

*Postnatale Entwicklung einer
Subpopulation GABAerger Interneurone
im sensomotorischen Cortex der
transgenen Mauslinie FVB-Tg(GadGFP)
45704Swn/J*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

angefertigt am Lehrstuhl für Physiologische Genomik
der Fakultät für Medizin der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Florian Werthat
München, den 14.12.2011

Sondervotum: Prof. Dr. Bernd Sutor

Erstgutachter: Prof. Dr. Benedikt Grothe

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans Straka

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2012

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	4
2.1	Das Gehirn der Säugetiere	5
2.2	Inhibitorische Interneurone	6
2.2.1	GFP exprimierende Interneurone (GIN)	7
2.2.2	Klassifizierung der Interneurone	9
2.2.2.1	Morphologie	9
2.2.2.2	Proteine und Neuropeptide	11
2.2.2.3	Aktionspotential-Entladungsmuster	13
2.2.2.4	Weitere Kriterien	15
2.2.2.5	Zusammenfassung	17
2.3	Die Entstehung der Vielfalt an Interneuronen	19
2.3.1	Die Entstehung von GABAergen Interneuronen	19
2.3.2	Migration der Interneurone	24
2.4	Fragestellung der Arbeit	27
3	Material und Methoden	29
3.1	Versuchstiere	29
3.2	Immunhistochemie	29
3.2.1	Verwendete Lösungen und allgemeine Techniken	29
3.2.2	Bestimmung des Geburtszeitpunktes der GIN	30
3.2.3	Konstruktion einer Gehirnkarte und Bestimmung der Zelldichte von GIN	32
3.2.4	Protein- und Peptidprofil der GIN	33
3.2.5	Zellrekonstruktion	35
3.2.6	Auswertung der Daten	36
3.3	Elektrophysiologie	37
3.3.1	Präparation der Gehirnschnitte	37
3.3.2	Versuchsaufbau und Messvorgang	38
3.3.3	Applikation von Pharmaka	40
3.3.4	Auswertung der Daten	40
4	Ergebnisse	42
4.1	Immunhistochemische Untersuchungen	42
4.1.1	Bestimmung des Geburtszeitpunktes der GIN	42

4.1.2	Gehirnkarten und die Entwicklung der Dichte an GIN	46
4.1.2.1	Bestimmung der GIN-Dichte	46
4.1.2.2	Gehirnkarten	48
4.1.3	Postnatale Entwicklung der Somatostatin- und Calretininexpression im Neocortex von GIN-Mäusen	52
4.1.3.1	Somatostation	53
4.1.3.2	Calretinin	56
4.1.4	Morphologische Entwicklung von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus	59
4.1.5	Morphologischer Typ adulter GIN des sensomotorischen Cortex der Maus	65
4.2	Elektrophysiologie	69
4.2.1	Passive Membraneigenschaften von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus	69
4.2.1.1	Membraneingangswiderstand	71
4.2.1.2	Membranzeitkonstante	73
4.2.2	Strom-Spannungsbeziehung von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus	74
4.2.3	Eigenschaften von Aktionspotentialen in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus	79
4.2.3.1	Entladungsschwelle	79
4.2.3.2	Amplituden der Aktionspotentiale	80
4.2.3.3	Dauer der Aktionspotentiale	81
4.2.3.4	Nachhyperpolarisation der Aktionspotentiale	83
4.2.3.5	Entladungsverhalten der GIN im sensomotorischen Cortex der Maus	84
4.2.3.5.1	Entladungsmuster	84
4.2.3.5.2	Quantitative Analyse des Entladungsmusters von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus während der postnatalen Entwicklung	86
4.2.4	Postnatale Entwicklung des synaptischen Zustroms zu GIN im sensomotorischen Cortex der Maus	94
4.2.4.1	Frequenz und Amplitudenverteilung	94
4.2.4.2	Verlaufskinetik der spontanen synaptischen Potentiale	98
4.2.4.2.1	Spontane synaptische Potentiale der Gruppe 1	99
4.2.4.2.2	Spontane synaptische Potentiale der Gruppe 2	101
4.2.4.3	Sensitivität der spontanen synaptischen Potentiale gegenüber Glutamat- und GABA _A -Rezeptorantagonisten	104
4.2.4.4	GABA-vermittelte spontane synaptische Potentiale	110
5	Diskussion	113
5.1	Methodenbetrachtungen	113
5.1.1	Immunhistochemische Methoden	113
5.1.2	Elektrophysiologische Methoden	116
5.2	Entwicklung von GFP-positiven Neuronen des sensomotorischen Cortex von FVB-Tg(GadGFP)45705Swn/J-Mäusen	117

5.2.1	Pränatale Entwicklung der GIN	117
5.2.1.1	Ursprung der GIN in der ganglionären Eminenz	118
5.2.1.2	Migration der GIN	121
5.2.1.3	Unterschiede bei der Generation der GIN	124
5.2.2	Postnatale Entwicklung der GIN im sensomotorischen Cortex der Maus	125
5.2.2.1	Verteilung der Neurone im sensomotorischen Cortex	125
5.2.2.2	Expression von Markermolekülen in GIN des sensomotorischen Cortex	126
5.2.2.3	Morphologische Entwicklung der GIN im sensomotorischen Cortex	128
5.2.2.4	Postnatale Entwicklung der elektrophysiologischen Eigenschaften der GIN im sensomotorischen Cortex	130
5.2.2.4.1	Passive Membraneigenschaften	130
5.2.2.4.2	Strom-Spannungsbeziehung	132
5.2.2.4.3	Aktionspotentiale und Entladungsverhalten	133
5.2.2.4.4	Entwicklung der synaptischen Innervation von GIN	134
5.2.3	Zusammenfassende Betrachtung	135
6	Literatur	141
7	Anhang	153
7.1	Abkürzungsverzeichnis	153
7.2	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	156
7.2.1	Abbildungen	156
7.2.2	Tabellen	160
8	Danksagung	161
9	Ehrenwörtliche Versicherung	162
10	Lebenslauf	163

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die postnatale Entwicklung einer Subpopulation GABAerger Interneurone (GABA: γ -Aminobuttersäure) des sensomotorischen Cortex in der transgenen Mauslinie FVB-Tg(GadGFP)45704Swn/J immunhistochemisch und elektrophysiologisch untersucht. Diese Neurone exprimieren das grün-fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle des Promotors für das Gen des GABA-synthetisierenden Isoenzymes Glutamat-Decarboxylase 67 (Gad67). Des Weiteren produzieren diese Zellen das Neuropeptid Somatostatin und das Calcium-bindende Protein Calretinin. Die Untersuchungen beschränkten sich auf GFP-exprimierende Interneurone (GFP expressing inhibitory neuron, GIN) des sensomotorischen Cortex und auf den Entwicklungszeitraum vom postnatalen Tag zwei (P2) bis P22.

Mit Hilfe der Bromodesoxyuridin (BrdU)-Technik wurde der Geburtszeitpunkt der GIN bestimmt. Es zeigte sich, dass sie im Verlauf von mehreren embryonalen Tagen (E13 bis E17) generiert werden. Der größte Teil der Neurone entsteht zwischen E14 bis E16. Dies gilt aber nur für GIN des sensomotorischen Cortex. Neurone des cingulären Cortex werden etwa einen Tag früher geboren.

Im sensomotorischen Cortex kann man GIN erst um P7 mittels Epifluoreszenzmikroskopie nachweisen. Ihre Anzahl steigt dann sehr schnell an und erreicht um P10 ihr Maximum. In anderen Cortexbereichen (cingulärer oder entorhinaler Cortex) sind GIN bereits ab P2 vorhanden. Im Hippocampus treten sie, ähnlich wie im sensomotorischen Cortex, erst um P7 auf.

Die Markermoleküle der GIN im sensomotorischen Cortex – Somatostatin (SST) und Calretinin (CR) – werden offenbar parallel mit dem GFP exprimiert, da die Entwicklungszeitverläufe der Expression von GFP, Somatostatin und Calretinin sehr ähnlich sind. Allerdings findet man nicht in allen GFP-positiven Zellen auch Somatostatin oder Calretinin. Somatostatin war in 71,5% der GIN nachweisbar und Calretinin in 35,9%.

Die entwicklungsabhängigen Veränderungen der Morphologie der GIN wurden durch Anfärben der Neurone mit der Biocytin-Streptavidin-Technik, Zellrekonstruktion und Shollanalyse untersucht. Wie zu erwarten war, kam es während der ersten beiden

Entwicklungswochen zu einer starken Zunahme der dendritischen und axonalen Verzweigungen.

Zur Analyse der Entwicklung der elektrophysiologischen Eigenschaften der GIN wurde die Ganzzell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik angewendet.

Während sich das Ruhemembranpotential (entspricht dem Membranpotential, das sich nach Etablierung des Ganzzell-Modus spontan einstellt) über den untersuchten Entwicklungszeitraum nicht veränderte, beobachtete man während der ersten zehn postnatalen Tage eine Abnahme des Zelleingangswiderstandes und der somatischen Membranzeitkonstante. Die Steigungen (d.h. die Steigungswiderstände) der Strom-Spannungskurven reduzierten sich ebenfalls mit zunehmendem Entwicklungsalter. In allen Alterstufen waren die Strom-Spannungsbeziehungen nicht linear, was für das Vorhandensein von spannungsabhängigen Membranleitfähigkeiten spricht. In den meisten Neuronen fand sich eine Einwärtsgleichrichtung.

Sowohl die Amplituden der Aktionspotentiale als auch die zur Auslösung von Aktionspotentialen notwendigen Schwellendepolarisationen wiesen keine Veränderung während des untersuchten Entwicklungszeitraumes auf. Dies spricht dafür, dass der ionale Mechanismus, der für Aktionspotentiale verantwortlich ist, bereits früh ausreift. Allerdings verkürzen sich die Aktionspotentiale der GIN innerhalb der ersten zwei Wochen um 0,9 ms.

Die Analyse des Entladungsverhaltens ergab, dass alle Neurone, unabhängig vom Entwicklungsalter, eine Frequenzadaptation aufweisen. Das Ausmaß der Adaptation wird mit zunehmendem Alter aber größer. Zudem fand sich bei älteren Tieren eine deutlich höhere initiale Entladungsfrequenz während einer Strompuls-induzierten Aktionspotentialsalve.

Die Aktionspotentialnachhyperpolarisation der GIN ist ebenfalls einer postnatalen Entwicklung unterworfen. Sie zeigt nach eineinhalb Wochen (ca. ab P12) einen zweiphasigen Verlauf, der vorher nicht vorhanden war. Zudem konnte man bei älteren GIN zwei verschiedene Typen der Nachhyperpolarisation feststellen, die möglicherweise auf die Entwicklung von unterschiedlichen Calcium-abhängigen Kaliumströmen zurückzuführen sind.

In der Alterstufe P21 und älter erhalten die GIN eine ausgeprägte synaptische Innervation, was sich im hochfrequenten Auftreten von spontanen synaptischen Potentialen zeigt. Außerdem konnten zwei unterschiedliche Gruppen an spontanen synaptischen Potentialen unterschieden werden: solche mit Amplituden bis 1,5 mV (Gruppe 1) und solche mit Amplituden größer als 1,5 mV (Gruppe 2). Während der postnatalen Entwicklung erhöhte sich v.a. die Frequenz der postsynaptischen Ereignisse. Auch fand sich, dass der Anteil der Potentiale der Gruppe 2 im Verlauf der postnatalen Entwicklung zunahm.

Durch Anwendung von Glutamat- und GABA_A-Rezeptorantagonisten konnte gezeigt werden, dass die GIN bereits ab P6 eine glutamaterge Innervation erhalten, die durch α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure (AMPA)/Kainatetrezeptoren vermittelt wird. Außerdem konnte die Existenz von funktionellen GABA_A-Rezeptoren in allen Altersstufen nachgewiesen werden. Dagegen spielen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren bei der Generierung dieser spontanen synaptischen Potentiale keine evidente Rolle.

GFP-exprimierende Interneurone des sensomotorischen Cortex von transgenen FVB-Tg(GadGFP)45704Swn/J-Mäusen durchlaufen also während der postnatalen Entwicklung deutliche Veränderungen ihrer Morphologie, ihres Expressionsmusters (Somatostatin und Calretinin) und ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften. Inwieweit diese Entwicklungsmuster genetisch determiniert sind, oder durch lokale Faktoren induziert werden, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

2

Einleitung

„Eine Entwicklung zum Besseren ist selten möglich, ohne dass neue Übel entstehen, gegen die neue Mittel gefunden werden müssen.“

William Howard Taft (1857 - 1930)

27. Präsident der Vereinigten Staaten von Amerika (1909 - 1913)

Obwohl dieser Satz einen politischen Hintergrund hat, ist er auch in Bezug auf die Naturwissenschaften nicht ohne Relevanz. In der Biologie wird das vorhandene Wissen immer mehr erweitert und verfeinert. Neue Erkenntnisse werden gewonnen, die Altbekanntes widerlegen oder neue Aspekte aufzeigen. Und so wirft die Vertiefung des Wissens durch neue Erkenntnisse, also die Weiterentwicklung des Bekannten, immer neue Fragen auf, die auf ihre Beantwortung warten. In diesem Sinne könnten die neu auftauchenden Fragen also das Übel sein, dass es auszuräumen gilt, um die Erkenntnisse in einem Bereich der Wissenschaften zu verfeinern, zu erneuern, zu vertiefen, also zum Besseren zu entwickeln.

Das an den Anfang gestellte Zitat kann aber auch auf biologische Vorgänge, wie z.B. auf die Evolution angewendet werden. Das Leben auf der Erde ist einem fortwährenden Wandel unterworfen, einer Entwicklung, die zwar *per definitionem* nicht zielgerichtet ist, aber dennoch Veränderungen an den rezenten Organismen verursacht, diesen damit neue Möglichkeiten und Vorzüge einräumt, oder aber einen Organismus aus dem System verschwinden lässt. So ergeben sich auch beim Prozess der Evolution durch eine Weiterentwicklung neue „Übel“, mit denen ein Organismus fertig werden muss. Eine Anpassung und Spezialisierung bringt immer Vor- und Nachteile mit sich. Vorteile, da eine Spezialisierung in neuen und besseren Möglichkeiten resultieren kann, Nachteile, da eine Spezialisierung die Flexibilität und Anpassungsfähigkeit einschränken und die Abhängigkeit von extrinsischen Faktoren erhöhen kann. Das Ergebnis einer solchen Entwicklung kann im Extremfall die Extinktion eines überspezialisierten Organismus sein.

Die Ontogenese, d.h. die Entwicklung eines Lebewesens von der Eizelle zum fertigen Organismus, ist ein dem Evolutionsprozess analoger Vorgang. Auch hier ist eine Entwicklung zum Besseren selten möglich, ohne dass neue Probleme entstehen. Dass diese Probleme nicht immer bewältigt werden können wird deutlich durch die verschiedensten Defekte, die auftreten können, wenn die Ontogenese nicht regelgerecht abläuft.

Eine biologische Entwicklung ist in jedem Falle ein interessanter Mechanismus. Und so ist es nicht verwunderlich, dass viel Aufwand betrieben wird, um diesen Vorgang zu ergründen und zu verstehen.

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang natürlich die Entwicklung des Gehirns. Ein Organ, das einen Körper zu steuern und zu lenken vermag und einem Wesen dessen Sein und Denken verleiht, zieht viel Aufmerksamkeit auf sich. Die Ergründung seiner Funktion und Entstehung ist eine zentrale Fragestellung in der Neurobiologie. Sie steht vor demselben Dilemma, welches sich durch das zu Anfang gestellte Zitat ergibt: Neue Erkenntnisse führen unweigerlich zu neuen Fragen.

2.1 **Das Gehirn der Säugetiere**

Das Gehirn verfügt über die Möglichkeit den Körper zu steuern, ihn seine Umwelt wahrnehmen zu lassen und hilft ihm, seine Homöostase aufrecht zu erhalten. All dies wird erst möglich, indem die Zellen, aus denen dieses Organ zusammengesetzt ist, in einem präzisen und funktionierenden Netzwerk arbeiten. Dieses Netzwerk besteht aus vielen funktionellen Einheiten, die bestimmte Aufgaben übernehmen und mit anderen Einheiten in enger Verbindung stehen.

Die Großhirnrinde der Säugetiere wird oft als der wichtigste Bereich des Gehirns angesehen, da dieser Teil einige der Entwicklungsgeschichtlich jüngsten und damit am weitesten entwickelten Bereiche des Gehirns enthält. Die Großhirnrinde kann in mehrere funktionelle Areale eingeteilt werden, denen bestimmte Teilstrukturen zugeordnet sind. Diese funktionellen Areale müssen untereinander und auch mit vor- und nachgeschalteten subcorticalen Gebieten verbunden sein, um wichtige Informationen zu erhalten, zu verarbeiten und weiterzuleiten. Dadurch entsteht ein komplexes Netzwerk, welches auf relativ geringem Raum eine Vielfalt an Funktionen vereint und so einem Organismus erlaubt, seine Umwelt wahrzunehmen, auf sie zu reagieren und aus diesen Reaktionen zu lernen. Um dies alles bewerkstelligen zu können, braucht das Gehirn spezialisierte Zellen. Dies sind die Neurone.

Im Gehirn findet man, vom funktionellen Standpunkt aus gesehen, zwei Arten von Nervenzellen: exzitatorische (DeFelipe et al., 1992; White, 1989) und inhibitorische Neurone (DeFelipe, 2002; Cauli et al., 1997). Durch die Erregungen, die von den Prinzipalzellen des Neocortex, den Pyramidenzellen, ausgehen, können andere Neurone im Neocortex oder Zellen in anderen Gebieten des Gehirns aktiviert und so Effekte lokal oder über

Zwischenstationen in der Peripherie bewirkt werden; die Exzitation ist somit die „exekutive“ Komponente der „Sprache des Gehirns“. Nicht weniger wichtig ist die neuronale Inhibition als Regulativ der Erregung. Alle Erregungen in den Systemen des Gehirns wären unnütz, würden sie nicht gesteuert, gelenkt und modifiziert werden. Diese Aufgabe, also die Anpassung der Erregung an die tatsächlichen Erfordernisse, obliegt den inhibitorischen Interneuronen. Im Neocortex machen die Interneurone nur ca. 20% (Tamamaki et al., 2003) aller Neurone aus. Dies ist jedoch ausreichend, um die Aktivität der wesentlich häufiger vorkommenden Pyramidenzellen zu kontrollieren. Wird die Hemmung durch die Interneurone eingeschränkt (z.B. durch Pharmaka), kommt es zu synchronen Entladungen der Pyramidenzellen, die als epileptiforme Aktivität bezeichnet werden (Pfeiffer et al., 1996).

Die inhibitorischen Interneurone des Neocortex sind nicht nur einfach eine hemmende Komponente. Ihre besondere Aufgabe besteht darin, die Netzwerkaktivität im Cortex zu formen, zu lenken und zu beeinflussen. Würde man die Exzitation als die Töne der „Sprache des Gehirns“ betrachten, so käme der Inhibition die Aufgabe der Stimmbänder zu. Diese modulieren die Töne und formen sie zu einer verständlichen Sprache. Ohne die hemmenden Interneurone wären höhere Funktionen des Gehirns, wie z.B. Wahrnehmung und Lernen, nicht möglich.

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit diesen speziellen Neuronen. Insbesondere wurde die postnatale Entwicklung einer bestimmten Subpopulation dieser Interneurone untersucht.

2.2 Inhibitorische Interneurone

Die inhibitorischen Interneurone stellen nur einen kleinen Anteil der Neurone des Neocortex (Tamamaki et al., 2003). Neocorticale inhibitorische Interneurone setzen in den meisten Fällen GABA frei und wirken u.a. über GABA_A-Rezeptoren, die im aktivierte Zustand permeabel für Chloridionen sind (Möhler, 2006), hemmend auf die Aktivität von nachgeschalteten Neuronen. Die erhöhte Chloridpermeabilität der Membran führt zum einen zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials und zum anderen zu einem so genannten „shunt“ der Membran, das bedeutet zu einem Kurzschluß des Membranpotentials. Beide Mechanismen wirken einer Depolarisation der Membran entgegen. Trotz dieser einheitlichen Funktionsweise sind diese Neurone überaus heterogen (Halabisky et al., 2006; Ma et al., 2006; Xu et al., 2006; Kawaguchi und Kondo, 2002; Gupta et al., 2000; Kawaguchi und Kubota, 1997; Kubota und Kawaguchi, 1997; Kawaguchi, 1995; Kubota et al., 1994;

Kawaguchi, 1993 a; Kawaguchi, 1993 b). Bis heute sind eine Vielzahl an verschiedenen Typen identifiziert worden, die sich in ihrer Morphologie, ihrer Expression von Calcium-bindenden Proteinen und Neuropeptiden, sowie in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften teilweise stark unterscheiden. Es ist also nicht verwunderlich, dass seit Mitte der 70iger Jahre versucht wurde, diese Neurone in verschiedene Klassifizierungsschemata einzuteilen (Halabisky et al., 2006; Ma et al., 2006; Kawaguchi und Kondo, 2002; Gupta et al., 2000; DeFelipe, 1997; Kawaguchi, 1993 a; Kawaguchi, 1993 b; Connors et al., 1990; Jones, 1975). Allerdings ist keines der bis jetzt entwickelten Schemata universell anwendbar, es gibt viele Ausnahmen und Widersprüche. Andererseits ist jedoch klar, dass es Subpopulationen an Interneuronen gibt, die bestimmte Eigenschaften teilen und hauptsächlich bestimmte Aufgaben (wie z.B. Aktionspotentialeditierung) übernehmen. Es ist also gerade diese Heterogenität, die die Interneurone befähigt, ihre vielfältigen Aufgaben wahrzunehmen und zur Funktion des ganzen Gehirns beizutragen. Gleichzeitig erschwert diese Vielfalt die Untersuchung der GABAerigen Interneurone und so müssen Wege gefunden werden, die es erlauben, die verschiedenen Subtypen zu identifizieren und dann zu analysieren. Ein möglicher Weg ist die „genetische Markierung“ der Interneurone mit fluoreszierenden Proteinen.

2.2.1 GFP exprimierende Interneurone (GIN)

Mit Hilfe von molekulargenetischen Methoden lassen sich Neuronengruppen markieren und eindeutig identifizieren. Die Technik beruht darauf, dass man ein Gen identifiziert, das nur in dem in Frage stehenden Neuronentyp exprimiert wird. Der Promotor dieses Gens wird dann verwendet, um die Expression von fluoreszierenden Proteinen in diesen Neuronen zu steuern. Auf diese Weise lassen sich die markierten Neurone leicht im Fluoreszenzmikroskop finden. Zur „genetischen“ Markierung von Zellen wird häufig das grün-fluoreszierende Protein verwendet, das ursprünglich aus einer Tiefseequalle (*Aequorea victoria*) stammt.

Mäuse, bei denen die Expression des GFPs unter die Kontrolle des Gad67-Promotors gestellt wurde, waren wohl die ersten Tiermodelle, in denen GABAerige Interneurone mittels des GFPs, auch während elektrophysiologischer Experimente, eindeutig identifiziert werden konnten. Gad67 (Isoform der Glutamat-Decarboxylase, Molekulargewicht: 67 kDa, Bezeichnung des Gens: GAD1) ist ein Enzym, das aus Glutamat GABA herstellt und im Neocortex nur in GABAerigen Interneuronen vorkommt. Es gilt als Markerenzym für diese Zellen. Bei den oben erwähnten Mäusen wurde in einem Allel des GAD1-Gens das GAD-

Strukturgenen durch das Strukturgenen für GFP ersetzt (Tamamaki et al., 2003; Yanagawa et al., 2001). Diesen Austausch bezeichnet man molekulargenetisch als Knock-in. Da nun das GFP-Strukturgen unter der Kontrolle des GAD1-Promotors steht, kommt es bei Aktivierung des Promotors zur Synthese von GFP. Da GAD1 in allen GABAergen Interneuronen aktiviert und Gad67 exprimiert wird, werden demzufolge in Gad67-Knock-in-Mäusen alle GABAergen Interneurone mit GFP markiert. Insofern bringt eine solche Mauslinie bei der Untersuchung von einzelnen Subpopulationen GABAerger Interneurone keinen Vorteil. Hinzu kommt, dass durch den Verlust eines GAD1-Strukturallels die Produktion von GABA reduziert wird, was zu Störungen der Erregbarkeit und der Entwicklung des Gehirns führen kann (Obata et al., 2008; Tamamaki et al., 2003).

In anderen Tiermodellen wurde ein Konstrukt, bestehend aus dem Gad67-Promotor und dem GFP-Strukturgen, in das Genom der Mäuse integriert. Bei diesen sogenannten transgenen Mäusen ist zu beobachten, dass nicht mehr alle GABAergen Interneurone, sondern nur noch Subpopulationen markiert werden. Ein Vorteil dieser transgenen Linien liegt darin, dass bei der genetischen Modifikation die beiden natürlichen GAD1- bzw. GAD2-Allele erhalten bleiben. In diesen Tieren findet man keine Reduktion der GABA-Produktion (Tamamaki et al., 2003). Ein Nachteil der transgenen Linien ist, dass der Ort im Genom, an dem das Konstrukt integriert wurde, nicht bekannt ist. Man kennt also die „genomische Umgebung“ des Promotors und damit auch seine Expressionsbedingungen nicht.

