- Sun, M. K., Nelson, T. J., Xu, H., & Alkon, D. L. (1999). Calcitonin transformation of GABAergic synapses: from excitation filter to amplifier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7023-8.
- Tran, Q. K., Watanabe, H., Zhang, X. X., Takahashi, R., & Ohno, R. (1999). Involvement of myosin light-chain kinase in chloride-sensitive Ca^{2+} influx in porcine aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res*, **44**, 623-31.
- Tsien, R. Y. (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, **290**, 527-8.
- Tsien, R. Y., & Waggoner, A. (1995). Fluorophores for confocal microscopy. In J. B. Pawley (Ed.), *Handbook of biological confocal microscopy* (pp. 267-279). New York: Plenum Press.
- Verkman, A. S. (1990). Development and biological applications of chloride-sensitive fluorescent indicators. *Am J Physiol*, **259**, C375-88.
- Verkman, A. S., Sellers, M. C., Chao, A. C., Leung, T., & Ketcham, R. (1989). Synthesis and characterization of improved chloride-sensitive fluorescent indicators for biological applications. *Anal Biochem*, **178**, 355-61.
- Vigot, R., & Batini, C. (1997). GABA(B) receptor activation of Purkinje cells in cerebellar slices. *Neurosci Res*, **29**, 151-60.
- Wachter, R. M., & Remington, S. J. (1999). Sensitivity of the yellow variant of green fluorescent protein to halides and nitrate. *Curr Biol*, **9**, R628-9.
- Wall, M. J., & Usowicz, M. M. (1997). Development of action potential-dependent and independent spontaneous GABA_A receptor-mediated currents in granule cells of postnatal rat cerebellum. *Eur J Neurosci*, **9**, 533-48.
- Wang, J., Reichling, D. B., Kyrozis, A., & MacDermott, A. B. (1994). Developmental loss of GABA- and glycine-induced depolarization and Ca^{2+} transients in embryonic rat dorsal horn neurons in culture. *Eur J Neurosci*, **6**, 1275-80.
- Woll, E., Gschwentner, M., Furst, J., Hofer, S., Buemberger, G., Jungwirth, A., Frick, J., Deetjen, P., & Paulmichl, M. (1996). Fluorescence-optical measurements

- of chloride movements in cells using the membrane-permeable dye diH-MEQ. *Pflugers Arch*, **432**, 486-93.
- Woodward, D. J., Hoffer, B. J., Siggins, G. R., & Bloom, F. E. (1971). The ontogenetic development of synaptic junctions, synaptic activation and responsiveness to neurotransmitter substances in rat cerebellar purkinje cells. *Brain Res*, **34**, 73-97.
- Wu, W. L., Ziskind-Conhaim, L., & Sweet, M. A. (1992). Early development of glycine- and GABA-mediated synapses in rat spinal cord. *J Neurosci*, **12**, 3935-45.
- Xu, C., Zipfel, W., Shear, J. B., Williams, R. M., & Webb, W. W. (1996). Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10763-8.
- Yuste, R., & Katz, L. C. (1991). Control of postsynaptic Ca^{2+} influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron*, **6**, 333-44.
- Zhang, L., Spigelman, I., & Carlen, P. L. (1991). Development of GABA-mediated, chloride-dependent inhibition in CA1 pyramidal neurones of immature rat hippocampal slices. *J Physiol*, **444**, 25-49.
- Zheng, C., Heintz, N., & Hatten, M. E. (1996). CNS gene encoding astrotactin, which supports neuronal migration along glial fibers. *Science*, **272**, 417-9.

8. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 21.07.73
 Geburtsort: Karlsruhe
 Familienstand verheiratet, 2 Kinder

Ausbildung

1980 - 1984	Besuch der Grundschule Südendschule in Karlsruhe
1984 - 1993	Besuch des Bismarckgymnasiums in Karlsruhe
1993	Abitur
1993 - 1999	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Homburg
1999 - 2000	Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München (Praktisches Jahr)
2000	3. Staatsexamen der Humanmedizin

Berufstätigkeit

01.01.01 – 30.06.01	Tätigkeit als Arzt im Praktikum am Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
01.07.01 – 30.06.02	Tätigkeit als Arzt im Praktikum am Anästhesiologischen Institut des Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
01.07.02	Doktorand am Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

9. Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Arthur Konnerth durchgeführt. Herrn Prof. Dr. Konnerth möchte ich vor allem danken für die intensive Betreuung auf inhaltlicher und methodischer Ebene, aber auch für eine Reihe von Diskussionen, die mich generell den kritische Umgang mit wissenschaftlichen Ergebnissen gelehrt haben.

Mein herzlicher Dank gilt auch PD Dr. Jens Eilers und Dr. Olga Garaschuk, die mich im Verlauf der bisherigen wissenschaftlichen Tätigkeit mit großem Engagement unterstützt haben ebenso wie Dr. Knut Holthoff und Dr. Michael Noll-Hussong, die die Niederschrift dieser Dissertation kritisch unterstützt haben. Außerdem möchte ich mich bedanken bei Edna Brustein und Pierre Drapeau von der McGill Universität in Montreal für die Zusammenarbeit bei den Versuchen an Zebrafischlarven.

Insbesondere erwähnen möchte ich auch die Mitarbeiter des Physiologischen Instituts, die mit ihrer Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Am Ende möchte ich meiner Familie und insbesondere meiner Frau und meinen Kindern dafür danken, mir jeden Tag zu zeigen, dass eine der wichtigsten Fragestellungen der Wissenschaft die nach den Mechanismen der Gehirnentstehung und damit der Entwicklung der menschlichen Fähigkeiten ist.