Mittlerweile gibt es mehrere transgene Modelle, in denen Subpopulationen GABAerger Interneurone markiert wurden, wie z.B. Mäuse, in denen nur Parvalbumin-exprimierende (Chattopadhyaya et al., 2004), Calretinin-exprimierende (Caputi et al., 2009), oder Somatostatin-exprimierende Interneurone das GFP enthalten (Halabisky et al., 2006; Ma et al., 2006; Olivia et al., 2000). Parvalbumin und Calretinin sind Calcium-bindende Proteine, Somatostatin ist ein Neuropeptid.

Für die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde ein transgenes Tiermodell ausgewählt, in dem die GFP-positiven GABAergen Interneurone zugleich Somatostatin exprimieren. Bisher wurden drei Mauslinien, für die dies zutrifft, beschrieben, nämlich die X90- und X91-Mäuse (Ma et al., 2006) und die so genannten GIN-Mäuse (FVB-Tg[GadGFP]45704Swn/J) (Halabisky et al., 2006, Olivia et al., 2000). „GIN“ steht für „GFP expressing inhibitory neurons“. In allen drei Modellen sind unterschiedliche Subtypen Somatostatin-exprimierender Interneurone markiert. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden am GIN-Mausmodell durchgeführt.

2.2.2 Klassifizierung der Interneurone

Wie schon erwähnt, sind Interneurone überaus heterogen in Form und Funktion. Eine Suche nach Gemeinsamkeiten und eine darauf basierende Einteilung in verschiedene Populationen kann helfen, die Funktion dieser Neurone besser zu verstehen. Die Einteilung der GABAergen Interneurone in verschiedene Klassen erfolgt anhand folgender Kriterien:

1. Morphologie
2. Expression bestimmter Proteine und Neuropeptide
3. Elektrophysiologische Eigenschaften

2.2.2.1 Morphologie

Bei neocorticalen GABAergen Interneuronen unterscheidet man nach dendritischer und axonaler Architektur sieben verschiedene morphologische Typen (Abb. 1, siehe auch **2.2.2.5 Zusammenfassung**: Tab. 1, S. 18):

Die **Korbzellen** repräsentieren ungefähr die Hälfte der GABAergen Interneurone. Meist konvergieren die Axonterminalen mehrerer Korbzellen auf dem Soma einer Pyramidenzelle und bilden eine korbtartige Struktur aus. Sie sind in allen Schichten des Neocortex präsent, außer in Schicht I. Man kann innerhalb der Gruppe der Korbzellen drei weitere Subtypen unterscheiden. Dies sind zum einen die **großen Korbzellen** (Wang et al., 2002; Somogyi, 1989), die sich durch eine multipolare (seltener auch pyramidale oder bipolare) somatodendritische Morphologie auszeichnen. Sie verfügen über Dendriten, an denen keine Dornfortsätze (Spines) zu finden sind und über ein Axon, das sich über mehrere Cortexschichten und corticale Säulen ausbreiten kann. Die Axone weisen kaum Boutons auf und sind, trotz ihrer weitreichenden Ausdehnung, nur schwach verzweigt. Des Weiteren existieren die **kleinen Korbzellen** (Somogyi, 1989; Kisvarday et al., 1985). Diese Neurone haben, je nach Cortexschicht, eher eine multipolare (Schicht IV) oder eine bipolare / büschelartige (Schicht II/III) somatodendritische Morphologie. Die Dendriten dieser Zellen besitzen keine Spines. Die axonale Ausbreitung ist eher begrenzt und reicht selten in andere Schichten oder Säulen des Cortex. Allerdings sind die Axone lokal sehr stark verzweigt und durch viele Varikositäten charakterisiert. Als letzter Vertreter der Korbzellen sind die **Nestkorbzellen** zu nennen (Wang et al., 2002; Lund und Lewis, 1993). Ihre somatodendritische Morphologie erinnert an ein „Nest“. Sie stellen eine Kombination aus

großen (kaum verzweigte Axone mit wenigen Boutons) und kleinen Korbzellen (starke lokale axonale Verzweigung) dar.

Der zweite Haupttypus GABAerger Interneurone sind die **bipolaren Zellen**, die in den Schichten II bis VI des Neocortex zu finden sind (Peters, 1990; Peters und Harriman, 1988). Sie haben ein rundes oder ovales Soma, aus dem meist zwei, manchmal auch mehr primäre Dendriten an gegenüberliegenden Stellen des Zellkörpers entspringen. Die Dendriten können sich vertikal bis in Schicht I oder VI ausbreiten. Das Axon stammt meist aus einem der primären Dendriten und zieht sich ebenfalls durch alle Schichten des Cortex (allerdings in einem eng begrenzten Bereich). Die Axone enden in nur wenigen Boutons.

Als dritten morphologischen Typ gibt es Interneurone, die als „**bitufted**“ bezeichnet werden (Somogyi et al., 1998). Der Name beschreibt die beiden büschelartigen Dendritenbäume, die an gegenüberliegenden Stellen des Somas ihren Ursprung haben. Sie zeichnen sich außerdem durch ein rundes bis ovales Soma aus. Die Axone dieser Zellen reichen in vertikaler Richtung nur bis in benachbarte Schichten, in horizontaler Richtung jedoch über mehrere corticale Säulen.

Eine weitere Gruppe an Interneuronen sind Zellen, deren Soma- und Dendritenstruktur den „bitufted“ Zellen ähnelt. Ihr spezielles Merkmal ist ein büschelartiges, stark verzweigtes Axon, das sich, im Vergleich zu den „bitufted“ Zellen, in einem sehr engen, vertikalen Korridor über alle Schichten ausbreitet. Dieser Korridor entspricht wahrscheinlich einer corticalen Säule. Zudem sind die Terminalen dieser Axone dicht mit Boutons besetzt. (DeFelipe et al., 1990; Somogyi und Cowey, 1981). Diese sog. „**double bouquet cells**“ sind in Schicht II bis VI zu finden.

Der fünfte Interneurontypus sind die **Martinottizellen** (Wang et al., 2004). Diese Zellen sind ebenfalls in Schicht II bis VI vertreten und zeichnen sich vor allem durch die axonale Innervation von Neuronen und Dendriten in Schicht I aus. Sie weisen eine bipolare bis multipolare oder pyramidale somatodendritische Morphologie auf. Die Dendriten dieser Neurone sind lokal verzweigt und bilden Spines aus. Die Anwesenheit von dendritischen Spines ist kennzeichnend für Martinottizellen. Das Axon der Martinottizellen entspringt aus dem Soma oder einem primären Dendriten und zieht in Schicht I, wo es sich über weite Distanzen horizontal verzweigen kann. Die Boutons der Axone sind meist auf kleinen Auswüchsen der postsynaptischen Zelle zu finden und werden deshalb als „**spiny boutons**“ bezeichnet.

Eine besondere axonale Architektur charakterisiert die **Chandelierzellen**, die über alle corticale Schichten (außer Schicht I) verteilt zu finden sind (Fairen und Valverde, 1980;

Somogyi, 1977). Ihre Axone sind überaus stark verzweigt, bleiben aber lokal begrenzt. Sie sind in kurzen vertikalen Reihen ober- und unterhalb des Somas angeordnet („kandelaberartig“) und verfügen über sehr viele Boutons. Die Form des Somas reicht von bipolar bis multipolar.

Die **neurogliaformen Neurone** (Jones, 1984) haben Dendriten, die so verzweigt sind, dass sie sehr lokal ein sphärisches Feld abdecken. Sie sind sehr fein und kurz, mit perlenartigem Erscheinungsbild. Auf den Dendriten finden sich keine Spines. Die ebenfalls sehr kurzen Axone stammen aus dem Soma oder einem Dendriten. Die Bouton-reichen Axonterminalen sind stark ausgeprägt.

Die GABAerigen Interneurone, die in dieser Arbeit untersucht wurden (GIN), gehören wahrscheinlich zur Gruppe der Martinottizellen. Sie kommen hauptsächlich in Schicht II/III des Neocortex vor und zeigen alle morphologischen Merkmale, die es erlauben, sie diesem Interneurontyp zuzuordnen (Fanselow et al., 2008; Xu et al., 2006).

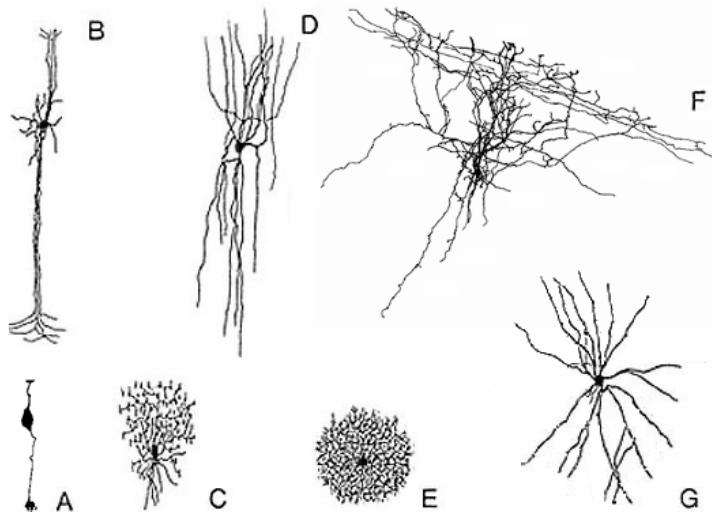


Abb. 1: Morphologie der Interneurone.
 A: bipolare Zelle; B: „double bouquet cell“; C: Chandelierzelle; D: „bitufted cell“; E: neurogliaform Zelle; F: Martinottizelle; G: große Korbzelle (B, C, D, E, G aus: Jones, 2000; A aus: Polyak, 1941)

2.2.2.2 Proteine und Neuropeptide

Ein weiteres Kriterium zur Einteilung von GABAerigen Interneuronen ist die unterschiedliche Expression von Proteinen und Neuropeptiden. Bei den Proteinen handelt es sich

ausschließlich um Calcium-bindende Proteine, die bei der Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration eine große Rolle spielen. Da sie als Calciumpuffer intrazelluläres Calcium binden, können sie zu einer Verringerung der intrazellulären Konzentration dieses Ions beitragen und auf diese Weise gegen die exzitotoxischen Effekte einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration schützen. Außerdem sind sie an verschiedenen Signalkaskaden und Transportprozessen (Calciumtransporter) beteiligt. Calcium ist zudem für die neuronale Erregbarkeit von großer Bedeutung. Demzufolge sind Calcium-bindende Proteine wichtige Modulatoren der Erregbarkeit. Die mit GABAergen Interneuronen assoziierten Calcium-bindenden Proteine sind Parvalbumin (PV), Calretinin (CR) und Calbindin (CB).

Neuropeptide, die möglicherweise als Co-Transmitter aus GABAergen Interneuronen freigesetzt werden, sind: Somatostatin (SST), Cholecystokinin (CCK), Neuropeptid Y (NPY), vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Cortistatin (CST) und Thyrotropin freisetzendes Hormon (TRH). Neuropeptide wirken meist als Neuromodulatoren, d.h. sie verstärken oder attenuieren synaptische Vorgänge, die durch klassische Neurotransmitter (GABA, Glutamat) vermittelt werden. So zeigt sich beispielsweise, dass über den μ -Opioidrezeptor (MOP) und durch TRH im Hippocampus inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSCs) reduziert werden können (Lupica et al., 1992; Stocca und Nistri, 1996). SST hat in Neuronen des Subiculums den gleichen Effekt (Greene und Mason, 1996) und im Neocortex kann NPY zur Potenzierung von IPSC-Amplituden führen (Bacci et al., 2002). Neuropeptide können sich auch auf die intrinsischen Membraneigenschaften der Interneurone auswirken. SST wirkt dabei hyperpolarisierend, indem es Kaliumströme aktiviert (Schweitzer et al., 1998). Des Weiteren wirkt SST inhibitorisch auf N-Typ Calciumkanäle (HVA-Ca²⁺-Kanäle) (Ishibashi und Akaike, 1995) und verstärkt den sogenannten M-Strom (Moore et al., 1988). Cortistatin beeinflusst einen unspezifischen Kationenstrom (I_h), der eine Rolle bei synaptischer Integration und corticalen Rhythmen spielt (Schweitzer et al., 2003; Hu et al., 2002), NPY hemmt spannungsabhängige Calciumströme (Quian et al., 1997).

Diese Calcium-bindenden Proteine und Neuropeptide können in verschiedenen Kombinationen in Interneuronen mit verschiedener Morphologie vorkommen. So ist in Korbzellen fast immer PV exprimiert (Markram et al., 2004; Kawaguchi und Kondo, 2002; Kawaguchi und Kubota 1993). In den großen Korbzellen findet man neben PV noch CB und CR, sowie CCK und NPY, aber auch SST. In kleinen Korbzellen wird außerdem noch VIP exprimiert, während in den Nestkorbzellen nie VIP und nur selten CR nachgewiesen werden kann. Auch in den Chandelierzellen findet sich PV und CB (Markram et al., 2004). Bipolare

Zellen produzieren vor allem CR und VIP, ebenso wie „bitufted cells“ (zusätzlich zu CB, CCK, NPY, VIP, SST) und „double bouquet cells“ (zusätzlich zu CB und CCK). SST-Expression ist typisch für Martinottizellen, aber auch für „bitufted cells“ (Markram et al., 2004).

Insgesamt zeigt sich, dass kaum ein bestimmter Protein- bzw. Peptidmarker auf einen Interneurontyp beschränkt ist (siehe **2.2.2.5 Zusammenfassung**: Tab. 1, S. 18).

Bei den GIN sind als Markerproteine bzw. -peptide CR und SST zu finden. Fast alle GIN exprimieren SST, aber nur ein kleiner Teil CR. Zudem sind areal- und schichtenspezifische Unterschiede bei der Expression dieser Marker in den GIN bekannt (Halabisky et al., 2006; Xu et al., 2006).

2.2.2.3 Aktionspotential-Entladungsmuster

Eines der wichtigsten Kriterien für die Klassifizierung von Interneuronen ist ihr Aktionspotential-Entladungsmuster während anhaltender überschwelliger Erregung. Dieses Muster ist vor allem deshalb von Bedeutung, weil man es während eines elektrophysiologischen Experiments bestimmen kann und so Auskunft über den abgeleiteten Zelltyp erhält. Für die Analyse des Entladungsmusters gibt es unterschiedliche Vorgehensweisen. In den ersten Untersuchungen wurde die Antwort eines Neurons auf einen überschweligen, depolarisierenden Strompuls, der über die Messelektrode in die Zelle injiziert wurde, registriert und Frequenz sowie Entladungsmuster relativ grob beurteilt. Dabei kam man zu folgender Einteilung (siehe **2.2.2.5 Zusammenfassung**: Tab. 1, S. 18):

Die schnell feuernden Interneurone (fast spiking interneurons, FS) zeigten eine hochfrequente Entladung (Frequenz: 40 Hz - 150 Hz) ohne Anzeichen einer Frequenzadaptation oder Akkomodation (Kawaguchi und Kondo, 2002; Kawaguchi, 1993 b; Cowan et al., 1990). Unter Adaptation versteht man eine Abnahme der Frequenz während einer Aktionspotentialsalve. Bei einer Akkomodation kommt es während des Strompulses zu einer Verschiebung der Aktionspotentialschwelle in depolarisierender Richtung. Die Konsequenz ist, dass trotz gleichbleibender Stromamplitude keine Aktionspotentiale mehr ausgelöst werden können. Bei den spät feuernden Interneuronen (late spiking cells, LS) traten die Aktionspotentiale erst nach einer relativ langen Latenz auf (Kawaguchi und Kondo, 2002; Kawaguchi und Kubota, 1997; Kawaguchi und Kubota, 1996). Außerdem wurden die regelmäßig feuernden, nicht-pyramidalen Zellen (regular spiking nonpyramidal cells, RSNP) (Markram et al., 2004; Kawaguchi und Kondo, 2002; Kawaguchi und Kubota 1998;

Kawaguchi und Kubota 1997; Kawaguchi und Kubota 1996) und die „burst spiking nonpyramidal cells“ (BSNP) identifiziert (Markram et al., 2004; Kawaguchi und Kondo, 2002; Kawaguchi und Kubota 1997; Kawaguchi und Kubota, 1993; Kawaguchi, 1993a).

RSNP-Neurone generieren regelmäßige Aktionspotentialfolgen mit niedrigen Frequenzen, die einer Adaptation unterliegen. BSNP-Neurone feuern kurzdauernde Aktionspotentialfolgen mit hoher Frequenz (Bursts), die sofort nach dem Beginn des Strompulses auftreten. Ursache für diese Bursts ist der sogenannte niederschwellige Calciumstrom (T-Strom) (Huguenard, 1996). Dieser wird durch Hyperpolarisation deaktiviert und durch nachfolgende Depolarisation aktiviert. Als T(ransient)-Strom wird er deshalb bezeichnet, weil er kurze Zeit nach Beginn (ca. 50 ms) spontan inaktiviert. Der T-Strom produziert eine kurzdauernde Depolarisation, die „low threshold spike“ genannt wird (Neurone, die diesen Strom exprimieren, klassifiziert man deshalb auch als „low threshold spiking cell“ oder LTS-Zellen). Erreicht diese Depolarisation die Schwelle, kommt es zur hochfrequenten Entladung von Aktionspotentialen. Nach einer solchen Salve entluden die BSNP-Neurone entweder nicht mehr oder regelmäßig, vergleichbar den RSNP-Zellen.

Bei einer weiteren Untergruppe an Interneuronen spricht man von den unregelmäßig feuern den Zellen (irregular spiking cells, IS). Nach einer anfänglichen hochfrequenten Entladung (kein Burst) treten Entladungen mit unregelmäßigen Intervallen zwischen den Aktionspotentialen auf. Diese Gruppe wurde noch weiter in IS1- und IS2-Neurone unterteilt (Markram et al., 2004; Porter et al., 1998).

Ein anderes Einteilungsschema unterscheidet das Entladungsmuster am Ende eines depolarisierenden Strompulses von dem, das unmittelbar nach Beginn der Strominjektion zu beobachten ist. (Gupta et al., 2000). Grundlage für dieses Vorgehen ist die Tatsache, dass in vielen Neuronen durch eine plötzlich einsetzende Depolarisation zeit- und spannungsabhängige Membranleitfähigkeiten aktiviert werden, die sich auf die Aktionspotentialfrequenz auswirken können. Ist der Strompuls ausreichend lange andauernd, dann inaktivieren diese Leitfähigkeiten und es stellt sich ein neues Gleichgewicht (Steady State) ein. Es wird also das initiale Entladungsmuster von dem im Gleichgewicht unterschieden. Unter Anwendung dieses Klassifikationsschemas wurden die Interneurone in akkomodierende (accomodating cells, ACs), nicht-akkomodierende (non-accomodating cells, NACs), „stotternde“ (stuttering cells, STUTs), unregelmäßig feuernde (irregular spiking cells, ISs) und Burst-artig feuernde Interneurone (bursting cells, BSTs) eingeteilt. Betrachtet man zusätzlich das initiale Entladungsmuster innerhalb der genannten Gruppen, dann ist eine weitere Unterteilung möglich: So gibt es kontinuierlich feuernde Zellen, die ein relativ

regelmäßiges Entladungsmuster im initialen Bereich aufweisen (classic, c), verzögert feuern Zellen, die erst nach einer gewissen Latenz anfangen zu entladen (delayed, d) und Zellen, die initial eine kurzdauernde hochfrequente Aktionspotentialsalve ausbilden (burst, b). Dieses initiale Muster findet man bei AC-, NAC-, STUT- und IS-Neuronen, wobei bei den IS-Neuronen kein sogenannter d-Typ existiert. Bei den BST-Zellen erfolgt die Klassifizierung nach dem initialen Entladungsmuster in etwas anderer Weise. Es werden Zellen, die einen anfänglichen Burst mit folgender regelmäßiger Entladung zeigen (initial, i), von solchen unterschieden, die entweder mehrere Bursts feuern (repetitive, r) oder die nur einen initialen Burst zeigen und danach keine Aktionspotentiale mehr generieren (transient, t).

Die Einteilung der Interneurone in elektrophysiologische Klassen kann also auf mehrere Arten vorgenommen werden. Jedoch zeigt sich sehr deutlich, dass in diesen Gruppen fast immer Neurontypen mit unterschiedlicher Morphologie zu finden sind (siehe **2.2.2.5 Zusammenfassung**: Tab. 1, S. 18). Wie oben erwähnt, können Calcium-bindende Proteine und Neuropeptide auch selten einer bestimmten morphologischen oder elektrophysiologischen Klasse zugeordnet werden. Die einzige Ausnahme bildet hierbei PV, das vornehmlich in FS-Neuronen exprimiert wird (Toledo-Rodriguez et al., 2004). Wesentlich schwächer ist die Korrelation von CB mit BST-Neuronen und CR mit AC- oder IS-Zellen (Toledo-Rodriguez et al., 2004).

Die GIN gehören elektrophysiologisch in die Klasse der RSNP-Zellen. Ihr Entladungsmuster ist gekennzeichnet durch mittlere Frequenzen und Adaptation. Bis jetzt wurden mehrere Subklassen innerhalb der GIN beschrieben, die sich in gewissen Parametern (z.B. Eingangswiderstand, Nachhyperpolarisation) unterscheiden. Trotzdem gehören diese Zellen zu den regelmäßig feuern den Interneuronen und bis jetzt wurden keine GIN gefunden, die als FS-, LTS- oder IS-Neurone beschrieben werden konnten (Fanselow et al. 2008; Halabisky et al., 2006).

2.2.2.4 Weitere Kriterien

Ein weiteres Merkmal, das zur Klassifizierung von Interneuronen herangezogen wird, ist das räumliche Muster der axonalen Innervation auf die nachgeschaltete Zelle. Interneurone können verschiedene Teile (Axon, Dendriten, Soma) des postsynaptischen Neurons ansteuern und dadurch unterschiedliche funktionelle Effekte hervorrufen (Somogyi et al., 1998; DeFelipe, 1997) (siehe **2.2.2.5 Zusammenfassung**: Tab. 1, S.18).

Das **Axon** eines Neurons ist ein idealer Ansatzpunkt, um die Ausgangssignale einer Zelle zu verändern. Dieses sogenannte Aktionspotential-Editing wird über eine Innervation des Axons und des Axonhügels vorgenommen. Interneurone haben in diesem Fall die Möglichkeit, das Ausgangssignal der innervierten Zelle zu beeinflussen (Markram et al., 2004).

Eine **perisomatische Innervation** kann die Synchronizität der Eingangssignale und die Entladungsrate der innervierten Zelle kontrollieren (Pouille et al., 2001; Miles et al., 1996; Cobb et al., 1995).

Die **proximalen Denrditen** werden durch solche Interneurone innerviert, die Einfluss auf Eingangssignale aus den distalen Dendriten nehmen sollen (Segev und London, 1999; Segev und Burke, 1998). Sie können darüber hinaus auf die synaptische Plastizität des Neurons einwirken, indem sie mit retrograden Aktionspotentialen interagieren und diese gegebenenfalls auslöschen (Magee und Johnston, 1997). Außerdem können die Interneurone in diesem Kompartiment die Generation und Ausbreitung von denritischen Calcium-Aktionspotentialen modifizieren und somit indirekt die dendritische Kommunikation modulieren (Larkum et al., 1999).

Durch Innervation der **distalen Dendriten** können Interneurone lokal die Integration von erregenden postsynaptischen Potentialen (EPSP) kontrollieren und so als vorgeschaltete Filter agieren (Markram et al., 2004).

Korbzellen sind Interneurone, die v.a. das Soma und die proximalen Dendriten innervieren (Wang et al., 2002; Jones, 1984). Interneurone, welche hauptsächlich die distalen Dendriten ihrer Zielzellen innervieren, sind die bipolaren Zellen (Peters, 1990; Peters und Harriman, 1988), die „bitufted cells“ (Gupta et al., 2000), die neurogliaformen Zellen (Somiyogi, 1989) und die „double bouquet cells“ (DeFelipe et al., 1990). Auch die Martinotti-Zellen innervieren das dendritische Kompartiment, allerdings ausschließlich das von Pyramidenzellen. Chandelierzellen innervieren meist die Axone ihrer postsynaptischen Neurone (Fairen und Valverde, 1980; Somiyogi, 1977).

Ein weiteres Kriterium zur Einteilung von Interneuronen ist ihre Ausstattung mit spannungsabhängigen Membranleitfähigkeiten und den dazugehörigen Kanalproteinen. Solche Leitfähigkeiten wirken sich oft auf das Entladungsmuster der Neurone aus, wobei verschiedene Typen an Kaliumkanälen eine große Rolle spielen. So kommen bei FS-Neuronen oft Kaliumkanäle vom Subtyp Kv3.1 und Kv3.2 vor (Toledo-Rodriguez et al., 2004; Ruby und McBain, 2001; Chow et al., 1999; Erisir et al., 1999; Martina et al., 1998). Die Kinetik dieser Kanäle ist verantwortlich für die schnellen Nachhyperpolarisationen und

somit für die hohe Entladungsfrequenz. AC-Zellen exprimieren oft Kv3.4-Kanäle (Toledo-Rodriguez et al., 2004; Vergara et al., 1998), während Kv3.3- und Kv3.4-Kanäle hauptsächlich in BST-Neuronen zu finden sind (Toledo-Rodriguez et al., 2004).

Das Expressionsmuster von Neurotransmitterrezeptoren ist ebenfalls ein Merkmal, nach dem man Interneurone unterscheiden kann. Viele Interneurone verfügen über Rezeptoren für Neurotransmitter wie Acetylcholin, Dopamin, Noradrenalin und Serotonin (Arcari et al., 2009; Sun et al., 2009; Towers und Hestrin, 2008; Bacci et al., 2005; Gonzales-Islas und Hablitz, 2001). Auch Neuropeptide können modulatorisch auf Interneurone einwirken (Baraban und Tallent, 2004).

Verschiedene Interneurone der Großhirnrinde erhalten cholinerge und serotonerge Zuströme aus dem basalen Vorderhirn, wobei man synaptische Eingänge (für schnelle Transmission [Ferezou et al., 2002; Roerig et al., 1997]) und extrasynaptische Eingänge (für Modulation [Umbriaco et al., 1994; Seguela et al., 1989; DeFelipe und Jones, 1988]) trennen kann. Zum Beispiel werden in Schicht V des Neocortex FS-Neurone über muskarinische Rezeptoren hyperpolarisiert und LTS-Neurone über nikotinische Rezeptoren depolarisiert (Xiang et al., 1998). Da die FS-Neurone in dieser Schicht intralaminar und interkolumnar projizieren, führt eine Hyperpolarisation dieser Neurone durch Acetylcholin (ACh) zu einer transkolumnaren Disinhibition. Die LTS-Zellen zeigen ein wesentlich geringeres Verzweigungsmuster und ihre Kontakte beschränken sich meist auf eine Schicht oder eine corticale Säule. So führt eine Depolarisation dieser Zellen über ACh zu einer verringerten intrakolumnaren Exzitation (Bacci et al., 2005; Xiang et al., 1998).

2.2.2.5 Zusammenfassung

GABAerge Interneurone können aufgrund verschiedener Kriterien zu bestimmten Gruppen zusammengefasst werden (Tab. 1). Hauptkriterien sind Morphologie und das Aktionspotential-Entladungsmuster. Alle anderen Merkmale werden zur Subklassifizierung verwendet. Allerdings sollten die einzelnen elektrophysiologischen Gruppen eher als eine Art Kontinuum aus verschiedenen Neurontypen betrachtet werden, die zwar eine Haupteigenschaft teilen, aber in Form und Funktion durchaus verschieden sein können.

Morphologie		Zielkompartiment	Markerproteine	Klassifizierung I	Klassifizierung II	
Korbzellen	große	Soma proximale Dendriten	CB, PV NPY, CCK, (SST)	b-NAC, c-NAC, d-NAC b-AC, c-AC, d-AC c-STUT, d-STUT b-IS, c-IS	FS LS BSNP RSNP	
		Soma proximale Dendriten	CB, PV VIP, CCK	c-NAC, d-NAC b-AC, c-AC c-IS	FS LS BSNP RSNP	
		Soma proximale Dendriten	CB, PV NPY, SST, CCK	b-NAC, c-NAC, d-NAC b-AC, c-AC, d-AC b-STUT, c-STUT, d-STUT	FS LS BSNP RSNP	
		Soma proximale Dendriten	CB, PV NPY, SST, CCK	b-NAC, c-NAC, d-NAC b-AC, c-AC, d-AC b-STUT, c-STUT, d-STUT	FS LS BSNP RSNP	
	Chandelierzellen	Axon	CB, PV	c-NAC, d-NAC b-AC, c-AC, d-AC b-STUT r-BST	FS LS BSNP RSNP	
		distale Dendriten	CB, CR NPY, SST, CCK	c-NAC b-AC, c-AC b-STUT, c-STUT c-IS	FS BSNP RSNP	
		distale Dendriten	CR VIP, CCK	b-NAC b-AC, c-AC c-STUT b-IS, c-IS	FS BSNP RSNP IS1/IS2	
		distale Dendriten	?	d-NAC	FS LS	
	Martinottizellen	distale Dendriten	CB, CR NPY, SST, CCK	b-NAC, c-NAC, d-NAC b-AC, c-AC b-STUT b-IS, c-IS	FS LS BSNP RSNP IS1/IS2	
		distale Dendriten	CB, CR VIP, CCK	b-NAC b-AC, c-AC b-IS, c-IS	FS BSNP RSNP IS1/IS2	
		distale Dendriten	CB, CR VIP, CCK	b-NAC b-AC, c-AC b-IS, c-IS	FS BSNP RSNP IS1/IS2	
		distale Dendriten	CB, CR VIP, CCK	b-NAC b-AC, c-AC b-IS, c-IS	FS BSNP RSNP IS1/IS2	
bipolare Zellen		distale Dendriten	CR VIP, CCK	b-NAC b-AC, c-AC c-STUT b-IS, c-IS	FS BSNP RSNP IS1/IS2	
neurogliaforme Zellen		distale Dendriten	?	d-NAC	FS LS	
„bitufted cells“		distale Dendriten	CB, CR NPY, SST, CCK	b-NAC, c-NAC, d-NAC b-AC, c-AC b-STUT b-IS, c-IS	FS LS BSNP RSNP IS1/IS2	
“double bouquet cells“		distale Dendriten	CB, CR VIP, CCK	b-NAC b-AC, c-AC b-IS, c-IS	FS BSNP RSNP IS1/IS2	

Tab. 1: Klassifizierung von Interneuronen. **Calcium-bindende Proteine:** CB (Calbindin); CR (Calretinin); PV (Parvalbumin); **Neuropeptide:** CCK (Cholecystokinin); NPY (NeuropeptidY); SST (Somatostatin); VIP (vasoaktives intestinales Peptid); **Klassifizierung I:** BSNP (burst spiking nonpyramidal cells [auch LTS: low threshold spiking cells]); RSNP (regular spiking nonpyramidal cells); FS (fast spiking cells); IS (irregular spiking cells); LS (late spiking cells); **Klassifizierung II:** AC (accomodating cells); NAC (non-accomodating cells); STUT (stuttering cells); BST (bursting cells); IS (irregular spiking cells). Weiter Unterteilung der Gruppen: c (classic); b (burst); d (delay)] (erstellt nach: Markram et al., 2004).

Die Diversität der GABAergen Interneurone macht eine zuverlässige und eindeutige Klassifizierung schwer. Zudem wird das Studium dieser Neurone mit jedem zusätzlichen Unterschied schwieriger. Transgene Tiere, in denen eine bestimmte Subpopulation an Interneuronen markiert und auf diese Weise identifizierbar ist, stellen deshalb ein gutes Modell dar, um die Eigenschaften dieser Subpopulation zu analysieren. Aus diesem Grund wurden für die vorliegende Arbeit die GIN ausgewählt, um die postnatale Entwicklung dieser Subpopulation GABAerger Interneurone zu beschreiben. Von ausgereiften GIN ist bereits bekannt, dass sie morphologisch zu den Martinotti-Zellen gehören. Sie exprimieren SST und CR und zeigen ein Entladungsmuster, welches relativ regelmäßig ist und sie als RSNP-Neurone kennzeichnet. Die GIN kommen in fast allen Schichten des Neocortex vor, gehäuft jedoch in Schicht II/III. Wie sich die Eigenschaften dieser Zellen im Verlauf ihrer postnatalen Entwicklung ausprägen und verändern, ist bisher nicht untersucht worden.

2.3 Die Entstehung der Vielfalt an Interneuronen

Die ausgeprägte Vielfalt an GABAergen Interneuronen setzt einen sehr komplexen Mechanismus voraus, der es ermöglicht, die verschiedenen Neuronenarten hervorzubringen. Hinzu kommt, dass ein Interneuron nach seiner „Geburt“ den Weg an seinen Platz finden und die „richtigen“ Verbindungen eingehen muss. Multiple genetische Programme, inkl. Transkriptionsfaktoren und Signalkaskaden, und elektrophysiologische Interaktionen sind notwendig, um das adulte System an Interneuronen entstehen zu lassen.

2.3.1 Die Entstehung von GABAergen Interneuronen

Interneurone und Pyramidenzellen des Neocortex werden in verschiedenen Regionen des reifenden Gehirns generiert. Pyramidenzellen werden im Pallium, genauer im dorsalen Telencephalon gebildet (Nakajima, 2007; Caviness et al., 2003; Gorski et al., 2002; Chan et al., 2001), während die Interneurone im Subpallium oder ventralen Telencephalon entstehen (Butt et al., 2007; Nakajima, 2007; Metin et al., 2006; Marin und Rubenstein, 2003; Wonders und Anderson, 2006; Marin und Rubenstein, 2001; Corbin et al., 2001; Anderson et al., 1997).

Pallium und Subpallium sind zwei Bereiche des jungen Telencephalons, aus denen sich unter anderem der spätere Neocortex und der Hippocampus (Pallium) sowie Teile der Basalganglien (Subpallium) bilden (Heng et al., 2007; Marin und Rubenstein, 2003, Rubenstein et al., 1998). Im Subpallium findet sich die ganglionäre Eminenz, in der fast alle

corticalen Interneurone produziert (Butt et al., 2007; Metin et al., 2006; Marin und Rubenstein, 2001) und durch deren determinierendes Milieu viele spätere Eigenschaften der Interneurone festgelegt werden (Butt et al., 2007; Fogarty et al., 2007; Nakajima, 2007; Metin et al., 2006; Wonders und Anderson, 2006). Allerdings spielt nicht nur dieses Milieu, sondern auch der Zeitpunkt der Geburt eine wichtige Rolle bei der Determinierung corticaler Interneurone (Andrews et al., 2007; Butt et al., 2007; Nakajima, 2007; Wonders und Anderson, 2006).

Die ganglionäre Eminenz (GE) wird in verschiedene Gebiete unterteilt. Dies sind die mediale GE (MGE), die dorsale und ventrale laterale GE (dLGE / vLGE), sowie die dorsale und ventrale caudale GE (dCGE / vCGE) (Butt et al., 2007; Nakajima, 2007; Wonders und Anderson, 2006). In den Ursprungszellen, die in diesen verschiedenen Regionen liegen, findet man unterschiedliche Expressionsmuster an Transkriptionsfaktoren (Abb. 2). In allen Bereichen der GE exprimieren die Zellen *Dlx1/2/5* (distal-less Homeobox 1/2/5) und *Mash1* (Mammalian achaete scute Homolog 1). Durch Expression dieser Transkriptionsfaktoren wird das GABAerge Schicksal der Neurone, die in der Ventrikulärzone der GE gebildet werden, festgelegt (Trinh et al., 2006; Parras et al., 2002; Schuurmans und Guillemot, 2002; Stuhmer et al., 2002; Marin und Rubenstein, 2001; Fode et al., 2000; Casarosa et al., 1999; Horton et al., 1999). In der MGE werden unter anderem *Nkx2.1* (NK2 Homeobox 1) und *Lhx6/7* (LIM Homeobox 6/7) exprimiert. Dabei finden sich *Lhx6/7*, welche aus der LIM-Homeoboxfamilie stammen, hauptsächlich in der Mantelzone der MGE (Liodis et al., 2007; Wonders und Anderson, 2006; Gong et al., 2003; Lavdas et al., 1999 Grigorou et al., 1998), während *Nkx2.1* fast überall in der MGE vorhanden ist (Xu et al., 2004; Sussel et al., 1999). Durch *Nkx2.1* werden die dort produzierten Interneurone so determiniert, dass sie später entweder PV oder SST exprimieren (Butt et al., 2005; Xu et al., 2004; Valcanis und Tan, 2003; Wichterle et al., 2001; Sussel et al., 1999). Diese Neurone stellen ca. 60% der späteren corticalen Interneuronpopulation dar (Gonchar und Burkhalter, 1997; Kawaguchi und Kubota, 1997). Wie das endgültige Schicksal der in der MGE generierten Neurone auf PV- oder SST-Expression festgelegt wird, hängt wahrscheinlich mit einer Trennung dieser Zelllinien entlang der dorsoventralen Achse der MGE zusammen (analog zum Rückenmark [Jessel, 2000]). In *Nkx2.1*-Mutanten fehlt ein Großteil des MGE-Gewebes und im Cortex findet sich eine reduzierte Anzahl an Interneuronen. Zudem werden *Lhx6/7* nicht exprimiert (Sussel et al., 1999). *Lhx6/7* sind wichtige Transkriptionsfaktoren, welche für die Migration und Differenzierung von Interneuronen notwendig sind. So ist *Lhx7* für die Spezifikation cholinriger Neurone zuständig, zu denen auch die cholinergen Interneurone des Striatums

gehören (Fragkouli et al., 2005; Zhao et al., 2003). Lhx6 findet sich in Neuronen, welche aus der MGE in den Cortex migrieren und später als PV- und SST-exprimierende Interneurone zu identifizieren sind (Gong et al., 2003; Lavdas et al., 1999).

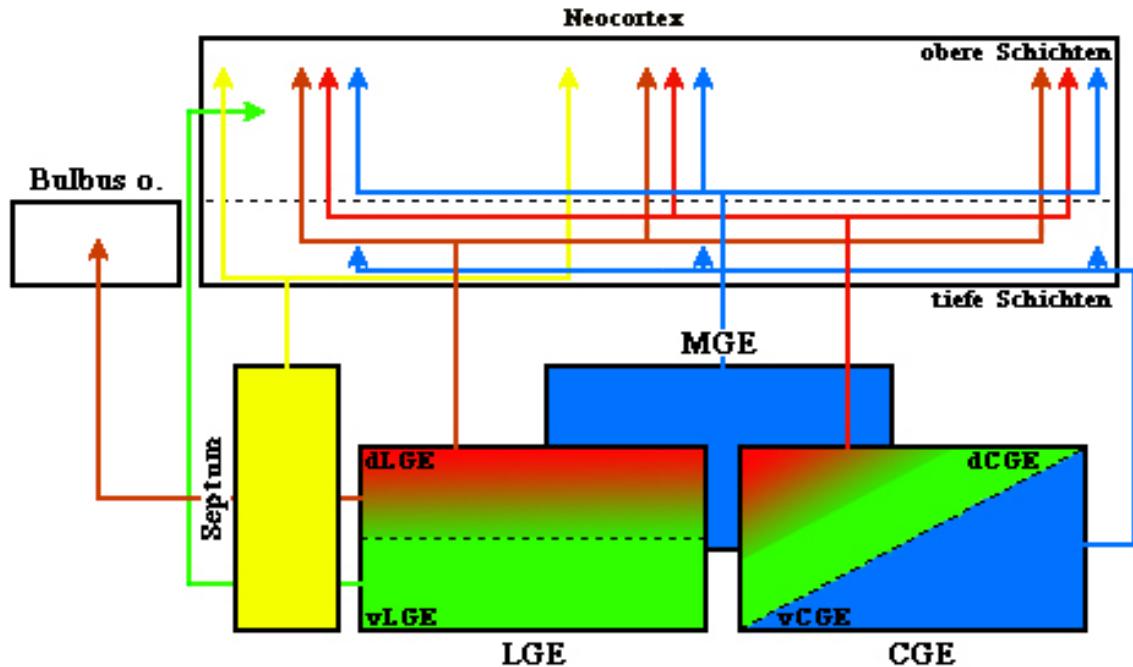


Abb. 2: Die ganglionäre Eminenz: Transkriptionsfaktoren und Interneurone. Expressionsgebiete bestimmter Faktoren in der GE und die Ursprünge verschiedener Interneurontypen (basierend auf ihrer Neuropeptidexpression). Die GE teilt sich in MGE, CGE und LGE auf; die CGE und LGE wiederum in einen dorsalen und ventralen Teil. In diesen verschiedenen Gebieten findet man unterschiedliche Expressionsmuster an Transkriptionsfaktoren. So wird in der MGE und der vCGE **Nkx2.1** (blau) exprimiert, in der LGE dagegen ventral vor allem **Gsh2** (grün) und dorsal vor allem **Er81** (rot). In der dCGE wiederum finden sich sowohl **Er81** (rot) als auch **Gsh2** (grün). Im Septum, welches ebenfalls einige GABAerge Interneurone produziert, wird **Vax1** (gelb) exprimiert. Die Pfeile stellen die Typen und das Ziel der in den jeweiligen Gebieten produzierten Interneurone dar. So entstammen aus der MGE ein Großteil der Interneurone im Neocortex, die PV oder SST exprimieren (blaue Pfeile MGE). Auch aus der vCGE stammt offensichtlich ein Teil dieser Neurone (blaue Pfeile vCGE). Der Hauptteil der CR exprimierenden Interneurone kommt aus der dCGE (rote Pfeile dCGE), jedoch sind auch aus der dLGE einige CR-positive Interneurone zu verzeichnen (braune Pfeile dLGE). Der Hauptteil der in der dLGE produzierten Interneurone (meist enthalten diese CR) ist jedoch für den olfaktorischen Bulbus bestimmt (brauner Pfeil dLGE). Aus der vLGE (grüner Pfeil) und dem Septum (gelbe Pfeile) entstammen ebenfalls einige corticale Interneurone, die bis dato aber nicht genau spezifiziert sind (erstellt nach: Nakajima, 2007; Wonders und Anderson, 2006).

In der dLGE ist vor allem die Expression von Er81 (anders für: ets variant 1 [ETV 1]) und Gsh2 (GS Homeobox 2) als determinierende Faktoren von besonderer Bedeutung. In der vLGE wird Gsh2 exprimiert (Xu et al., 2004; Corbin et al., 2003; Stenman et al., 2003; Corbin et al., 2001; Yun et al., 2001; Toresson et al., 2000). Zusätzlich ist Pax6 (Paired Box 6) in der LGE vorhanden, das zusammen mit Nkx2.1 (in der MGE) die Grenze zwischen LGE

und MGE definiert und so die Einwanderung von Neuronen aus der MGE in die LGE unmöglich macht (Stoykova et al., 2000; Sussel et al., 1999). Aus der dLGE stammen Interneurone, welche später CR exprimieren und hauptsächlich für den olfaktorischen Bulbus, teilweise aber auch für den lateralen Neocortex bestimmt sind (Wonders und Anderson, 2006; Xu et al., 2004; Stenman et al., 2003; Anderson et al., 2001). Aus der vLGE entstammt ebenfalls eine Gruppe von Interneuronen, welche sich später im Cortex finden wird, allerdings ist ihre genaue Spezifikation bis jetzt unklar (Xu et al., 2004). Außerdem produziert die LGE striatale Projektionsneurone (Stenman et al., 2003) und nach E14 / E15 zusätzlich noch Oligodendrocyten (Kessarias et al., 2006).

Die CGE ist ein Zusammenschluss aus den caudalen Teilen der MGE und LGE. Deshalb finden sich dort dieselben Expressionsmuster an Transkriptionsfaktoren wie in der MGE und der LGE. In der vCGE werden Nkx2.1 und Lhx6/7 exprimiert, im ventralen Anteil der dCGE hauptsächlich Gsh2 und im dorsalen Teil überwiegend Er81 (Metin et al., 2006; Wonders und Anderson, 2006; Xu et al., 2004; Corbin et al., 2003; Stenman et al., 2003). Trotz dieser im Vergleich zu den frontalen Teilen der GE identischen Expressionsmuster trägt die CGE in anderer Weise zu den Interneuronen des Cortex bei. Aus der vCGE stammen vor allem Interneurone, die in die tiefen Schichten des Cortex migrieren und PV oder SST exprimieren (Nery et al., 2002). Die CR-positiven Interneurone des Neocortex stammen zum großen Teil aus der dCGE, und zwar aus dem Anteil, in dem Er81, aber kein Nkx2.1 vorhanden ist (Butt et al., 2005; Lopez-Bendito et al., 2004; Xu et al., 2004).

Aus der septalen Region nahe der GE stammt eine Gruppe von Interneuronen, die sich später im rostralen Neocortex finden, bis jetzt aber nicht näher spezifiziert werden konnten (Taglialatela et al., 2004; Anderson et al., 1999). In dieser Region kommt der Transkriptionsfaktor Vax1 (Ventral anterior Homeobox 1) vor. In einer Vax1-Mangelmutante fehlt ein Teil der corticalen Interneurone. Außerdem ist in dieser Mutante die Größe der MGE reduziert und das Septum nicht vorhanden (Taglialatela et al., 2004).

Neben den bisher genannten Arealen entstammen wahrscheinlich noch einige corticale Interneurone aus dem sog. anterioren entopeduncularen Areal, in dem, wie in der MGE, der Homeoboxtranskriptionsfaktor Nkx2.1 exprimiert wird (Sussel et al., 1999; Meyer et al., 1998).

Es zeigt sich also, dass der Ort ihrer Entstehung in der GE für das spätere Schicksal der Interneurone von ausschlaggebender Bedeutung ist. Aus den ventralen Teilen der GE stammen die PV- und SST-exprimierenden Interneurone des Neocortex. Ihre Zugehörigkeit zu einer bestimmten Schicht im Neocortex wird dadurch bestimmt, ob sie im frontalen oder

caudalen Anteil geboren wurden. Die dorsale Region generiert CR-exprimierende Interneurone, und zwar für den olfaktorischen Bulbus und den Neocortex. Die molekularen Eigenschaften der Vorläuferzellen und der Geburtsort innerhalb der GE sind also wichtige Faktoren, die in großen Teilen das spätere Schicksal der Interneurone bestimmen.

Das räumliche Expressionsmuster an Transkriptionsfaktoren in der GE hängt seinerseits von der räumlich-zeitlichen Expression von molekularen Determinanten ab, die vor der Interneuronengeneration stattfindet. So sind zum Beispiel Faktoren wie FGF8/SF (fibroblast growth factor 8/scatter factor) und SHH (sonic hedgehog) (vielleicht auch SIX3 [SIX homeobox 3]) und die Repression von BMP (bone morphogenetic protein) wichtig für das initiale Nkx2.1-Muster in der MGE (Lupo et al., 2006; Storm et al., 2006; Kobayashi et al., 2002; Anderson et al., 2001). SHH wird später weiter benötigt, um die Expression von Nkx2.1 aufrecht zu erhalten (Xu et al., 2005). In der dCGE ist Gsh2 ein wichtiger Transkriptionsfaktor für den Aufbau der molekularen Expressionsmuster der LGE (Corbin et al., 2003).

Viele der genannten Transkriptionsfaktoren sind auch noch in migrierenden oder adulten Interneuronen nachweisbar. So findet sich postnatal Lhx6 in PV-Interneuronen, Dlx1 in CR-Interneuronen (und NPY-Interneuronen) und entweder Lhx6 oder Dlx1 oder beide Faktoren in SST-Interneuronen (Cobos et al., 2005). Die postnatale Expression dieser Faktoren scheint wichtig zu sein für die weitere Differenzierung der Interneurone. In einer Dlx1-Mangelmutante zeigen sich im Neocortex ab der vierten postnatalen Woche Verluste an SST-, CR- und NPY-Interneuronen (Cobos et al., 2005).

Nicht nur die molekulare Umgebung ist wichtig für das Schicksal von Interneuronen, sondern auch der Zeitpunkt ihrer Geburt. Aufgrund der „inside-first-outside-last“-Entwicklung des Neocortex (d.h. zuerst werden die infra- danach die supragranulären Schichten gebildet) werden Interneurone der tiefen Schichten oft früher geboren als solche, die sich in oberen Schichten ansiedeln. Außerdem ergeben sich zeitliche Unterschiede bei der Generation von Interneuronen je nach Geburtsort. So werden die CR-/VIP-positiven Interneurone der CGE später geboren als SST-Interneurone und zeigen auch keine Beziehung des Geburtszeitpunktes mit der späteren Positionierung in den Cortexschichten, wie es bei den SST-Interneuronen der MGE der Fall ist (Miyoshi et al., 2007; Rymar und Sadikot, 2007; Cavanagh und Parnavelas, 1989; Cavanagh und Parnavelas, 1988). Außerdem scheint auch der spätere physiologische Typus einige Abhängigkeiten vom Geburtsort und -zeitraum aufzuweisen. So werden PV-exprimierende FS-Interneurone in der MGE in einem Zeitraum von E9 bis E15 geboren. SST-positive regulär feuern Interneurone werden in der MGE von

E10 bis E13 generiert, aber SST-positive Bursterzellen schon ab E9 bis E11. Adaptierende Interneurone mit CR stammen aus der CGE und werden von E12 bis E15 generiert (Butt et al., 2007; Miyoshi et al., 2007). Somit sind also nicht nur molekulare Umgebung und Geburtsort wichtig für das spätere Schicksal der corticalen Interneurone, sondern auch der Zeitpunkt der Geburt.

Die unterschiedlichen Subtypen an neocorticalen Interneuronen werden also durch ein komplexes räumlich-zeitliches Expressionsmuster an Transkriptionsfaktoren v.a. in der GE produziert. Für die Ausbildung der corticalen Netzwerke sind mit Sicherheit aber auch extrinsische Signale notwendig, um die endgültige Form, Funktion und Position der GABAergen Interneurone im Neocortex festzulegen.

2.3.2 Migration der Interneurone

Die Interneurone müssen aus der GE in den Neocortex einwandern, dort ihre Position finden und sich in das entstehende Netzwerk einbinden. Dies setzt weitere komplizierte Vorgänge voraus. Die Zellen müssen ihren Weg finden, der sie aus der GE und um die Striatumanlage herum in den Neocortex führt. Dort müssen sie an bestimmte Stellen gelangen, um eine funktionelle Integration in den Cortex möglich zu machen. Die Migration der Interneurone ist mindestens ebenso komplex wie ihre Entstehung. Sie ist zudem mit der Entstehung der Pyramidenzellen des Neocortex verbunden.

Sobald die neugeborenen Interneurone oder ihre Vorläuferzellen die Mitose in den Proliferationsgebieten der GE verlassen, starten sie ihre Migration in den Neocortex (Nakajima, 2007; Metin et al., 2006; Kriegstein und Noctor, 2004; Marin und Rubenstein, 2003; Nadarajah und Parnavelas, 2002; Marin und Rubenstein, 2001). Diese sog. tangentielle Migration führt die Neurone um das Striatum herum in den Neocortex. Im Gegensatz dazu migrieren Pyramidenzellen, welche von radialen Gliazellen in der Ventrikulärzone (VZ) des Palliums abstammen (Kriegstein und Götz, 2003; Malatesta et al., 2003), hauptsächlich entlang der Fortsätze eben dieser radialen Gliazellen in den entstehenden Neocortex (gliophile Migration) (Kriegstein, 2005; Kriegstein und Noctor, 2004; Nadarajah und Parnavelas, 2002).

Die tangentielle Migration der Interneurone aus der GE findet in mehreren, zeitlich abgesetzten Kohorten statt; bei der ersten von ihnen beginnt die Migration um E12 in der MGE (Mausmodell, Abb. 3) (Andrews et al., 2007; Nakajima, 2007; Metin et al., 2006; Anderson et al., 2001). Zu diesem Zeitpunkt wurde im Pallium bereits die sog. „Preplate“ (PP) angelegt (Allendoerfer und Shatz, 1994; Marin-Padilla, 1971). In diese „Preplate“ wandern die Interneurone der ersten Kohorte ein. Manche von ihnen werden sog. Cajal-

Retzius-Zellen (Nakajima, 2007; Marin und Rubenstein, 2001), die von großer Bedeutung für die Ausbildung der Schichtung des Neocortex sind, da sie den Pyramidenzellen, unter anderem durch die Sekretion von Reelin, dabei helfen, die „richtige“ Schicht zu finden (Tisir und Goffinet, 2003). Mit der ersten Kohorte an Interneuronen aus der GE wandert noch ein Strom an potentiellen Interneuronen aus dem anterioren entopeduncularen Areal ein (Marin und Rubenstein, 2001).

Ab E13 bis E15 migriert eine weitere Kohorte an Zellen aus der MGE in den sich entwickelnden Neocortex (Andrews et al., 2007; Nakajima, 2007; Metin et al., 2006) (Abb. 3). Bis zu diesem Zeitpunkt hat sich im dorsalen Telencephalon bereits die corticale Platte (CP) ausgebildet. Die Corticalplatte spaltet die „Preplate“ in eine Marginalzone (MZ) (aus der später die Lamina 1 entsteht) und eine sogenannte Subplatte (SP) (Marin und Rubenstein, 2003; Angevine und Sidman, 1971). Die vorher erwähnten Cajal-Retzius-Zellen aus der ersten Kohorte befinden sich nun in der Marginalzone. Die spätere Kohorte aus der GE besteht aus Interneuronen, die aus der MGE kommen und die später PV bzw. SST exprimieren werden (Butt et al., 2005; Anderson et al., 2001; Marin und Rubenstein, 2001; Wichterle et al., 2001; Lavdas et al., 1999). Diese siedeln sich, je nach Geburtsdatum, in einer „inside-first-outside-last“-Weise in den entstehenden Schichten der Corticalplatte an (Rymar und Sadikot, 2007). Auch aus der vCGE gelangt ein Strom an PV- und SST-positiven Interneuronen in die tiefen Schichten der Corticalplatte (Butt et al., 2005; Yozu et al., 2005). Aus der LGE wandern Interneurone in den olfaktorischen Bulbus ein (Wichterle et al., 2001), Oligodendrocyten aus dem anterioren entopeduncularen Areal finden ebenfalls ihren Weg in das Telencephalon (ab E14 stammt ein Teil der Oligodendrocyten ebenfalls aus der LGE) (Nery et al., 2001; Olivier et al., 2001; Tekki-Kessarias et al., 2001).

Nach E15 schließlich gelangt eine dritte Gruppe an Interneuronen in den Neocortex (Anderson et al., 2001; Marin und Rubenstein, 2001) und besiedelt die Corticalplatte (Abb. 3). In dieser Kohorte sind neben den PV-/SST-Interneuronen aus der MGE und Zellen aus der LGE nun auch CR-Interneurone aus der dCGE enthalten (Wonders und Anderson, 2006; Butt et al., 2005; Xu et al., 2004), die sich aber nicht in einer „inside-first-outside-last“-Weise in den Schichten der Corticalplatte anordnen (Miyoshi et al., 2007; Rymar und Sadikot, 2007). Auch Zellen aus der LGE sind hier anzutreffen, die neben dem Cortex (wenige CR-Interneurone) den olfaktorischen Bulbus zum Ziel haben (Andrews et al., 2007; Nakajima et al., 2007; Xu et al., 2004; Stenman et al., 2003).

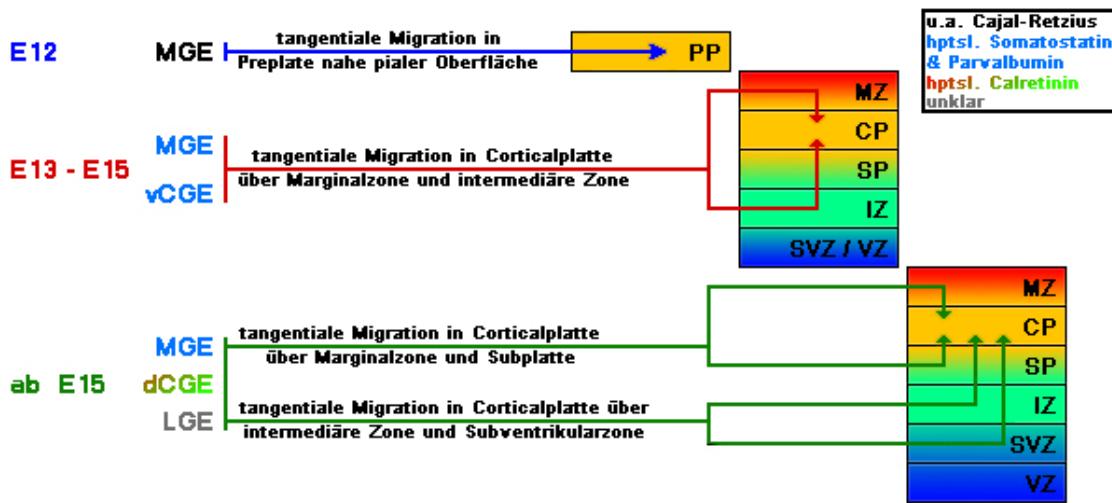


Abb. 3: Die Migrationswege der Interneurone. Die Migrationsrouten der GABAergen Interneurone aus der GE in den sich entwickelnden Neocortex unterscheiden sich je nach Entwicklungsstadium. Die frühesten Interneurone wandern so in den Neocortex ein, dass sie hauptsächlich in der Marginalzone erscheinen (E13 - E15). Mit fortschreitender Entwicklung kommen weitere Migrationsrouten hinzu, welche die Zellen nun auch über die Subplatte und die intermediaire Zone / Subventrikulärzone in den entstehenden Cortex führen (ab E15) (erstellt nach: Metin et al., 2006).

Es ergeben sich also mehrere zeitlich und räumlich getrennte Interneuronengruppen, die aus verschiedenen Teilen der GE in den Neocortex einwandern. Dort siedeln sie sich nach einem bestimmten Muster in den entstehenden corticalen Schichten an. Allein durch ihren Ursprung und ihr Geburtsdatum sind diese Neurone schon in gewissen Eigenschaften determiniert. Allerdings sind diese Migrationsgruppen zeitlich nicht klar getrennt, sondern zeigen Überlappungen.

Es existiert nicht nur ein zeitlicher Unterschied bei diesen Migrationskohorten (Abb. 3). Auch die Wege, über welche die verschiedenen Interneurone migrieren, unterscheiden sich drastisch. Die Neurone der ersten Kohorte erscheinen fast ausschließlich in der „Preplate“ und wandern dort über eine Route ein, die nahe an der pialen Oberfläche verläuft. Die zweite Kohorte migriert hauptsächlich über die Intermediärzone (IZ) in den Neocortex, die letzte vornehmlich über intermediaire Zone und Subventrikulärzone (SVZ) (Metin et al., 2006; Anderson et al., 2001).

Je nach Migrationsroute zeigen die wandernden Zellen auch spezifische Unterschiede in ihrem Verhalten. Zellen, die in der Marginalzone erscheinen, wandern von dort radial nach unten, also einwärts gerichtet in den Neocortex ein. Interneurone, die ihre Wege über die Intermediärzone oder Subventrikulärzone nehmen, bewegen sich radial nach oben in den Neocortex (Metin et al., 2006; Hevner et al., 2004; Ang et al., 2003; Tanaka et al., 2003). Dies

tun sie entweder sofort nach dem Erreichen einer bestimmten Position oder wandern erst nach ventral in die Ventrikulärzone ein (ventricle-directed migration), verweilen dort für eine gewisse Zeit, bis sie dann radial (nach dorsal) in den Neocortex migrieren (Nadarajah et al., 2002). Dies hat wahrscheinlich den Zweck, daß die Interneurone in der corticalen Ventrikulärzone Informationen erhalten, die für das Ereichen ihres endgültigen Ziels notwendig sind.

Die Interneurone zeigen also im Vergleich zu den Pyramidenzellen wesentlich längere und komplexere Migrationswege. Dies kommt vor allem durch den Ursprungsort dieser Zellen zustande. Die Pyramidenzellen werden in einem Areal direkt unter dem entstehenden Neocortex, der corticalen Ventrikulärzone, geboren und können daher mit einer vergleichsweise kurzen und einfachen radialen Migrationsstrecke ihre Ziele erreichen (Kriegstein, 2005; Kriegstein und Noctor, 2004; Noctor et al., 2004; Noctor et al., 2001). Aber auch bei den Pyramidenzellen im Neocortex finden sich kurze tangentielle Bewegungen, die offenbar für die laterale Verteilung derjenigen Pyramidenzellen notwendig sind, welche aus dem gleichen Klon stammen.

2.4 Fragestellung der Arbeit

Die GABAergen Interneurone sind eine sehr facettenreiche Gruppe an Nervenzellen. Im ausgereiften Zustand findet man Interneurontypen mit sehr unterschiedlicher Morphologie, Protein- und Neuropeptidexpression sowie divergierenden elektrophysiologischen Eigenschaften. Vor diesem Hintergrund war es bisher nicht möglich, die postnatale Entwicklung eines bestimmten Interneurontyps zu untersuchen. Fragen nach dem Zeitpunkt der Entwicklung wichtiger elektrophysiologischer Eigenschaften (z.B. Muster der Entladung von Aktionspotentialssalven) oder nach der Integration von bestimmten Interneuronentypen in das lokale synaptische Netzwerk konnten nicht beantwortet werden.

Mit transgenen Mäusen, bei denen Subpopulationen an GABAergen Interneuronen mit GFP genetisch markiert wurden, stehen deshalb gute Modelle zur Verfügung, um die Eigenschaften bestimmter Subpopulationen genauer zu analysieren. In der FVB-TG(GadGFP)45704Swn/J-Maus (Olivia et al., 2000) wurden Interneurone mit GFP markiert, die sehr wahrscheinlich zur Gruppe der Martinotti-Zellen gehören. Sie exprimieren SST und CR und weisen ein regelmäßiges Entladungsmuster auf.

Dieses transgene Mausmodell wurde genutzt, um die postnatale Entwicklung dieser Subpopulation (GIN) zu untersuchen. Hierzu wurden immunhistochemische und elektrophysiologische Methoden eingesetzt. Die Untersuchungen beschränkten sich im Wesentlichen auf den frontalen (v.a. motorischen) und somatosensorischen Teil der Großhirnrinde, der im Folgenden sensomotorischer Cortex genannt wird.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für alle Experimente wurden Mäuse der transgenen Linie FVB-Tg(GadGFP)45704Swn/J (Jackson Laboratories, Maine, USA) benutzt. Diese Mäuse werden in der Literatur als GIN-Mäuse bezeichnet, wobei GIN für „GFP expressing inhibitory neurons“ steht (Olivia et al., 2000). In diesen Mäusen unterliegt die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins der Kontrolle des GAD1-Genpromotors, der mit dem Strukturgen für GFP als Transgen homozygot in das Genom der Tiere eingeführt wurde.

Zur Untersuchung der postnatalen Entwicklung von elektrophysiologischen Eigenschaften der Interneurone wurden die Tiere in drei Alterskohorten eingeteilt: Gruppe 1 von P6 bis P8, Gruppe 2 von P10 bis P14 und Gruppe 3 von P18 bis P22. Immunhistochemische Analysen wurden an den postnatalen Tagen P2, P3, P5, P10, P15, P20 und P25 durchgeführt.

Die Haltung der Tiere erfolgte im Tierhaus des Instituts bei einem 12-stündigen Tag-Nachtzyklus und freiem Zugang zu Futter und Wasser.

3.2 Immunhistochemie

3.2.1 Verwendete Lösungen und allgemeine Techniken

Im Folgenden werden die in allen immunhistochemischen Versuchen verwendeten Lösungen und Teilschritte beschrieben.

Die jeweiligen Färbungen der Gehirnschnitte wurden in 24-Lochplatten (Tissue Culture Testplates, Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien) durchgeführt. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Schnitte während des ganzen Vorgangs von den jeweiligen Lösungen umspült waren. Nach abgeschlossener Färbung wurden die Gewebschnitte auf Objekträger aufgezogen.

Mittels einer „**Perforationslösung**“, die das Detergenz Triton X100 enthielt, wurde die Lipidmembran der Neurone für die Antikörper durchgängig gemacht. Diese Lösung enthielt 1% Triton X100 in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS: 136,8 mM Natriumchlorid, 2,682 mM Kaliumchlorid, 8,089 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,763 mM Kaliumdihydrogenphosphat; pH = 7,4; Osmolarität: 150 mM).

Um unspezifische Bindungen der Antikörper und somit unspezifische Färbungen zu vermeiden, wurden die perforierten Schnitte mit einer „**Blockierlösung**“ behandelt. Sie bestand aus PBS mit 10% Ziegenserum und 0,01% Triton X100.

Die primären Antikörper gegen das anzufärbende Antigen (z.B. GFP, Somatostatin) wurden in einem bestimmten Verhältnis verdünnt. Diese Verdünnung geschah in der „**Antikörperlösung 1**“, welche aus 3% Ziegenserum und 0,01% Triton X100 in PBS bestand.

Die sekundären Antikörper mit den gekoppelten Fluorochromen (Alexa 488, Cyanin 3 [Cy3], Cyanin 5 [Cy5]) wurden ebenfalls in einem bestimmten Verhältnis in „**Antikörperlösung 2**“ verdünnt. Diese Lösung bestand aus PBS mit 0,01% Triton X100.

Von diesen allgemeinen Lösungen abweichende Zusammensetzungen werden an entsprechender Stelle erwähnt.

3.2.2 Bestimmung des Geburtszeitpunktes der GIN

Die Bestimmung des Geburtsdatums der GIN wurde entsprechend einer leicht abgewandelten Form der Methode nach Grabiec et al. (2009) durchgeführt. Die Technik beruht auf dem Einbau von Bromiduridin (BrdU, Derivat des RNA-Bausteins Uridin) in die DNA während der Mitose. Verabreicht man BrdU während eines begrenzten Zeitfensters während der Embryonalentwicklung, dann wird die Substanz in die DNA sich teilender Zellen integriert. Neurone, in denen zu einem späteren Zeitpunkt BrdU nachgewiesen werden kann, befanden sich demzufolge während des genannten Zeitfensters in der Mitose, was bei den postmitotischen Nervenzellen normalerweise nur unmittelbar nach ihrer Geburt der Fall ist. Der Nachweis von BrdU erfolgte mit einem BrdU-spezifischen Antikörper.

Mehrere Zuchtpaare von adulten GIN-Mäusen wurden über Nacht 1:1 verpaart. Dieser Verpaarungsmodus erlaubt bei einer erfolgreichen Verpaarung die Bestimmung des Alters der Embryonen. Mit einem Plaque-Test wurde überprüft, ob das Weibchen während dieser Zeit gedeckt wurde. Bei einem positiven Test wurden die Zuchtpaare getrennt und die gepläqueten, potentiell schwangeren Weibchen in Einzelkäfigen gehalten. An den jeweiligen embryonalen Entwicklungstagen (E11, E13, E14, E15, E16 und E17, gezählt ab dem Zeitpunkt des positiven Plaquetests) wurde dem Muttertier eine BrdU-Lösung intraperitoneal injiziert. Die Lösung bestand aus 5 mg/ml BrdU in physiologischer Kochsalzlösung, das Injektionsvolumen betrug 100 µl pro 10 g Lebendgewicht der Mutter. Im Abstand von jeweils zwei Stunden wurden pro Muttertier vier Injektionen vorgenommen.

Nach der Geburt wurden jeweils zwei Jungtiere im Alter von vierzehn Tagen für die BrdU-Färbungen herangezogen. Nach Betäubung der Tiere mit CO₂, wurden sie dekapitiert und der Kopf für einige Zeit in eisgekühlter PBS inkubiert. Die durch die plötzliche Kälte hervorgerufene starke Gefäßverengung führte zu einem fast vollständigen Ausstoß des Blutes aus dem Gehirn. Eine aufwendige kardiale Perfusion der Tiere war damit nicht notwendig. Das Gehirn wurde dann aus dem Schädel entnommen und bei 4°C über Nacht in Paraformaldehyd (PFA, 4% in dH₂O) fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden aus den Gehirnen mittels eines Vibratoms (VT 1000S, Leica, Solms, Deutschland) 150 µm dicke Coronalschnitte angefertigt.

Die Behandlung mit PFA bewirkte eine ausgeprägte Reduktion der Fluoreszenz des GFP. Deshalb musste neben der BrdU-Färbung eine Nachfärbung des GFPs mit Hilfe von spezifischen Antikörpern vorgenommen werden. Die Schnitte wurden in PBS aufgefangen und 10 Minuten in Perforationslösung inkubiert (Raumtemperatur). Nach weiteren 30 Minuten Inkubation in Blockierlösung (Raumtemperatur) wurden die GFP-Antikörper (chicken α-GFP polyclonal IgY antibody, Millipore, Massachusetts, USA; 1:500 verdünnt in Antikörperlösung 1) hinzugefügt und bei 4°C über Nacht auf den Schnitten belassen. Danach wurde die Antikörperreaktion mit drei Waschschritten (PBS, je 10 Minuten bei Raumtemperatur) gestoppt und die sekundären Antikörper (Alexa Fluor488-goat α-chicken IgG (H+L), Invitrogen, Darmstadt, Deutschland, 1:500 verdünnt in Antikörperlösung 2) für drei Stunden bei Raumtemperatur mit den Gewebeschnitten inkubiert. Dieser und alle nachfolgenden Schritte wurden zur Schonung der Fluorochrome unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Reaktion des sekundären mit dem primären Antikörper wurde durch je drei Waschschritte in PBS (je 10 Minuten bei Raumtemperatur) abgebrochen.

Für die folgende BrdU-Nachweisreaktion wurden die Schnitte für 30 Minuten bei 36°C in 2 N Salzsäure inkubiert, um den Nucleus für die BrdU-Antikörper zugänglich zu machen. Zur Neutralisierung des sauren pHs wurden die Schnitte dann für 20 Minuten (Raumtemperatur) in 0,1 M Natriumtetraborat (gelöst in dH₂O) überführt. Danach erfolgte Inkubation mit BrdU-Antikörpern in Antikörperlösung I (rat α-BrdU polyclonal IgG2A antibody, abcam, Cambridge, England; 1:500 verdünnt) über Nacht bei 4°C. Die Reaktion wurde durch drei Waschschritte in PBS (je 10 Minuten, Raumtemperatur) gestoppt, die sekundären Antikörper (Cy5 conjugated affinity purified secondary antibody donkey α-rat, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland; 1:500 verdünnt in Antikörperlösung 2) für drei Stunden (Raumtemperatur) hinzugefügt und die weitere Reaktion danach mit drei Waschschritten in PBS unterbunden.

Je fünf Schnitte wurden auf einen Objektträger (Superfrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen, mit Einbettmedium (Aqua Polymount, Polysciences Inc., Pennsylvania, USA) überschichtet und mit einem Deckglas (24x60 mm, Roth, Karlsruhe, Deutschland) versehen. Die Lagerung der Schnitte geschah im Dunkeln bei 4°C.

Die Präparate wurden mit einem Konfokalmikroskop (IX70, Olympus, Hamburg, Deutschland) untersucht. Dazu wurden pro Präparat jeweils sechs Bereiche des Neocortex bei 20-facher optischer und dreifacher digitaler Vergrößerung aufgenommen. Dabei stammten jeweils zwei Bereiche aus dem somatosensorischen Cortex, zwei aus dem frontalen und zwei aus dem cingulären Cortex. Es wurden deckungsgleiche Z-Stapel der jeweiligen Bereiche angefertigt und zwar für GFP (Fluorochrom: Alexa 488 [Absorption: 494 nm, Emission: 519 nm]) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und für BrdU (Fluorochrom: Cy5 [Absorption: 650 nm, Emission: 670 nm]) bei 644 nm. Der Abstand zwischen den Scan-Ebenen in den einzelnen Z-Stapeln betrug 1,5 µm. Die Bilder wurden digital gespeichert (TIFF-Format) und mit Hilfe des Programms ImageJ (ImageJ 1.47q, National Institutes of Health, Maryland, USA) ausgewertet. Dazu wurden die Z-Stapel mit den Aufnahmen von GFP und BrdU aus einem Bereich mit Hilfe einer speziellen Funktion des Programms ImageJ überlagert und doppelt positive Zellen (GFP und BrdU) identifiziert.

3.2.3 Konstruktion einer Gehirnkarte und Bestimmung der Zelldichte von GIN

Um zu untersuchen, wann und wo die GIN im Neocortex auftreten, wurden Gehirnkarten angefertigt und die Dichte der GIN im Neocortex pro Untersuchungszeitpunkt festgestellt.

Mehrere GIN-Mäuse verschiedenen Alters (P2, P3, P5, P10, P15, P20 und P25) wurden mit CO₂ betäubt und dekapiert. Das Gehirn wurde entnommen und in 4% PFA bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden mit einem Vibratome 150 µm dicke Horizontalschnitte des Gehirns hergestellt. Um eine zu große Anzahl an Schnitten zu vermeiden, aber dennoch eine möglichst genaue Kartierung des Gehirns zu erhalten, wurde jeder zweite Schnitt verworfen, so dass zwischen den verwendeten Schnitten ein Abstand von je 150 µm bestand.

Die Schnitte wurden in PBS aufgefangen und dann mit Perforationslösung (10 Minuten, Raumtemperatur) und Blockierlösung (30 Minuten, Raumtemperatur) behandelt. Die Antikörper gegen GFP (chicken α-GFP polyclonal IgY antibody, Millipore, Massachusetts, USA; 1:500 verdünnt in Antikörperlösung 1) wurden über Nacht bei 4°C mit den Schnitten inkubiert und die Antikörperreaktion danach durch drei Waschungen mit PBS (je 10 Minuten, Raumtemperatur) gestoppt. Die sekundären Antikörper (Alexa Flour488-goat

α -chicken IgG (H+L), Invitrogen, Darmstadt, Deutschland; 1:500 verdünnt in Antikörperlösung 2) wirkten für drei Stunden bei Raumtemperatur auf die Hirnschnitte ein. Dieser und alle folgenden Schritte geschahen unter Lichtausschluss, um die Fluorochrome vor einem Ausbleichen zu schützen. Die fertig gefärbten Schnitte wurden, nach dreimaligem Waschen mit PBS (je 10 Minuten, Raumtemperatur), auf Objektträger gezogen (fünf Schnitte in Reihenfolge von dorsal nach ventral), eingebettet und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops (BX50, Olympus, Hamburg, Deutschland) und einer Anregungswellenlänge von 488 nm wurde jeder Horizontalschnitt bei vierfacher Vergrößerung in mehreren Einzelbildern mit überlappenden Bereichen über seine ganze Fläche fotografiert. Die Bilder wurden im TIFF-Format gespeichert und später mit dem Programm PhotoshopCS (Adobe Systems Inc., Kalifornien, USA) anhand der überlappenden Bereiche zu einem Gesamtbild des jeweiligen Schnittes zusammengesetzt. Diese Karten bilden das Gehirn in mehreren horizontalen Ebenen von dorsal nach ventral ab.

Zur Bestimmung der Dichte an GIN im Neocortex wurden die Schnitte in gleicher Weise, wie eben beschrieben, mit GFP-Antikörpern und fluoreszierenden Sekundärantikörpern gefärbt. Allerdings handelte es sich hier um Coronalschnitte des frontalen und somatosensorischen Cortex mit einer Dicke von 150 μ m. Bei je zwei Tieren pro Altersgruppe (P2, P3, P5, P10, P15, P20, P25) wurden fünf Schnitte aus diesen Bereichen angefertigt und ausgewertet. Die mikroskopischen Bilder der Schnitte wurden mit einem Konfokalmikroskop (IX70, Olympus, Hamburg, Deutschland) digitalisiert. Bei 20-facher Vergrößerung wurden Z-Stapel (30 Bilder) mit einem Ebenenabstand von einem Mikrometer aufgenommen und im TIFF-Format gespeichert.

3.2.4 Protein- und Peptidprofil der GIN

Die GIN exprimieren als Markerproteine das Neuropeptid Somatostatin und das Calcium-bindende Protein Calretinin. Um die Expression dieser Marker während der postnatalen Entwicklung zu verfolgen, wurden je zwei GIN-Mäuse der verschiedenen Altersgruppen (P2, P3, P5, P10, P15, P20 und P25) auf die Anwesenheit dieser Marker mit Hilfe einer abgewandelten Form der Methode nach Ma et al. (2006) untersucht.

Nach der Betäubung mit CO₂ wurden die Tiere dekapitiert, der Kopf für einige Zeit in eisgekühlter PBS inkubiert und das Gehirn aus der Schädelkapsel entnommen. Die Fixierung erfolgte über Nacht bei 4°C in 4% PFA. Auch bei diesen Schnitten musste aus dem oben bereits erwähnten Grund eine Nachfärbung mit GFP-Antikörpern vorgenommen werden. Der Fixierung folgte mehrmaliges Waschen der Gehirne mit PBS und das Anfertigen von 150 μ m

dicken Coronalschnitten des Neocortex mittels eines Vibratoms. Diese Schnitte wurden in PBS aufgefangen.

Die primären Antikörper gegen GFP (chicken α -GFP polyclonal IgY antibody, Millipore, Massachusetts, USA), SST (rabbit α -Somatostatin polyclonal antibody, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) und CR (rabbit α -Calretinin polyclonal antibody, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) wurden 1:500 in Antikörperlösung 1 verdünnt. Zur Inkubation wurden jeweils die Antikörper gegen GFP und SST bzw. GFP und CR kombiniert verabreicht. Nach der Behandlung der Schnitte mit Perforationslösung (10 Minuten, Raumtemperatur) und Blockierlösung (30 Minuten, Raumtemperatur) erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern. Sie dauerte 36 Stunden und wurde bei 4°C durchgeführt. Um die Antikörperreaktion abzustoppen und verbliebene, nicht gebundene Antikörper aus dem Gewebe zu entfernen, wurden die Schnitte dreimal für je 10 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen.

Die sekundären Antikörper Alexa Fluor488-goat α -chicken IgG (H+L) (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) für die GFP-Detektion und der sekundäre Antikörper für die SST- bzw. CR-Detektion (Cy3-conjugated affinity purified secondary antibody goat α -rabbit IgG, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) wurden 1:500 in Antikörperlösung 2 verdünnt und verblieben für dreieinhalb Stunden bei Raumtemperatur auf den Schnitten. Um einem Ausbleichen der Fluorochrome entgegenzuwirken, wurden dieser und alle nachfolgenden Schritte unter Lichtausschluss durchgeführt. Danach wurde die Antikörperreaktion bei Raumtemperatur mit drei zehnminütigen Waschvorgängen mit PBS gestoppt.

Jeweils fünf Schnitte wurden auf Objektträger gezogen und, nach Überschichtung mit einem Einbettmedium, mit einem Deckglas versehen. Die Lagerung der Präparate erfolgte unter Lichtausschluss bei 4°C.

Die gefärbten Schnitte wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop (BX50, Olympus, Hamburg, Deutschland) untersucht. Pro Präparat wurden jeweils sechs Bereiche des Neocortex bei einer 20-fachen Vergrößerung mit einer CCD-Kamera (Microfire, Optronics, Kalifornien, USA) aufgenommen. Dabei wurden jeweils zwei Bereiche aus dem somatosensorischen Cortex, zwei aus dem frontalen und zwei aus dem cingulären Cortex als Bilddateien im TFF-Format gespeichert. Die mit GFP-Antikörpern markierten Zellen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm aufgenommen, die mit SST- bzw. CR-Antikörpern gefärbten Neurone bei einer Anregungswellenlänge von 550 nm (Fluorochrom: jeweils Cy3 [Absorption:550 nm, Emission: 570 nm]). Die Auswertung der Aufnahmen

erfolgte mit dem Programm ImageJ (ImageJ 1.47q, National Institutes of Health, Maryland, USA).

3.2.5 Zellrekonstruktion (nach Xu et al., 2006)

Die Morphologie der GIN wurde durch mikroskopische Rekonstruktionen von solchen Neuronen untersucht, in die im Verlauf von elektrophysiologischen Experimenten das Markermolekül Biocytin injiziert wurde. Aus den drei Alterskohorten (P6 bis P8, P10 bis P14, P18 bis P22) wurden je fünf Neurone, ausschließlich aus den Schichten II/III des frontalen bzw. somatosensorischen Cortex, rekonstruiert.

Die Injektion von Biocytin erfolgte im Ganzzell-Modus der Patch-Clamp-Technik. Vor der Injektion wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften des betreffenden Neurons registriert. Die intrazelluläre Lösung (siehe **3.3.2 Versuchsaufbau und Messvorgang**: S. 38) innerhalb der Patchpipette enthielt 0,5% Biocytin, welches bei dem gegebenen pH-Wert von 7,2 - 7,3 positiv geladen ist. Durch Anlegen einer Spannung mit einer Polarität, die zur Freisetzung von positiv geladenen Teilchen aus der Pipette führte, konnte Biocytin in die Neurone injiziert werden. Dazu wurde für 30 Minuten ein depolarisierender Strompuls von 800 ms Dauer und einer Amplitude von 1 nA mit einer Frequenz von 1 Hz appliziert. Danach wurde die Elektrode von der Zelle abgezogen und der gesamte Schnitt zur Nachinkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde in Carbogen-gesättigter ACSF (siehe **3.3.1 Präparation der Gehirnschnitte**: S. 37) aufbewahrt. In dieser Zeit konnte sich das Biocytin in der gesamten Zelle ausbreiten. Die Fixierung der Schnitte erfolgte über Nacht bei 4°C in 4% PFA.

Zur mikroskopischen Darstellung der markierten Neurone wurden die Schnitte mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit Perforationslösung behandelt. Biocytin wurde durch Konjugation mit Streptavidin Alexa Fluor 555 (Streptavidin Alexa Fluor 555 conjugate, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland, 1:500 verdünnt in Antikörperlösung 2), welches Biocytin wie einen Antikörper bindet, sichtbar gemacht. Die Inkubation mit diesem Substrat dauerte drei Stunden (Raumtemperatur). Danach wurde die Reaktion durch dreimaliges Waschen in PBS (je 10 Minuten, Raumtemperatur) gestoppt und die Schnitte auf Objektträgern eingebettet. Um die 300 µm dicken Schnitte vor Quetschung zu bewahren, wurden die Deckgläser mit unterstützenden Füßen aus Knetmasse versehen. Die Präparate wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die markierten Neurone wurden mit einem konfokalen Mikroskop (IX70, Olympus, Hamburg, Deutschland) bei einer Anregungswellenlänge von 566 nm aufgenommen (Fluorochrom: Alexa555, Exzitation: 555 nm, Emmission: 565 nm). Bei 20-facher optischer

und dreifacher digitaler Vergrößerung, wurden die Zellen in mehreren, sich überlappenden Scavorgängen erfasst. Der Abstand zwischen den einzelnen Bildebenen der Z-Stapel betrug 0,5 µm. Die Bilddaten wurden im TIFF-Format abgespeichert. Mit dem Programm ImageJ (ImageJ 1.47q, National Institutes of Health, Maryland, USA) wurden in den Z-Stapeln die einzelnen Zellbereiche aus dem Hintergrund extrahiert und diese Einzelteile mittels des Programms Photoshop anhand der sich überlappenden Bereiche zu einem zweidimensionalen Gesamtbild der Zelle zusammengefügt. Diese rekonstruierten Bilder wurden ebenfalls im TIFF-Format gespeichert. Pro Schnitt wurde nur ein Neuron mit Biocytin markiert.

3.2.6 Auswertung der Daten

Bei allen Auswertungen im Rahmen der immunhistochemischen Analysen wurde pro Altersgruppe ein Mittelwert aus den Einzelwerten der beiden verwendeten Versuchstiere errechnet ($n = 2$ pro Altersgruppe). Im Fall der Shollanalyse wurde ein Mittelwert aus den Einzelwerten der pro Altersgruppe rekonstruierten Neurone ($n = 5$ pro Altersgruppe) ermittelt. Für die Bestimmung des Geburtszeitpunktes und der SST- bzw. CR-Expression wurde die Anzahl aller GIN, welche für die Marker BrdU, SST oder CR positiv waren, ins Verhältnis zur Anzahl aller erfassten GFP-positiven Neurone gesetzt. Dieses Verhältnis wurde in Prozent angegeben.

Die Gehirnkarten wurden nur qualitativ ausgewertet, die Bestimmung der Dichte an GIN in den verschiedenen Altersgruppen beruht auf einer Auszählung der GFP-positiven Zellen in einem gegebenen Gewebsvolumen (siehe Ergebnisse). Zur morphologischen Charakterisierung wurde an den rekonstruierten Zellen mittels einer Shollanalyse (Sholl, 1953) die Ausbreitung der Dendriten und Axone bestimmt.

Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm Prism 3.03 (Graphpad Software Inc., Kalifornien, USA) durchgeführt. Dabei wurden der Kruskal-Wallis-Test mit Post-Tests nach Dunn angewendet. Alle Werte im Text des Abschnitts „**4.1 Immunhistochemische Untersuchungen**“ (siehe S. 42) geben Mittelwerte mit Standardfehler an. Nur im Kapitel „**4.1.4 Morphologische Entwicklung von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus**“ (siehe S. 59) finden sich Mittelwert und Standardabweichung.

3.3

Elektrophysiologie

3.3.1 Präparation der Gehirnschnitte

Alle elektrophysiologischen Versuche wurden an Gehirnschnitten durchgeführt. Die Präparate mussten während der gesamten Zeit (Präparation und Messung) von einer sog. künstlichen cerebrospinalen Flüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) umspült werden, um die Neurone im Präparat am Leben zu erhalten. Die ACSF war folgendermaßen zusammengesetzt: NaCl (125 mM), KCl (3 mM), NaH₂PO₄ (1,25 mM), NaHCO₃ (25 mM), CaCl₂ (2 mM), MgCl₂ (2 mM) und D-Glucose (25 mM). Die Lösung wurde ständig mit Carbogen begast (95% O₂, 5% CO₂). Dies diente zum einen der Versorgung der Schnitte mit Sauerstoff. Zum anderen bildete das CO₂ des Carbogens zusammen mit dem NaHCO₃ der ACSF ein offenes Puffersystem. Der pH der ACSF lag bei 7,4 (28°C) und ihre Osmolarität zwischen 310 mOsm und 330 mOsm. Der erhöhte Glucosegehalt (Cerebrospinalflüssigkeit *in vivo*: 5 mM vs. ACSF: 25 mM) hilft die Anzahl der aktiven Neurone unter *in vitro*-Bedingungen deutlich zu vergrößern (Frick et al. 2007).

Während der Präparation wurde eine spezielle extrazelluläre Lösung verwendet, deren Gehalt an Calciumionen auf 0,5 mM gesenkt und deren Konzentration an Magnesiumionen auf 3,5 mM erhöht war (sog. **Schneidelösung**). Dies diente der Reduktion der negativen Auswirkungen auf die Überlebensrate von Neuronen durch die Präparation. Die mechanische Einwirkung kann einen zu starken Calciumeinstrom in die Zellen bewirken; dies wirkt dann exzitotoxisch.

Zur Präparation der Schnitte wurden GIN-Mäuse der verschiedenen Altersgruppen mit CO₂ betäubt, dekapitiert und der Kopf kurz (30 s) in eisgekühlter Schneidelösung inkubiert. Letzteres führte zu einer kältebedingten Konstriktion der Blutgefäße und damit zu einem Ausstoß des Blutes aus den Gehirngefäßen. Danach wurde das Gehirn *in toto* aus dem Schädel entnommen und für ca. eine Minute wieder in eisgekühlte Schneidelösung überführt. Dann wurde das Cerebellum mit einer Rasierklinge abgetrennt und die Großhirnhemisphären entlang der *Fissura longitudinalis* getrennt. Eine der Hemisphären wurde wieder in die eisgekühlte Schneidelösung gegeben, die andere durch einen Schnitt am dorsalen Ende mit einer glatten Fläche versehen, die es ermöglichte, die Gehirnhälfte mit Sekundenkleber (Lock-Tite 406, Henkel, Düsseldorf, Deutschland) aufrecht auf den Objektisch des Mikrotoms (HM 650V, Microm, Walldorf, Deutschland) zu kleben. Außerdem wurde die Hemisphäre medial durch einen zuvor aufgeklebten Agarblock in Schnittrichtung stabilisiert. Der Tisch wurde mittels eines Magneten in der Wanne des Mikrotoms befestigt, in der sich 4°C kalte mit

Carbogen gesättigte Schneidelösung befand. Die Hemisphäre wurde bei langsamer Vorschubgeschwindigkeit und mittlerer Frequenz getrimmt und danach coronale Hirnschnitte mit einer Dicke von 300 µm aus dem Bereich des sensomotorischen Cortex angefertigt. Alle Präparate wurden in ACSF gesammelt und dann für eine Stunde in einem Wärmebad (28°C) inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie dann bei Raumtemperatur in ACSF aufbewahrt.

3.3.2 Versuchsaufbau und Messvorgang

Der Versuchsaufbau bestand aus einem aufrechten Mikroskop (Axioscop FS, Zeiss, Göttingen, Deutschland), auf dessen Objekttisch ein Organbad zur Aufnahme der Schnitte angebracht war. Dieses Bad wurde ständig mit ACSF perfundiert. Dazu wurde eine pulsationsgedämpfte Pumpe (minipuls 3, Gilson, Wisconsin, USA) verwendet, die das Bad mit einer Flussrate von 2 ml/min bis 3 ml/min durchspülte. Zudem befand sich im Organbad ein Thermometer, das zusammen mit einer Kontrolleinheit (Automatic Temperatur Controller TC-324B, Warner Instrument Corp., Connecticut, USA) und einem Vorlauferhitzer die Temperatur der Badlösung konstant auf 28°C hielt. Zu seiner Stabilisierung wurde ein kleiner, mit Nylonfäden bespannter Metallring auf den Schnitt gelegt.

GIN wurden anhand ihrer Fluoreszenz identifiziert, indem Licht der Wellenlänge 488 nm durch das Objektiv des Epifluoreszenz-Mikroskops auf das Präparat gestrahlt wurde. Das Fluoreszenzbild der identifizierten Zelle wurde mit Hilfe einer Mikroskopkamera (Orca-ER, Hamamatsu, Shizouka, Japan; [Software: Axiovision Rel. 4.4, Zeiss, Göttingen, Deutschland]) auf einem Monitor dargestellt und digital abgespeichert. Danach wurde das Mikroskop in den DIC-Modus (differentieller Phaseninterferenzkontrast) umgeschaltet und das bereits identifizierte Neuron aufgesucht. Der DIC ist eine spezielle Abbildungstechnik, welche die Dichteunterschiede in einem Präparat kontrastreich darzustellen vermag und so ein räumlich anmutendes Bild schafft (Dodd und Ziegler, 1990). Das für diesen Prozess verwendete Infrarotlicht dringt zudem tiefer als sichtbares Licht in das Schnittpräparat ein und so können Neurone bis in eine Tiefe von ca. 100 µm sichtbar gemacht werden. Das DIC-Bild der GIN wurde ebenfalls digitalisiert und im TIFF-Format abgespeichert.

Die Messungen an den GIN wurden in der Ganzzell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik (Hamil et al., 1981) durchgeführt. Die hierfür notwendigen Pipetten wurden mit Hilfe eines Elektrodenziehgerätes (DMZ-Universal Puller, Zeitz, Martinsried, Deutschland) aus Borsilikatglaskapillaren (GC150F-10; Harvard Apparatus, Massachusetts, USA) hergestellt. Die Pipetten wurden mit einer Lösung gefüllt, die u.a. die wichtigsten Komponenten des

intrazellulären Milieus enthielt: NaCl (2 mM), KCl (4 mM), EGTA (Ethylenglycol-bis-(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure), 0,2 mM, Kalium-Gluconat (135 mM), HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure, 10 mM), ATP-Mg (Adenosintriphosphat, Magnesiumsalz, 4 mM), GTP-Na (Guanosintriphosphat, Natriumsalz, 0,5 mM) und Phosphokreatin (Natriummsalz, 10 mM). Der pH lag bei 7,3, die Osmolarität bei 290 mOsm. Nach Befüllen der Pipetten mit dieser Lösung wurde ein elektrischer Widerstand der Elektroden gemessen, der zwischen 6 M Ω bis 10 M Ω lag.

In einer zweiten Variante der intrazellulären Lösung (Hoch-Chlorid-Lösung) wurde das Kalium-Gluconat vollständig durch KCl ersetzt (2 mM NaCl, 131 mM KCl, 0,2 mM EGTA, 10 mM HEPES, 4 mM ATP-Mg, 0,5 mM GTP-Na und 10 mM Phosphokreatin). Dadurch waren die extrazelluläre und die intrazelluläre Chloridkonzentration ungefähr gleich, das Nernst-Potential für Chlorid also nahe 0 mV. Chloridabhängige Ströme, wie z.B. Ströme durch den GABA_A-Rezeptorkanal, unterliegen dann einer großen treibenden Kraft und weisen deshalb große Amplituden auf.

Die befüllte Elektrode wurde über einen chlorierten Silberdraht mit dem Vorverstärker des Meßverstärkers (SEC-10L, npi electronics, Tamm, Deutschland) verbunden. Der Vorverstärker war an einem motorisierten Mikromanipulator (TS5000-150, Burleigh, Ontario, USA) befestigt. Als Referenzelektrode diente ein gesintertes Ag-/AgCl-Pellet, das sich in der extrazellulären Lösung in der Nähe des Hirnschnittes befand. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die Elektrode in das Gesichtsfeld des Mikroskops gebracht und über der identifizierten Zelle positioniert. Um das Verstopfen der Pipette zu verhindern, wurde ein leichter Überdruck an sie angelegt.

Mit Hilfe eines Pulsgenerators (Master-8, A.M.P.I., Jerusalem, Israel) wurde ein kurzer hyperpolarisierender Strompuls (30 ms, 30 pA) über die Elektrode in den Extrazellulärraum appliziert. Mit Hilfe dieses Signals, das auf einem Oszilloskop (HM 507, Hameg Instruments, Kaiserslautern, Deutschland) dargestellt wurde, konnte sowohl die Elektrodenkapazität als auch der Elektrodenwiderstand mit den entsprechenden Vorrichtungen am Verstärker kompensiert werden. Beim Abgleich des sog. Offset-Potentials wurde das „liquid junction potential“ (hier: + 9 mV) berücksichtigt (Neher, 1992).

Unter visueller Kontrolle über das DIC-Bild auf dem Computerbildschirm wurde die Elektrodenspitze vorsichtig auf der Membran des Neurons positioniert, bis durch Auftreten einer Reflexion das Eindellen der Zellmembran angezeigt wurde. Daraufhin wurde der Überdruck entfernt und ein kleiner Unterdruck an die Elektrode angelegt. Als Folge davon wurde die unter der Elektrodenspitze befindliche Membran in die Elektrode gesogen, zu

erkennen durch einen sprunghaften Anstieg des Widerstandes auf mehrere Gigaohm (Giga-Seal). Eine leichte Steigerung des Unterdruckes bewirkte dann das Durchbrechen der Membran; dies zeigte sich nun in einem Abfall des Widerstandes und einer Zunahme der Membranspannung.

Alle Messungen wurden im Brückenmodus oder im diskontinuierlichen Strominjektionsmodus vorgenommen. Das Membranpotential der Neurone wurde während der Messungen durch Strominjektion auf -70 mV eingestellt. Die registrierten Signale wurden mit 10 kHz gefiltert, mit 5 kHz bis 10 kHz digitalisiert und zur späteren Auswertung aufgezeichnet. Datenannahme und Versuchssteuerung erfolgte mit Hilfe des Programms CellWorks (npi electronics, Tamm, Deutschland).

3.3.3 Applikation von Pharmaka

In manchen Experimenten wurden folgende Pharmaka verwendet:

- **Bicucullin** (10 μ M), GABA_A-Rezeptorantagonist
- **(2R)-Amino-5-Phosphonopentanoat** (D-AP-5 [20 μ M]), NMDA-Rezeptorantagonist
- **6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion** (CNQX [10 μ M]), AMPA- und Kainatrezzeptorantagonist
- **Tetrodotoxin** (TTX [0,25 μ M]), Blocker spannungsgesteuerter Natriumkanäle.

Von diesen Substanzen wurden Stammlösungen hergestellt, die bei -20°C gelagert waren. Alle Substanzen, bis auf CNQX, wurden in destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung von CNQX erfolgte in Dimethylsulfoxid (DMSO). Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Endkonzentration im Organbad (ACSF). Die Pharmaka wurden kurz vor der Applikation zur ACSF gegeben und über die Perfusion in das Organbad eingewaschen.

3.3.4 Auswertung der Daten

Als passive Membraneigenschaften wurden neuronaler Eingangswiderstand und Membranzeitkonstanten analysiert. Die Strom-Spannungsbeziehung wurde anhand einer IV-Kurve ermittelt.

Die Analyse des Entladungsverhaltens umfasste Messung der Amplitude und Dauer des Aktionspotentials, Bestimmung der Entladungsschwelle sowie der Entladungsfrequenz am Anfang und am Ende eines überschwelligen Strompulses.

Bei der Untersuchung des spontanen synaptischen Zustroms wurden Frequenz und Amplitudenverteilung der spontanen Ereignisse bestimmt. Zudem wurde die Kinetik der spontanen synaptischen Potentiale ermittelt. Als kinetische Parameter wurden herangezogen: Amplitude, Zeit zum Maximum der Amplitude, die Anstiegszeit (Zeit zwischen dem Durchschreiten der 10%- und 90%-Werte der Amplitude), die Zeitkonstante des Abfalls und die Fläche unter einem gemittelten Ereignis.

Die Daten wurden mit dem Programm Igor 6.0 (Wave Metrics, Portland, USA) ausgewertet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm Prism 3.03 (Graphpad Software Inc., Kalifornien, USA). Abhängig von der Datenlage wurden folgende Tests angewendet: Kruskal-Wallis-Test mit Post-Tests nach Dunn (passive Membraneigenschaften, Strom-Spannungsbeziehungen, Entladungsverhalten, synaptischer Zustrom), Friedmann-Test mit Post-Tests nach Dunn (Pharmakologie des synaptischen Zustroms) oder ein ungepaarter t-Test mit Welchs-Korrektur (Pharmakologie des synaptischen Zustroms). Alle Werte im Text des Abschnitts „**4.2 Elektrophysiologie**“ (siehe S. 69) geben Mittelwerte und Standardabweichungen an.

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistochemische Untersuchungen

4.1.1 Bestimmung des Geburtszeitpunktes der GIN

GABAerge Interneurone werden hauptsächlich in der ganglionären Eminenz generiert. Die verschiedenen Regionen der Eminenz produzieren verschiedene Arten von Interneuronen, die sich durch bestimmte Merkmale voneinander unterscheiden. Jedoch spielt nicht nur der Ort der Entstehung für diese Unterschiede eine Rolle, sondern auch der Zeitpunkt, zu dem ein Neuron während der embryonalen Neurogenese in der Eminenz geschaffen wird (Wonders und Anderson, 2006). Im Falle der GIN ist die Bestimmung des Geburtsdatums ein wichtiger Punkt, der Aufschluss darüber geben kann, wo die GIN in der Eminenz ihren Ursprung haben könnten und welche Migrationswege sie möglicherweise einschlagen. Somit ist der Geburtszeitraum dieser Neurone ein bedeutendes Indiz, von dem sich bestimmte Informationen über die embryonale Entwicklung der GIN ableiten lassen.

Um das Geburtsdatum dieser Neurone mit Hilfe der BrdU-Technik zu bestimmen, wurden mehrere Einzelverpaarungen von GIN-Mäusen angesetzt. Schwangere GIN-Mäuse, deren Schwangerschaftsbeginn (Plaque-Test) und damit das embryonale Alter des Nachwuchses bekannt war, wurden an den embryonalen Tagen E11, E13, E14, E15, E16, E17 mit BrdU behandelt. Vierzehn Tage nach der Geburt wurde das Gehirngewebe von je zwei Jungtieren pro Behandlungsdurchgang mit Antikörpern gegen GFP und BrdU gefärbt ($n = 2$ / embryonales Alter). Mittels konfokaler Mikroskopie konnten dann alle GIN, die BrdU in ihre DNA inkorporiert hatten, identifiziert werden. Aufgrund des Behandlungszeitpunktes konnte so auf das embryonale Alter geschlossen werden, zu dem diese Neurone von ihren Vorläuferzellen generiert wurden. Die Abbildung 4 zeigt Beispiele für entsprechende immunhistochemische Präparate.

Es wurden der cinguläre Cortex, der frontale Cortexbereich und der somatosensorische Cortex untersucht. Pro Versuchstier wurden in fünf Coronalschnitten je zwei Bereiche in den drei genannten Gebieten mikroskopisch analysiert (insgesamt also je 10 Bereiche aus cingulärem, frontalem und somatosensorischem Cortex pro Versuchstier). In diesen Bereichen wurden zunächst alle GFP-positiven Neurone ermittelt, danach alle GFP-positiven Zellen, die auch positiv für BrdU waren.

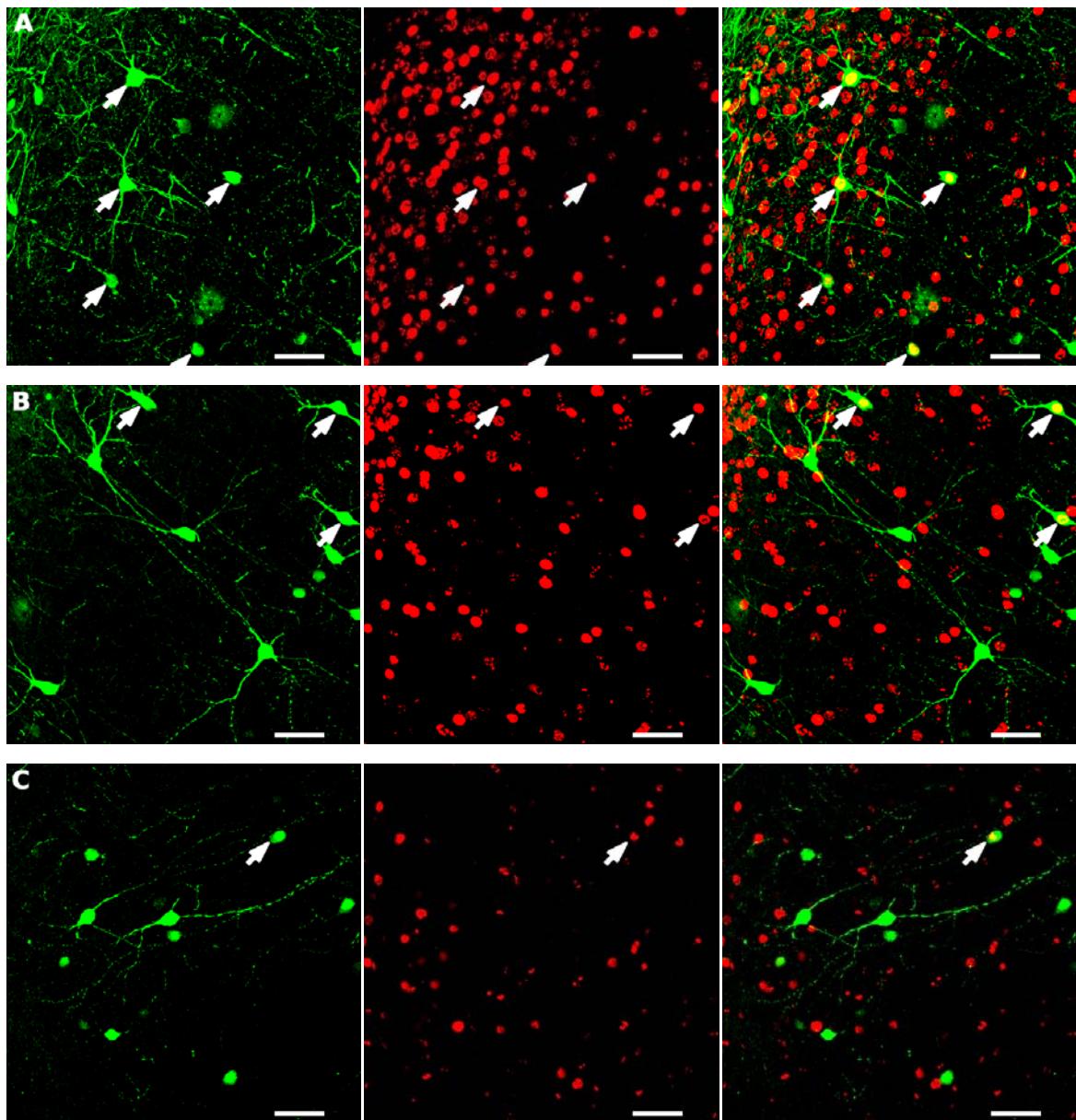


Abb. 4:

Immunfärbungen zur Geburtsdatenbestimmung der GIN.

In der Abbildung sind die Färbungen gegen GFP und BrdU in vierzehn Tage alten Tieren dargestellt, deren Muttertiere an den Tagen E14 (A), E16 (B) und E17 (C) mit BrdU behandelt wurden. Links sind die gegen GFP gefärbten GIN gezeigt (grün) und in der Mitte die Zellkerne, die mit einer Färbung gegen BrdU sichtbar gemacht wurden (rot). Rechts ist jeweils die Überlagerung des linken und des mittleren Bildes zu sehen (Überlagerungsfunktion von ImageJ). In GIN, die einen gefärbten Nucleus haben, erscheint der Zellkern auf Grund der optischen Überlagerung gelb. Die Pfeile markieren die am jeweils untersuchten Datum geborenen GIN (Maßbalken: 50µm).

Die Anzahl der BrdU-positiven GIN pro Cortexbereich wurde in ein prozentuales Verhältnis zur Gesamtzahl aller erfassten GIN in diesem Bereich gesetzt. Die Verhältnisse (BrdU^+ -GIN zu GIN insgesamt) wurden pro Alter und Tier getrennt ermittelt. Anhand der Ergebnisse aus den zwei Versuchstieren wurden dann pro Altersstufe aus allen erfassten Verhältnissen (cingulär, frontal und somatosensorisch) Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes

errechnet. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests mit Post-Tests nach Dunn. Die Abbildung 5 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse.

Die GIN wurden während des gesamten untersuchten embryonalen Zeitraums (E11 bis E17) generiert (Abb. 4/5). Allerdings stellte sich heraus, dass an den Tagen E13 ($32,9\% \pm 1,5$; $n = 678$), E14 ($32,1\% \pm 2,5$; $n = 874$) und E15 ($30,5\% \pm 2,4$; $n = 560$) der größte Teil dieser Zellen geboren wird. An den übrigen Tagen war das Verhältnis von GFP-/BrdU-positiven zu nur GFP-positiven Zellen wesentlich geringer. So waren bei E11 nur $4,3\% \pm 1,6$ ($n = 614$) der GIN positiv für BrdU, bei E16 nur $15,4\% \pm 1,8$ ($n = 761$) und bei E17 nur noch $0,94\% \pm 0,63$ ($n = 604$). Der Kruskal-Wallis-Test zeigte, dass signifikante Unterschiede bei den Verhältnissen der einzelnen Altersstufen vorhanden waren ($P < 0,0001$). Der Post-Test machte deutlich, dass E13, E14 und E15 von den restlichen Altersstufen signifikant verschieden waren.

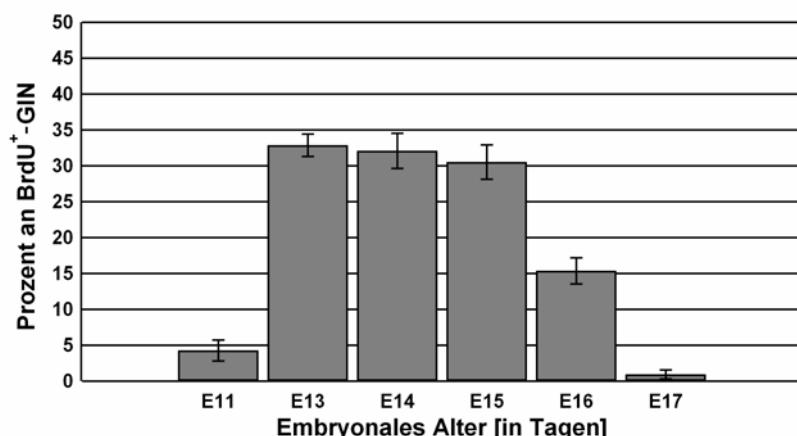


Abb. 5: Geburtsdatenprofil der GIN.
Die GIN werden über einen Zeitraum von sechs Tagen geboren (von E11 bis E17). Die meisten GIN entstehen an den embryonalen Tagen 13, 14 und 15. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) des Verhältnisses von $\text{GFP}^+/\text{BrdU}^+$ -Zellen zur Gesamtzahl an GFP^+ -Zellen ($n = 2$ Tiere pro Altersgruppe).

Dies zeigt, dass die GIN hauptsächlich zwischen E13 und E15 in der ganglionären Eminenz und anderen möglichen proliferativen Zonen generiert werden. Ein geringer Teil wird zu früheren oder zu späteren Zeitpunkten erzeugt. Die Produktion der GIN erstreckt sich also über mindestens sieben Tage. Sie beginnt um E11, zeigt einen Maximum zwischen E13 und E15 und nimmt bis E17 sukzessive ab.

Im cingulären Cortex treten bereits ab P2 fluoreszierende Neurone auf, während in den anderen Arealen diese Zellen erst ab ungefähr P5 zu beobachten sind (siehe **4.1.2 Gehirnkarten und die Entwicklung der Dichte an GIN**, S. 46). Aus diesem Grund wurde

untersucht, ob es auch bezüglich des Geburtszeitpunktes der GIN regionsspezifische Unterschiede gibt. Die Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse.

Sowohl im cingulären als auch im sensomotorischen Cortex sind GIN zu finden, die zwischen E11 und E17 geboren wurden (Tab. 2). Allerdings zeigt sich, dass sich die Zeiträume, in denen die meisten Neurone für die beiden Regionen produziert werden, unterscheiden. Im Vergleich zum sensomotorischen Cortex, bei dem die Periode maximaler Neurogenese zwischen E13 und E15 liegt, ist diese Periode im cingulären Cortex offenbar einen Tag kürzer (Abb. 6). Mit einem t-Test wurden bei jedem embryonalen Alter die jeweiligen Werte aus dem cingulären und aus dem sensomotorischen Cortex statistisch verglichen. Es zeigte sich, dass sich diese Werte am Zeitpunkt E15 signifikant voneinander unterscheiden ($P < 0,0001$). Alle anderen Vergleiche (E11, E14, E16, E17) ergaben keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$). Des Weiteren wurden die Daten von cingulärem und sensomotorischem Cortex jeweils mit einem Kruskal-Wallis-Test (Post-Test nach Dunn) untersucht, um die Ergebnisse aus den beiden Regionen statistisch zu überprüfen. Dabei stellte sich heraus, dass ein signifikanter Unterschied der Daten vorhanden war (cingulär und sensomotorisch: $P < 0,0001$). Für den sensomotorischen Bereich zeigte der Post-Test das gleiche Ergebnis wie bei den zusammengefassten Daten oben, also einen signifikanten Unterschied der Daten von E13, E14 und E15 von den übrigen (E11, E16, E17). Für den cingulären Cortex zeigte der Post-Test, dass sich E13 signifikant von allen Altern außer E14 unterschied und E14 ebenfalls signifikant verschieden von allen Altern außer E13 war.

Die Generation der GIN für den cingulären und sensomotorischen Cortex erstreckt sich also über den gleichen Zeitraum, wobei die Neurone für den cingulären Cortex hauptsächlich in einem Zeitfenster von zwei Tagen (E13/E14) produziert werden. Diese Periode erstreckt sich bei den Neuronen des sensomotorischen Cortex über drei Tage (E13 bis E15).

Tab. 2: Prozentualer Anteil an BrdU⁺-GIN im cingulären und sensomotorischen Cortex der Maus.

Pränataler Tag	Cingulärer Cortex		Sensomotorischer Cortex	
	n	BrdU ⁺ -GIN	n	BrdU ⁺ -GIN
11	154	3,59% ± 1,54	460	4,50% ± 1,87
13	218	36,33% ± 4,23	460	32,13% ± 1,20
14	391	33,39% ± 3,90	483	31,92% ± 3,24
15	159	16,40% ± 2,90	401	36,82% ± 2,46
16	296	15,02% ± 1,69	465	15,46% ± 2,60
17	198	0,63% ± 0,62	406	1,38% ± 0,92

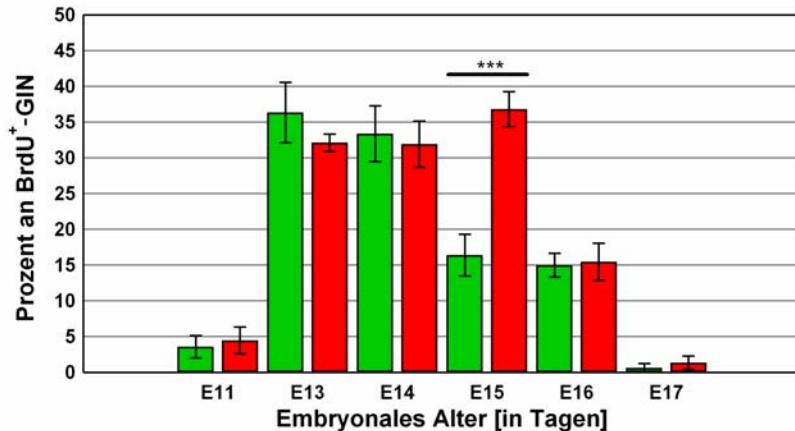


Abb. 6:

Regionsabhängige Unterschiede des Geburtszeitpunktes der GIN.

Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) des Verhältnisses von $\text{GFP}^+/\text{BrdU}^+$ -positiven Zellen zur Gesamtzahl an GFP^+ -Zellen ($n = 2$ Tiere pro Altersgruppe). Die grünen Säulen entsprechen den Werten aus dem cingulären, die roten Säulen denen aus dem sensomotorischen Cortex. Nur die Werte an E15 sind signifikant verschieden (cingulärer Cortex vs. sensomotorischer Cortex: t-Test, $P < 0,0001$). Ein Kruskal-Wallis-Test mit Post-Test nach Dunn zeigte, dass im cingulären Cortex (grün) die Werte von E14 und E15 signifikant verschieden sind ($P < 0,05$), im sensomotorischen Cortex diese Werte (E14 und E15) allerdings nicht signifikant verschieden sind ($P > 0,05$).

4.1.2

Gehirnkarten und die Entwicklung der Dichte an GIN

Schon während der embryonalen Entwicklung beginnen Neurone und ihre Vorläuferzellen von ihren Entstehungsorten aus (z.B. corticale Ventrikulärzone und ganglionäre Eminenz) in Richtung ihrer Zielgebiete zu wandern. Dort angekommen, verteilen sie sich und nehmen ihre endgültigen Positionen ein. Die GIN stammen sehr wahrscheinlich aus der ganglionären Eminenz. Da diese Zellen so modifiziert wurden, dass sie mit Beginn der GABA-Produktion GFP exprimieren, ist ihr Erscheinen im Neocortex einfach zu verfolgen. Die Überprüfung, wann und in welcher Dichte sie im Neocortex erscheinen, ist ein guter Maßstab für ihre Einwanderung und Verteilung. Dazu wurden Gehirnkarten verschiedener postnataler Altersstufen angefertigt und die Dichte der GIN in den unterschiedlichen Cortexarealen altersabhängig ermittelt.

4.1.2.1

Bestimmung der GIN-Dichte

Für eine Abschätzung der Dichte an GIN während verschiedener Phasen der postnatalen Entwicklung wurden Mäuse unterschiedlicher Altersstufen (P2, P3, P7, P10, P15, P20 und P25) untersucht. Von je zwei Tieren pro Altersstufe wurden fünf coronale Hirnschnitte im Bereich des sensomotorischen Cortex angefertigt und GFP mit einem spezifischen

Fluochrom-gekoppelten Antikörper markiert. Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie wurden in jedem Einzelbild in einem Quadrat mit der Seitenlänge von 356 μm (entspricht einer Fläche von $126,74 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) alle GIN gezählt. Da sich der Z-Stapel aus 30 Bildern, die mit einem Ebenenabstand von 1 μm aufgenommen wurden, zusammensetzte, berechnet sich das untersuchte Gewebevolumen wie folgt: $3,68 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ (wird im Folgenden als Volumeneinheit bezeichnet). Pro Altersstufe wurden aus den Zahlen beider Versuchstiere ein Mittelwert und der Standardfehler errechnet.

Das Auftreten der GIN während der postnatalen Entwicklung des Neocortex war in der Tat zeitlich gestaffelt (Abb. 7). Bei P2/P3 wurden im sensomotorischen Cortex keine GFP-positiven Zellen gefunden. Ab P7 waren die ersten GIN in geringer Anzahl nachweisbar ($8 \text{ Zellen} \pm 1 \text{ pro Volumeneinheit}; n = 83$). Am zehnten postnatalen Tag wurde eine Dichte erreicht ($24 \text{ Zellen} \pm 1 \text{ pro Volumeneinheit}; n = 240$), die sich dann im weiteren Verlauf der Entwicklung nicht mehr veränderte. Die Mittelwerte der Tage P10, P15, P20 und P25 sind statistisch voneinander nicht verschieden (Kruskal-Wallis-Test mit Post-Test nach Dunn, $P > 0,05$). Die Werte der Altersgruppe P7 waren dagegen signifikant kleiner als die der anderen Altersstufen ($P < 0,05$). Diese Ergebnisse zeigen, dass vor P3 keine GIN im sensomotorischen Cortex vorhanden sind. Die GABA- bzw. GFP-Expression beginnt zwischen P3 und P7 und erreicht nach P10, also innerhalb von drei Tagen, ihr Maximum.

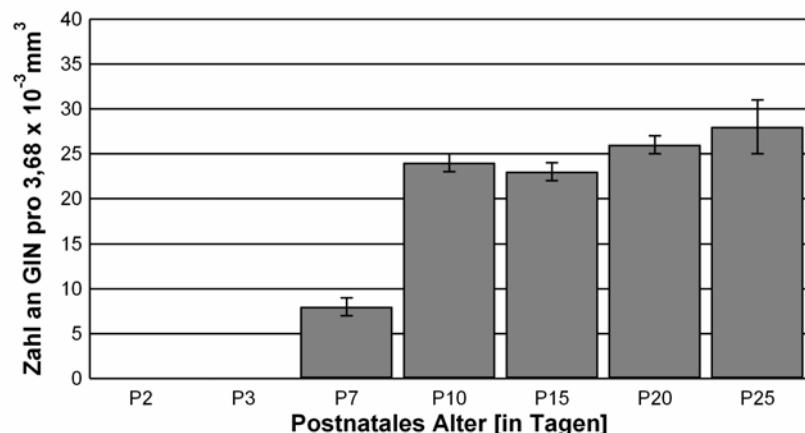


Abb. 7: Veränderung der Dichte an GIN während der postnatalen Entwicklung des sensomotorischen Cortex. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler ($n = 2$ Tiere pro Altersstufe). Während der ersten drei Tage nach der Geburt sind in diesem Gebiet des Neocortex keine GIN nachweisbar. Erst zwischen P3 und P7 erscheinen die ersten GFP-positiven Zellen und erreichen dann innerhalb von einer Woche ein konstantes Niveau.

4.1.2.2 Gehirnkarten

Die Gehirnkarten in Abbildung 8 zeigen die Verteilung der GFP-positiven Neurone zu unterschiedlichen Zeitpunkten (P3, P7, P10, P15, P20, P25) der postnatalen Entwicklung des Gehirns der Maus. Um einen besseren Überblick zu bekommen, wurden die Karten anhand von horizontalen statt coronalen Schnitten angefertigt. Die Horizontalschnitte wurden in der Reihenfolge von dorsal nach ventral in mehreren überlappenden Einzelbildern aufgenommen und dann mit Hilfe des Computers (Programm: PhotoshopCS, Adobe Systems Inc., Kalifornien, USA) zusammengesetzt.

Bei der qualitativen Überprüfung der Hirnkarten fällt auf, dass die GIN zu sehr unterschiedlichen Zeitpunkten in den verschiedenen Cortexarealen auftreten. Während in den sensomotorischen Cortexbereichen bei P2 und P3 noch keine GIN zu finden sind, kann man an diesen postnatalen Tagen im cingulären Cortex und in einigen Bereichen des entorhinalen Cortex bereits GFP-positive Zellen nachweisen. Auch im Hippocampus, der im adulten Stadium eine hohe Dichte an GIN aufweist (Olivia et al., 2000), sind bei P2 und P3 noch keine dieser Neurone vorhanden (Abb. 8A).

Ab P7 sind auch in den sensomotorischen Cortexbereichen GIN vorhanden, während im Hippocampus weiterhin keine GFP-positiven Zellen nachweisbar sind. Ab dem zehnten postnatalen Tag findet man die GIN in allen Teilen des Neocortex und im Hippocampus (Abb. 8B und C). Die ersten GIN erscheinen also im cingulären und entorhinalen Cortex. Sie sind dort ab P2 vorhanden, während die sensomotorischen Cortexbereiche erst zwischen P4 und P10 von den GIN bevölkert werden.

Die Analyse der GIN-Dichte als auch die Erstellung der Gehirnkarten zeigen, dass das Auftreten von GIN im Neocortex arealspezifisch zeitabhängig ist. Die phänotypische Differenzierung der GIN erfolgt in manchen Cortexarealen (cingulär und entorhinal) während der ersten, in anderen (sensomotorischer Bereich) in der zweiten postnatalen Woche.

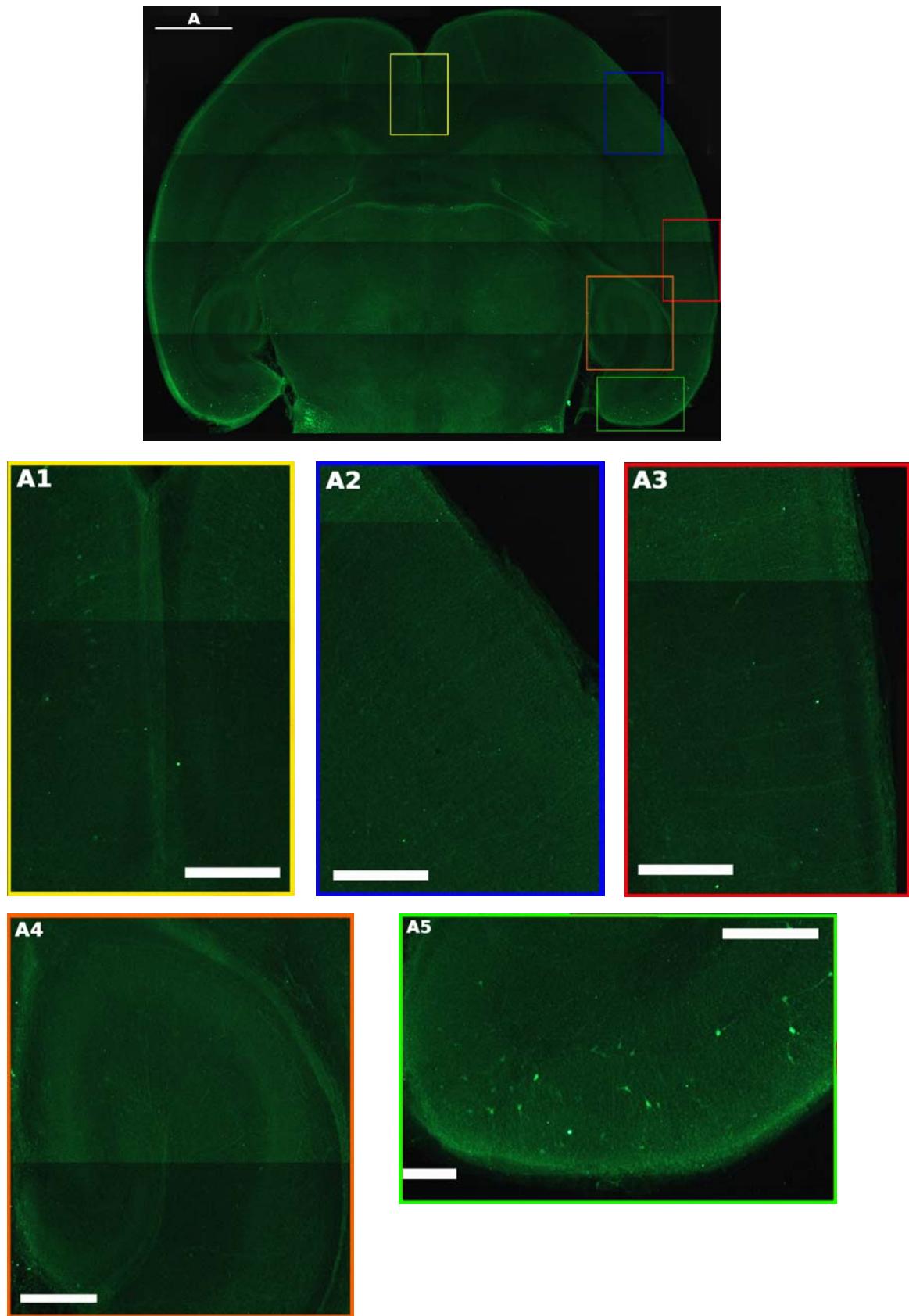


Abb. 8A: Gehirnschnitt P2 (Legende auf Seite 52)

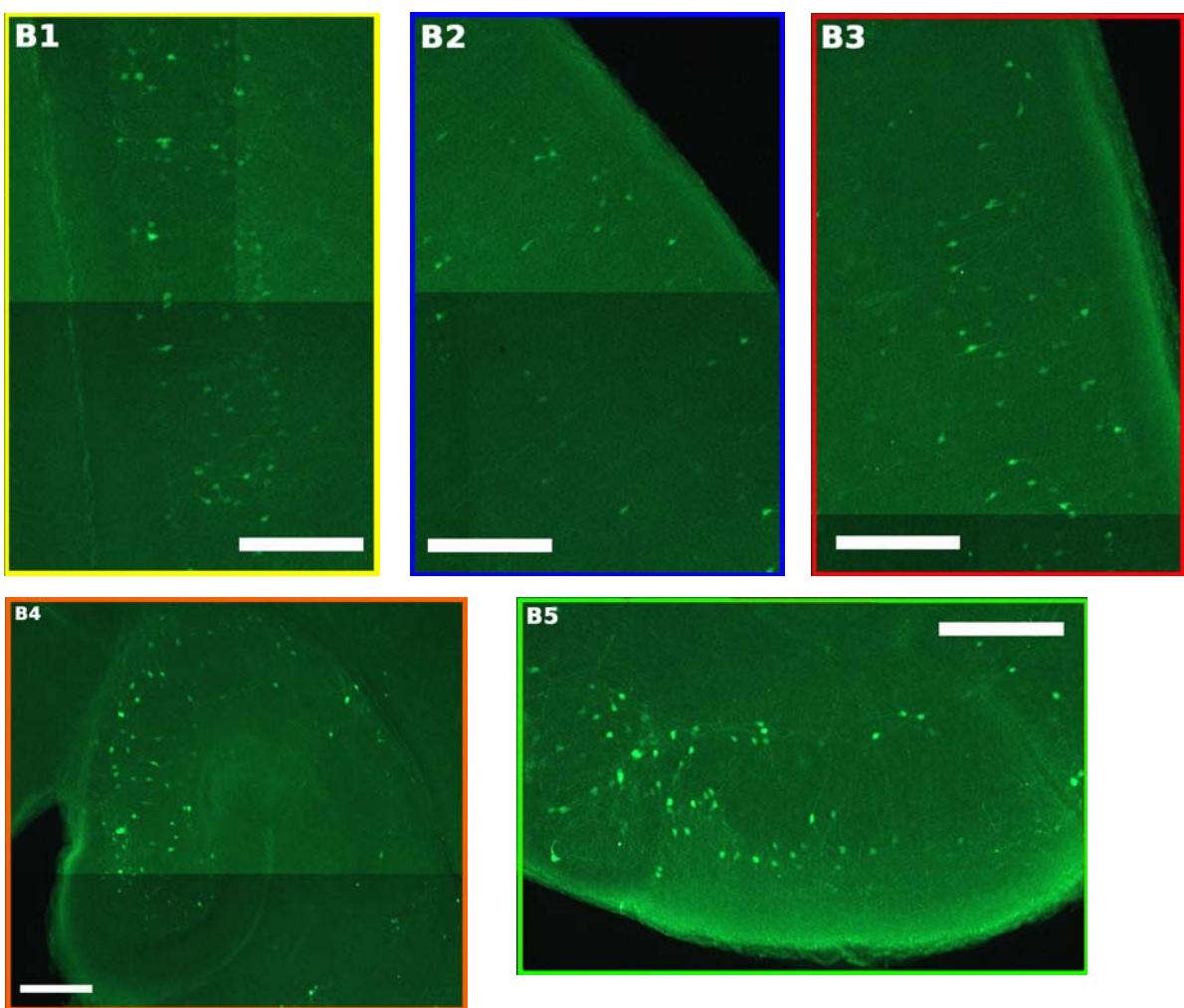
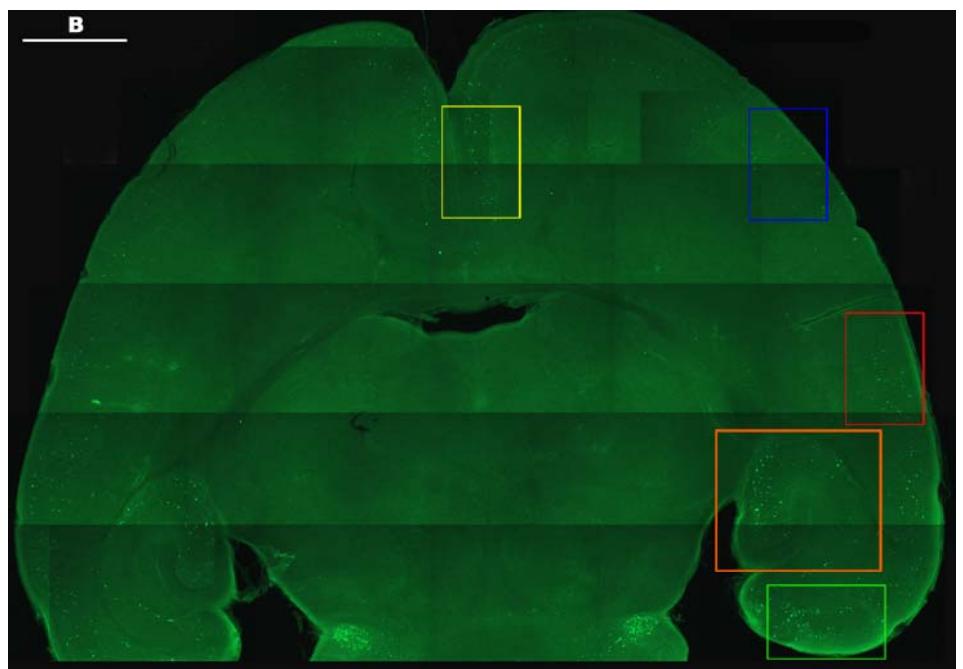


Abb. 8B: Gehirnschnitt P10 (Legende auf Seite 52)

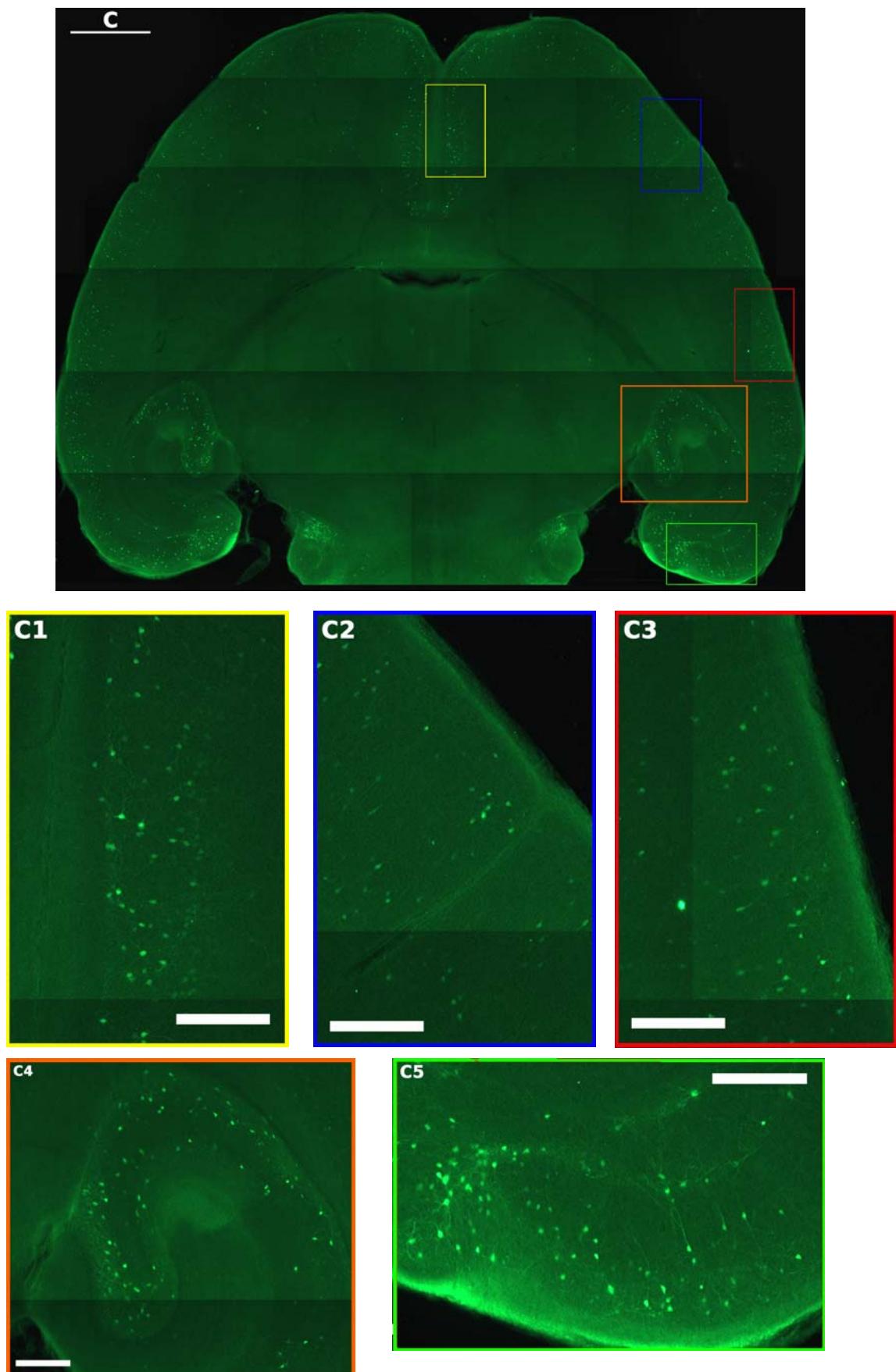


Abb. 8C: Gehirnschnitt P25 (Legende auf Seite 52)

Abb. 8: Horizontalschnitte durch das Gehirn einer GIN-Maus.

Die Abbildungen A) bis C) zeigen jeweils einen horizontalen Gehirnschnitt, hergestellt von Mäusen verschiedener postnataler Altersstufen. Die Schnitte stammen aus dem caudalen Anteil des Gehirns und wurden auf Höhe des dritten Ventrikels (Aussparung in der Mitte des Gesamtausschnittes) entnommen. Diese Bereiche wurden ausgewählt, weil in ihnen alle wichtigen Bereiche, in denen die GIN im Cortex vorkommen, zu sehen sind. Zudem ist anhand dieser Schnitte das zeitliche und räumliche Auftreten der GIN gut zu erkennen. Die Ausschnitte stellen jeweils eine Region des Cortex dar, deren Positionen im Gesamtbild des Cortex farblich codiert wurden (gelb = cingulärer Cortex, blau = frontaler Cortexbereich, rot = somatosensorischer Cortex, grün = entorhinaler Cortex, orange = Hippocampus). Die Maßbalken in den Übersichtsbildern entsprechen 1000 µm, die der Ausschnitte 250 µm.

Abb. 8A: Im postnatalen Alter von zwei Tagen sind im Neocortex kaum GIN zu entdecken. Lediglich im cingulären (A1) und im entorhinalen (A5) Cortex sind diese Neurone bereits vorhanden. Der frontale (A2) und der somatosensorische Cortex (A3) sowie der Hippocampus (A4) sind frei von diesen Zellen.

Abb. 8B: Ab dem postnatalen Tag zehn sind in allen Bereichen des Cortex und im Hippocampus GIN zu beobachten. Im cingulären (B1) und im entorhinalen (B5) Cortex ist eine höhere Zelldichte zu erkennen, der Hippocampus ist ebenfalls dicht mit GIN gefüllt, jedoch nur im medialen Teil (B4). Im lateralen Teil sind noch keine GIN nachweisbar. Im sensomotorischen Cortex (B2 / B3) ist ab dem Tag P10 die GIN-Population fast vollständig.

Abb. 8C: Das Bild am 25. Tag nach der Geburt ähnelt dem an P10. Es hat den Anschein, dass die Zelldichte sich im Vergleich zu P10 im cingulären Cortex und im Hippocampus erhöht hat (C1/C4). Allerdings wurde dies nicht quantitativ ausgewertet. Für den sensomotorischen Cortexbereich gilt, dass sich die Anzahl zwischen P10 und P25 nicht signifikant verändert (C2 / C3).

4.1.3 Postnatale Entwicklung der Somatostatin- und Calretininexpression im Neocortex von GIN-Mäusen

Bei vielen GABAergen Interneuronen dienen spezifische, in diesen Zellen exprimierte Proteine und Peptide als Markermoleküle. In den GIN wurden das Neuropeptid Somatostatin und das Calcium-bindende Protein Calretinin nachgewiesen (Halabisky et al., 2006, Xu et al., 2006). Der Zeitverlauf der Expression dieser beiden Marker während der frühen postnatalen Entwicklung ist allerdings unbekannt. Deshalb wurde mittels immunhistochemischer Methoden die postnatale Entwicklung der Expression von SST und CR in GIN analysiert.

Bei den postnatalen Altersstufen P2, P3, P7, P10, P15, P20 und P25 wurden mit fluochrom-gekoppelten Antikörpern gegen GFP, SST und CR immunhistochemische Präparate angefertigt und die Anzahl der markierten Zellen mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops bestimmt. Von jedem Tier wurden zunächst coronale Gehirnschnitte (Dicke: 50 µm) hergestellt. Die Schnitte wurden dann entweder mit einer Kombination aus GFP- und SST-Antikörpern oder GFP- und CR-Antikörpern behandelt. Pro Versuchstier wurden fünf Schnitte ausgewählt. In jedem Schnitt wurden im frontalen, im somatosensorischen und im cingulären Cortex jeweils zwei Bereiche der Fläche $169,9 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ (entspricht einem

Rechteck mit den Maßen 480 μm x 354 μm) festgelegt und je zwei mikroskopische Aufnahmen gemacht. Die eine Aufnahme erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (GFP), die andere bei 550 nm (SST bzw. CR). Beide Bilder wurden digital registriert, im TIFF-Format abgespeichert und danach mit dem Programm ImageJ ausgewertet.

Zur Bestimmung der Kolokalisation des GFP-Signals mit dem SST- bzw. CR-Signal wurden die digitalen Bilder optisch überlagert. Im ersten Schritt wurde die Gesamtzahl an GFP-positiven Zellen pro Fläche ($169,9 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) bestimmt und dann, im gleichen Areal, die Zahl an doppelt markierten Neuronen. Auf diese Weise ergaben sich pro Tier 30 Verhältniswerte (Gesamt-GFP zu GFP- / SST-positiv bzw. Gesamt-GFP zu GFP- / CR-positiv). Von jeder Altersstufe wurden zwei Tiere auf die beschriebene Art untersucht und die Verhältniswerte zu einem Mittelwert (\pm Standardfehler des Mittelwertes) zusammengefasst. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests (Post-Tests nach Dunn).

4.1.3.1 Somatostatin

Vor dem postnatalen Tag 7 konnte der Marker Somatostatin im sensomotorischen Cortex nicht nachgewiesen werden. Zumindest fand sich keine SST-Antikörpermarkierung an den Tagen P2 und P3 (Abb. 9 und Abb. 10B). Aber auch bei P7 lag der Anteil der doppelt markierten Neurone nur bei 11%, ($11,9\% \pm 2,6$; $n = 192$). Während der nächsten drei Entwicklungstage kam es zu einem starken Anstieg des Anteils an GFP- und SST-markierten Zellen (P10: $45,7\% \pm 3,4$; $n = 234$) und ab P15 ($69,1\% \pm 2,3$; $n = 301$) war offenbar das maximale Expressionsniveau erreicht. Die Werte bei P20 ($73,4\% \pm 3,5$; $n = 273$) und P25 ($71,5\% \pm 2,9$; $n = 278$) waren statistisch nicht signifikant verschieden von dem Wert des Tages P15 ($P > 0,05$, Abb. 9 und 10B). Die Altersstufen P7 und P10 wiesen untereinander und zu den Altersstufen P15, P20 und P25 signifikante Unterschiede auf ($P < 0,01$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die SST-Expression in GIN des sensomotorischen Cortex im Verlauf des zweiten Teils der ersten Entwicklungswoche beginnt, dann relativ schnell zunimmt und bereits zum Ende der zweiten Entwicklungswoche ein Niveau erreicht, das für ausgereifte GIN typisch ist.

Im cingulären Cortex findet eine ähnliche Entwicklung statt (Abb. 10A). Die adulten Werte an GFP-positiven Neuronen sind in etwa dieselben wie im sensomotorischen Cortex. Die maximale Expression an SST war bereits an P15 ($70,9\% \pm 3,3$; $n = 177$) erreicht. Das Peptid war ebenfalls ab P7 ($8,7\% \pm 3,2$; $n = 99$) nachweisbar und steigerte seine Expression

über P10 ($53,5\% \pm 3,0$; $n = 140$) hin zu den adulten Werten bei P20 ($69,5\% \pm 5,5$; $n = 145$) und P25 ($68,5\% \pm 4,7$; $n = 135$). Die Expressionslevel bei P10 lagen etwas höher als im sensomotorischen Cortex. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte, dass, ähnlich zum sensomotorischen Cortex, die Werte an P7 signifikant verschieden zu den Werten an P10 bis P25 waren ($P < 0,0001$). Nach P10 lassen sich allerdings keine Signifikanzen mehr nachweisen ($P > 0,05$). Dies könnte bedeuten, dass im cingulären Cortex die Expressionsentwicklung von SST ähnlich schnell abläuft wie im sensomotorischen Cortex, und bereits Ende der zweiten postnatalen Woche ungefähr adulte Werte erreicht hat.

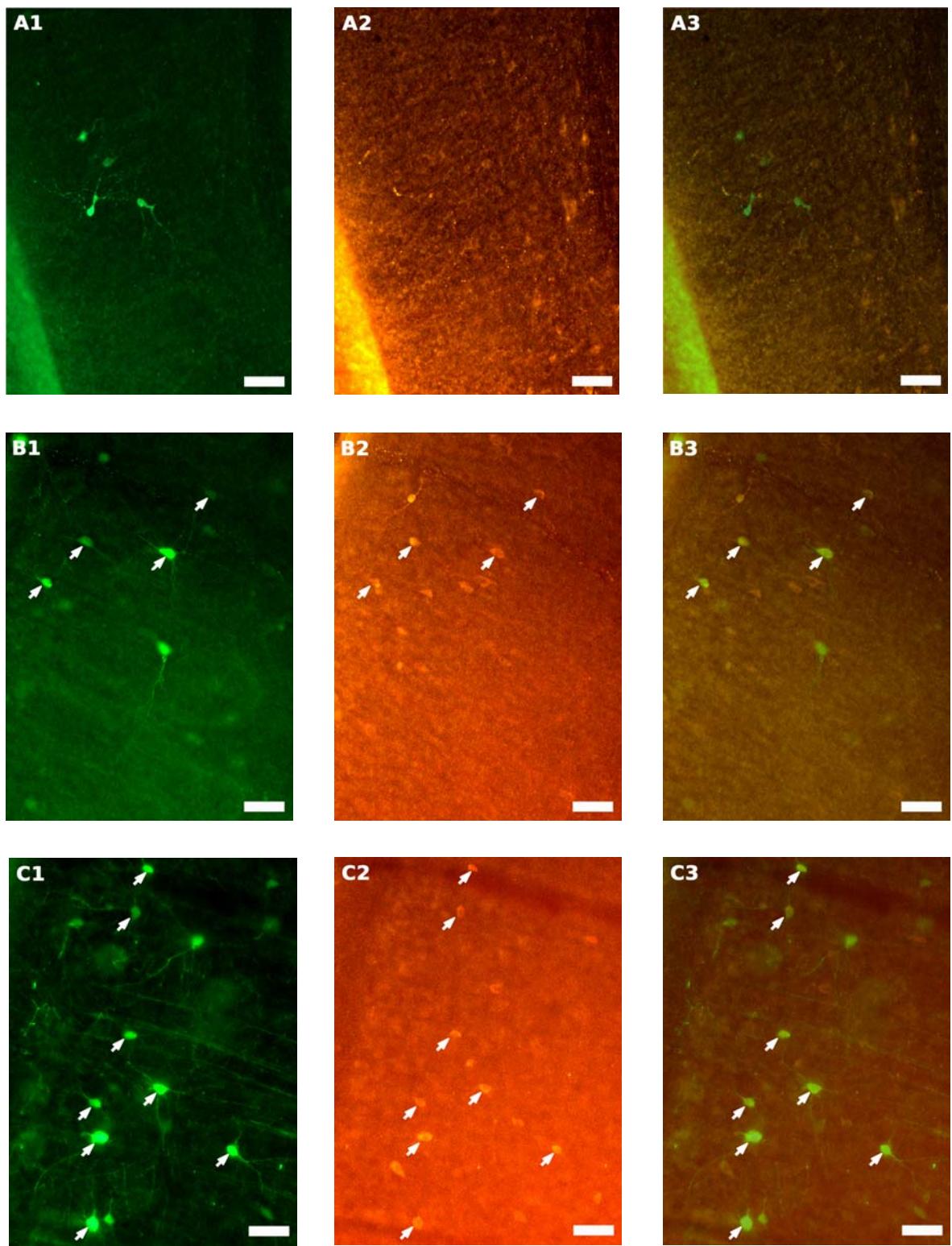


Abb. 9: Immunfärbungen zur Bestimmung der postnatalen Entwicklung der Expression von Somatostatin in GFP-positiven Zellen des sensomotorischen Cortex von GIN-Mäusen.
 A: P2; B: P10; C: P25. A1 - C1: GFP-Immunfärbung; A2 - C2: SST-Immunfärbung, A3 - C3: optische Überlagerung beider Färbungen (Maßstab = 50 μ m).

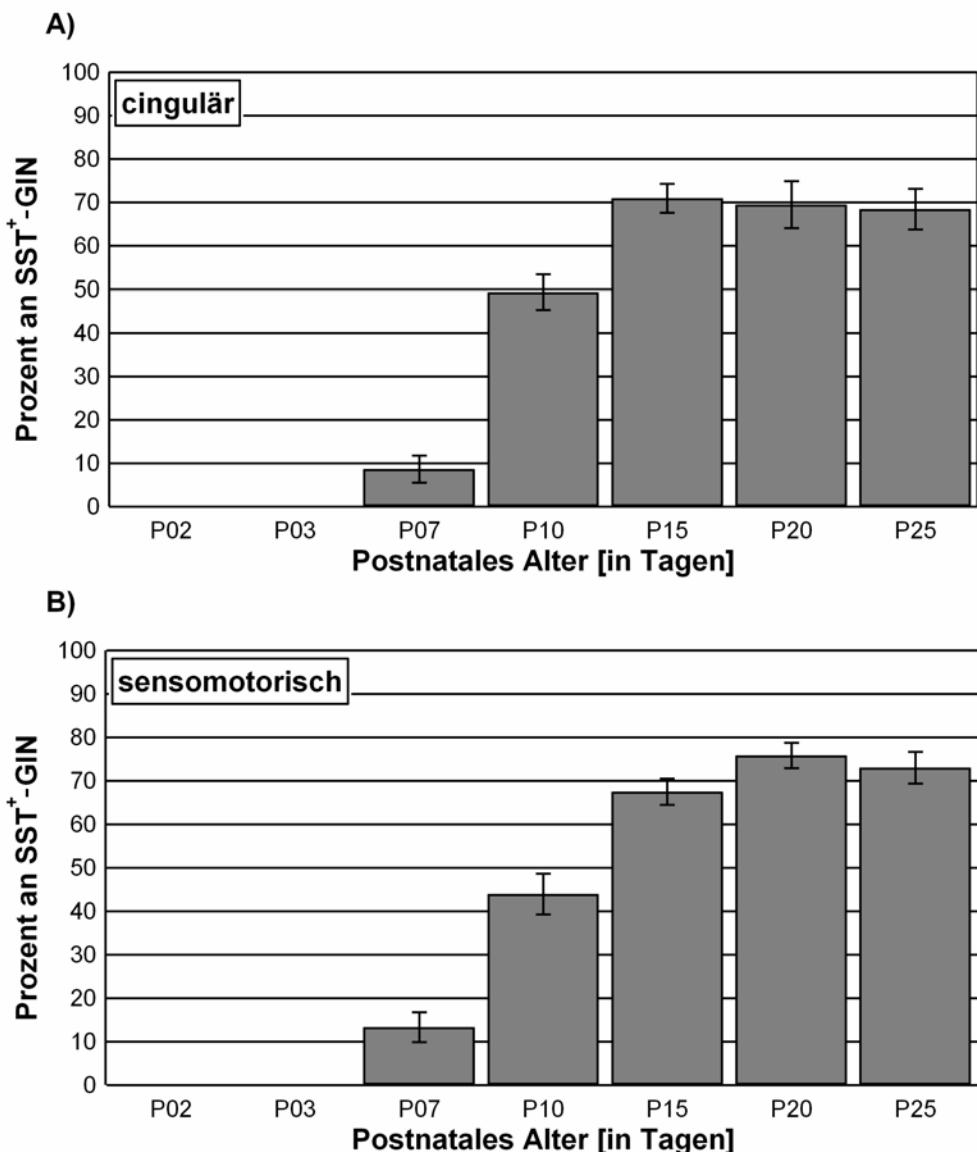


Abb. 10: Postnatale Entwicklung der Somatostatinexpression in GIN des cingulären (A) und des sensomotorischen (B) Cortex der Maus. Die Diagramme zeigen den Anteil an GFP- und SST-markierten Neuronen an der Gesamtpopulation der GFP-positiven Zellen (Mittelwerte \pm SEM; n = 2 Tiere pro Altersstufe).

4.1.3.2 Calretinin

Die postnatale Entwicklung der Expression des Calcium-bindenden Proteins CR zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die von SST, wobei die Expressionsniveaus wesentlich geringer sind als die von SST. An den Tagen P2 und P3 findet man in den GFP-positiven Zellen des sensomotorischen Cortex keine Doppelmarkierung. Erst ab P7 sind wenige Neurone zu erkennen, die CR exprimieren ($7,0\% \pm 1,5$; n = 242). Die weitere Entwicklung verläuft nun deutlich langsamer als im Falle von SST. Am Tag P10 sind $25,9\% \pm 2,0$ (n = 255) der GIN positiv für CR und ab P15 $20,2\% \pm 1,9$ (n = 339). Erst ab P20 scheint die Zunahme der CR-

Expression in GIN abgeschlossen zu sein (P20: $29,2\% \pm 2,1$; n = 419; P25: $35,9\% \pm 2,6$; n = 314) (Abb. 11 und 12B).

Bei der statistischen Analyse (Kruskal-Wallis-Test) zeigte sich, dass sich die Mittelwerte an P7, P15, P20 und P25 signifikant unterscheiden ($P < 0,001$). Für P10 zeigen sich ebenfalls noch signifikante Unterschiede zu P20 und P25 ($P < 0,01$); zudem ist P15 signifikant unterschiedlich zu P25 ($P < 0,01$). Ab P20 sind keine Signifikanzen mehr zu finden ($P > 0,05$).

Entsprechend dieser Ergebnisse startet die CR-Expression in GIN des sensomotorischen Cortex während der postnatalen Entwicklung etwa zum gleichen Zeitpunkt wie die von SST, dauert aber etwas länger (ca. drei Wochen). Zudem liegen die maximalen Expressionsniveaus von CR deutlich unter denen von SST.

Im cingulären Cortex zeigt sich eine ähnliche Entwicklung der CR-Expression (Abb. 12A). Auch hier liegen die adulten Werte deutlich unter denen von SST. Die Expression des Calcium-bindenden Proteins ist ab P7 ($5,1\% \pm 1,8$; n = 125) nachweisbar und die Expressionsniveaus steigern sich danach auf adulte Werte (P15: $22,2\% \pm 3,0$; n = 164; P20: $31,5\% \pm 3,6$; n = 206; P25: $29,2\% \pm 4,2$; n = 163). Jedoch zeigte sich hier (Kruskal-Wallis-Test, $P < 0,0001$), dass die Werte bereits ab P10 ($20,5\% \pm 2,2$; n = 135) nicht mehr signifikant verschieden voneinander waren und dass nur P7 diese Unterschiede zu den Werten der Altersstufen von P10 bis P25 aufwies. Somit zeigt sich, dass die Entwicklung der CR-Expression im cingulären Cortex bereits ab Mitte der zweiten Woche in der Endphase angelangt ist und somit schneller als im sensomotorischen Cortex abläuft.

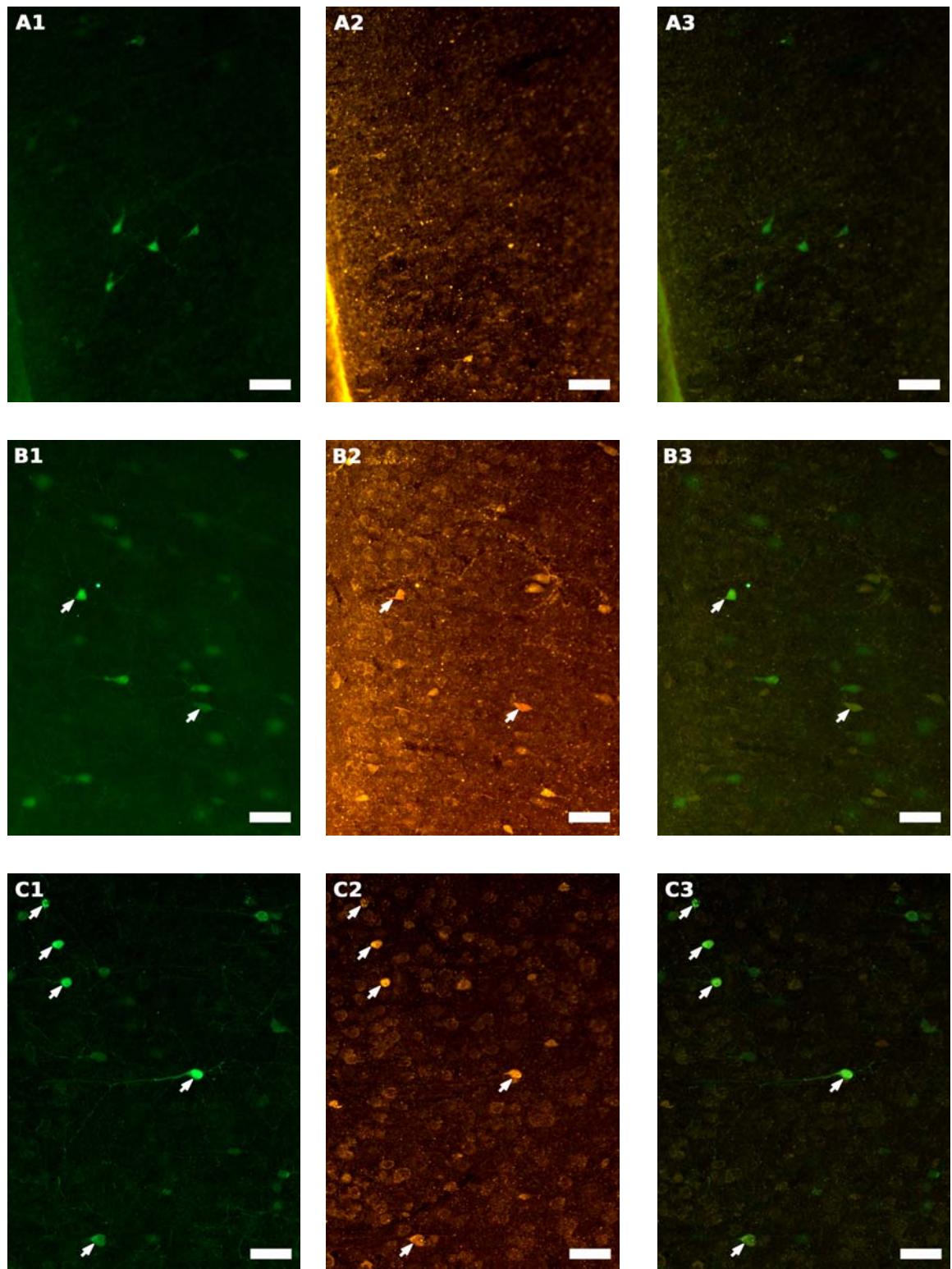


Abb. 11: Immunfärbungen zur Bestimmung der postnatalen Entwicklung der Expression von Calretinin in GFP-positiven Zellen des sensomotorischen Cortex von GIN-Mäusen. A: P2; B: P10; C: P25. A1 - C1: GFP-Immunfärbung; A2 - C2: CR-Immunfärbung, A3 - C3: optische Überlagerung beider Färbungen (Maßstab = 50 µm).

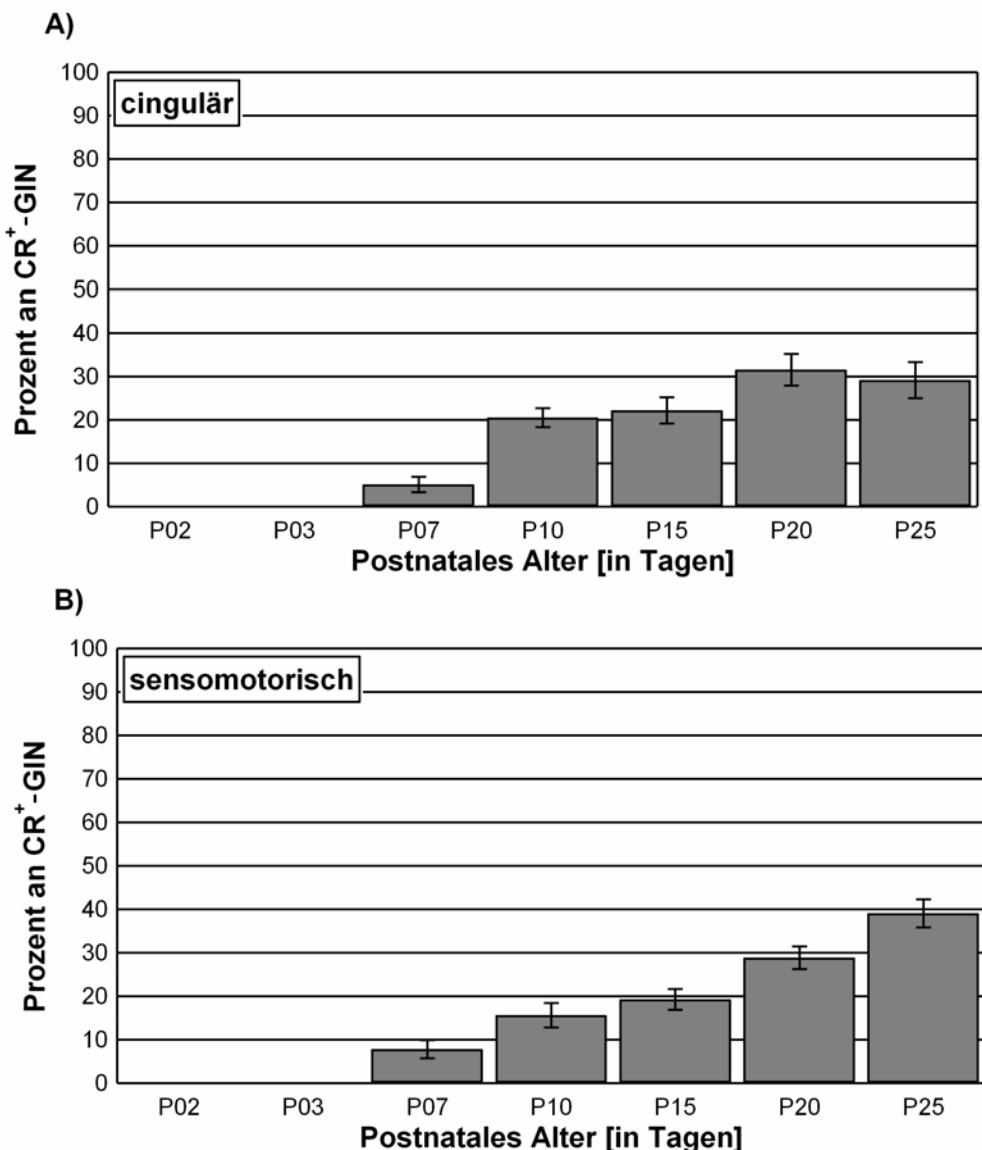


Abb. 12: Postnatale Entwicklung der Calretininexpression in GIN des cingulären (A) und des sensomotorischen (B) Cortex der Maus. Die Diagramme zeigen den Anteil an GFP- und CR-markierten Neuronen an der Gesamtpopulation der GFP-positiven Zellen (Mittelwerte \pm SEM; n = 2 Tiere pro Altersstufe).

4.1.4 Morphologische Entwicklung von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus

Bei den GABAergen Interneuronen lassen sich mehrere morphologische Gruppen unterscheiden. Die Kriterien zur Klassifizierung sind normalerweise die Form des Somas, die Ausprägung des Dendritenbaumes und die des Axons. In dieser Arbeit wurde die postnatale Entwicklung der Morphologie der GIN untersucht. Ein weiterer, wichtiger Aspekt dieser Versuchsreihe war festzustellen, ob die adulten GIN alle zu einer einzigen morphologischen Gruppe gehören, oder ob sie in dieser Hinsicht heterogen sind. Darüber hinaus bestimmt die

Morphologie eines Neurons (z.B. die Form des Dendritenbaumes) seine elektrophysiologischen Eigenschaften (Routh et al., 2009). Um diese Eigenschaften beurteilen zu können, ist deshalb die Kenntnis der Morphologie notwendig.

Zur histologischen Darstellung der GIN wurde während elektrophysiologischer Ableitungen das Markermolekül Biocytin per Mikroiontophorese in die Neurone injiziert. Dazu wurde Biocytin (0,5%) der Pipettenlösung zugesetzt und mit depolarisierenden Strompulsen (1 nA, 800 ms, 1 Hz, für 30 Minuten) intrazellulär appliziert. Nach der Injektion wurde die Pipette vorsichtig abgezogen, die Gehirnschnitte für eine Stunde in normaler ACSF inkubiert und dann fixiert. Der Nachweis des Biocytins erfolgte mit einem fluochromgekoppelten Antikörper. Mit einem konfokalen Mikroskop wurden die befüllten Neurone eines Präparates dargestellt und von jedem Neuron Bildstapel (Z-Stapel, Bildabstand: 0,5 μm) angefertigt, wobei von jeder Einzelaufnahme überlappende Bereiche aufgenommen wurden. Die digitalisierten Bilddaten wurden im TIFF-Format gespeichert und zu einem zweidimensionalen Gesamtbild zusammengesetzt. Diese Rekonstruktion erfolgte an je fünf GFP-positiven Zellen der drei Altersgruppen P6 bis P8, P10 bis P14 und P18 bis P21. Die Abbildungen 13 bis 15 zeigen Beispiele für rekonstruierte GIN verschiedener Altersstufen.

Für eine Shollanalyse (Sholl, 1953) wurden um eine solche rekonstruierte Zelle mehrere konzentrische Kreise gezogen (Abb. 16, S.63). Ihren Mittelpunkt hatten diese Kreise ungefähr im Zentrum des Somas. Der Radius des innersten Kreises betrug 25 μm , bei allen weiteren Kreisen wurde der Radius um weitere 25 μm vergrößert. Zunächst wurden pro Kreis die Schnittpunkte mit den Fortsätzen eines GIN gezählt (keine Unterscheidung nach Dendrit und Axon), die mittlere Summe aller Schnittpunkte pro Neuron in einer Altersgruppe bestimmt und in einem Diagramm als Funktion des Entwicklungsalters dargestellt (Abb. 17, S. 63). Im zweiten Schritt wurde die Anzahl der Schnittpunkte pro Radius ermittelt und der Mittelwert gegen den zugehörigen Radius in einem Diagramm aufgetragen (Abb. 18, S. 64). Zuletzt wurde die Neuriten-Fläche des Neurons abgeschätzt, indem die Fläche desjenigen Kreises berechnet wurde, der noch mindestens fünf Schnittpunkte mit Neuriten aufwies (Abb. 19, S. 65).

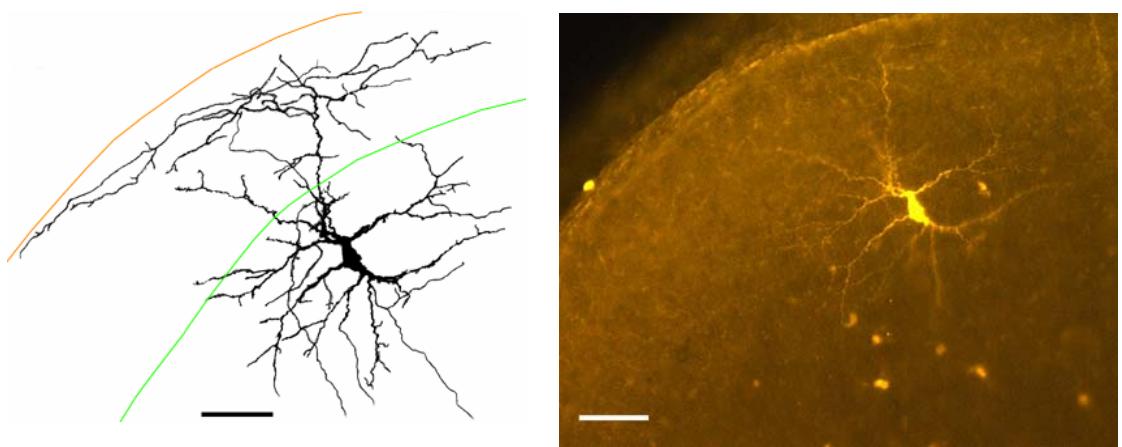


Abb. 13: Zellrekonstruktion eines GFP-positiven Neurons im sensomotorischen Cortex einer sechs Tage alten GIN-Maus. Maßstab: 50 μ m (orange: Pia, grün: Grenze Schicht I/II).

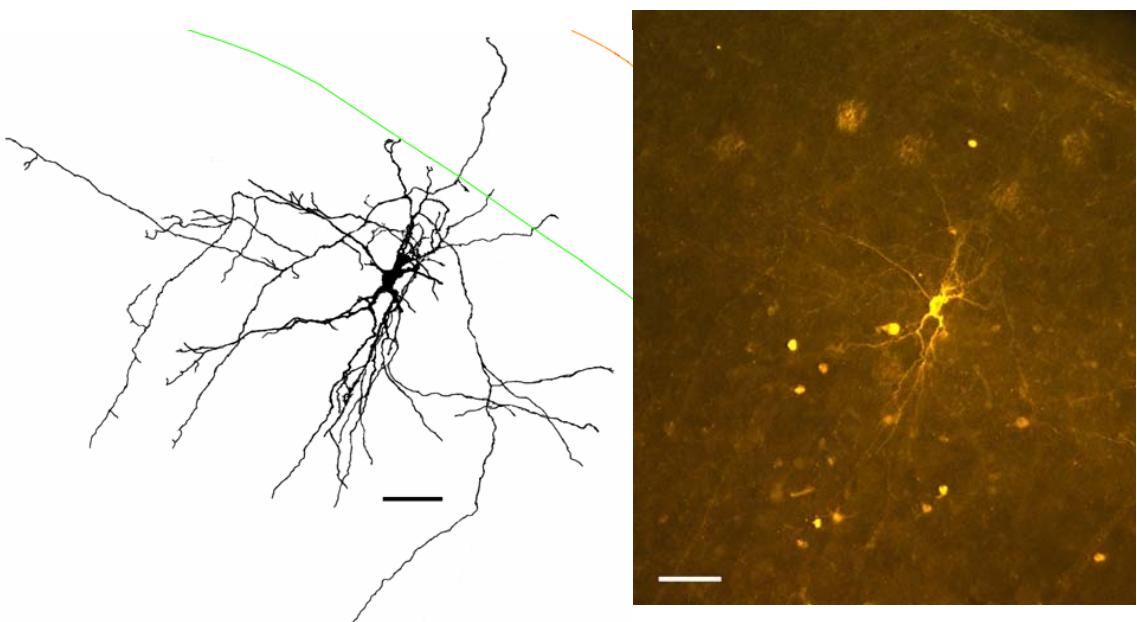


Abb. 14: Zellrekonstruktion eines GFP-positiven Neurons im sensomotorischen Cortex einer vierzehn Tage alten GIN-Maus. Maßstab: 50 μ m (orange: Pia, grün: Grenze Schicht I/II).

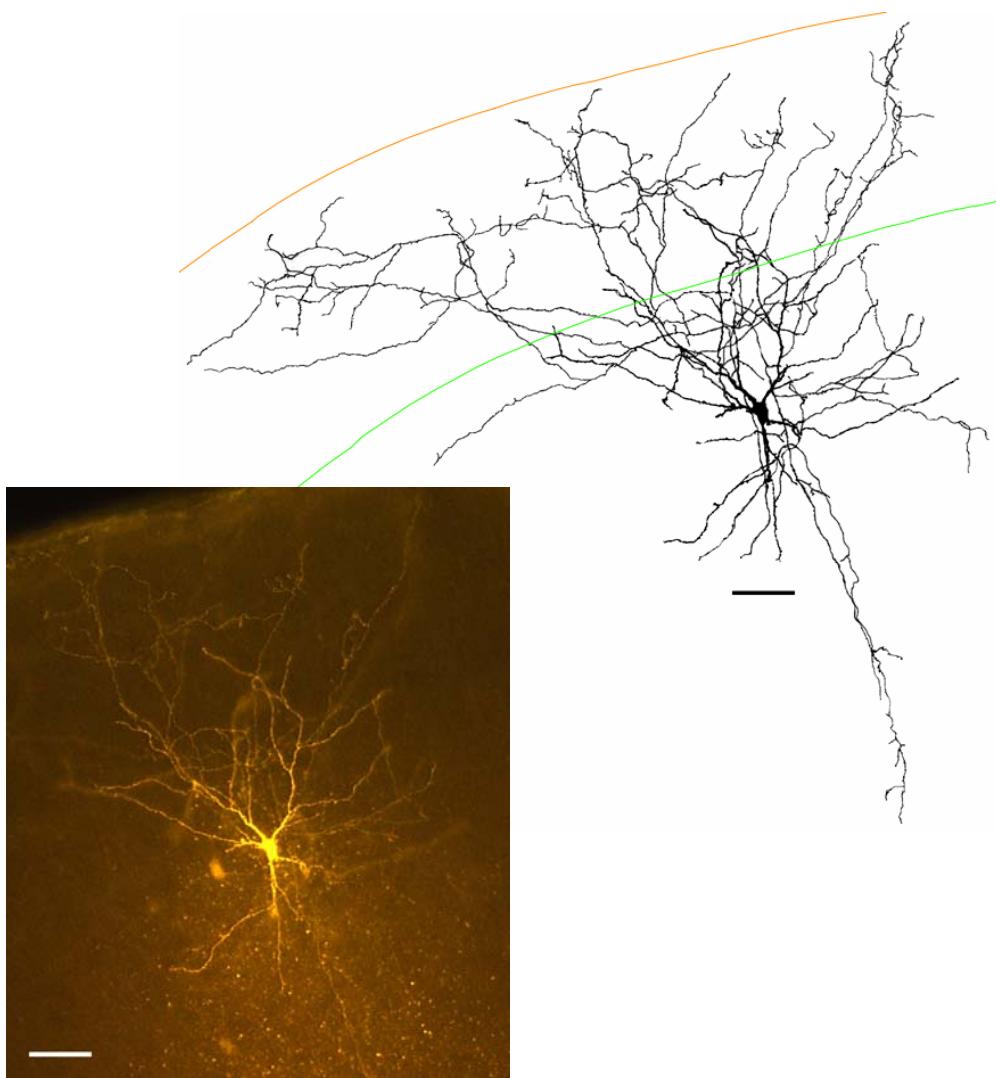


Abb. 15: Zellrekonstruktion eines GFP-positiven Neurons im sensomotorischen Cortex einer 25 Tage alten GIN-Maus. Maßstab: 50 μ m (orange: Pia, grün: Grenze Schicht I/II).

Die Analyse der Daten ergab deutliche entwicklungsabhängige Veränderungen der Morphologie der GIN des sensomotorischen Cortex. Zellen der ersten und der zweiten Alterskohorte (P6 bis P8: $93 \pm 41,3$; P10 bis P14: $142 \pm 56,1$) hatten insgesamt wesentlich weniger Schnittpunkte mit den Kreisen aufzuweisen als Zellen älterer Altersstufen (P18 bis P22: $305 \pm 61,1$) (Abb. 17). Die statistische Auswertung mit einem Kruskal-Wallis-Test zeigte, dass die Zunahme der Schnittpunkte mit dem Entwicklungsalter hochsignifikant war ($P = 0,0081$), wobei allerdings kein solcher Unterschied zwischen der ersten und der zweiten Alterskohorte bestand ($P > 0,05$; Post-Test nach Dunn).

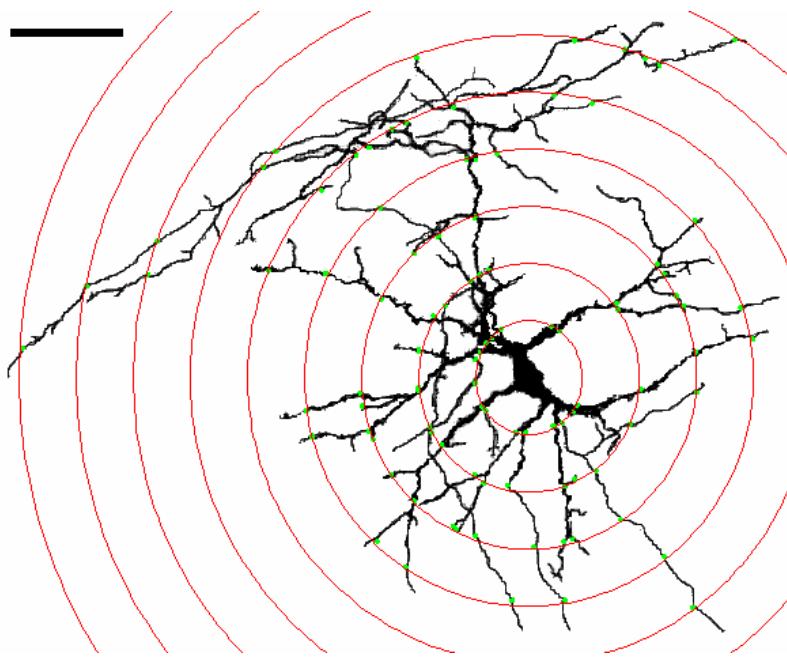


Abb. 16: Diagramm zur Shollanalyse eines rekonstruierten Neurons. Mittels dieser Analyse lassen sich Aussagen zum Verzweigungsgrad und zum Ausbreitungsareal der Neuriten machen. Dabei werden die Schnittpunkte der Neuriten mit einem der Kreise (oben als grüne Punkte dargestellt) gezählt (Maßstab = 50 µm).

Die Betrachtung der durchschnittlichen Anzahl an Schnittpunkten pro Kreis bestätigt die eben beschriebene Beobachtung (Abb. 18). Diese Zahl nimmt im Vergleich zu den jüngeren Altersgruppen in der dritten Altersstufe (P18 bis P22) deutlich zu. Neurone von zehn bis vierzehn Tage alten Tieren haben zwar mehr Schnittpunkte pro Kreis als jüngere Tiere, jedoch ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant.

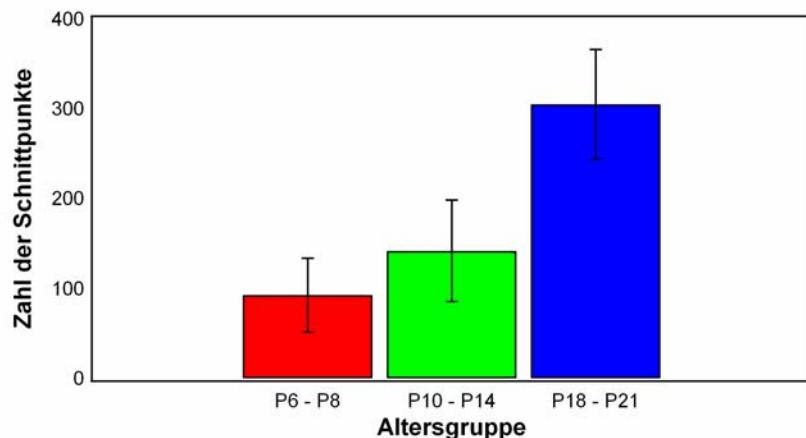


Abb. 17: Zunahme der Neuritenverzweigung während der postnatalen Entwicklung von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus. Das Diagramm zeigt die durch Shollanalyse ermittelte Gesamtanzahl (Mittelwert \pm Standardabweichung) an Schnittpunkten der Neuriten mit den Kreisen des Sholldiagramms in Abhängigkeit vom Entwicklungsalter. Pro Altersgruppe wurden fünf Neurone untersucht.

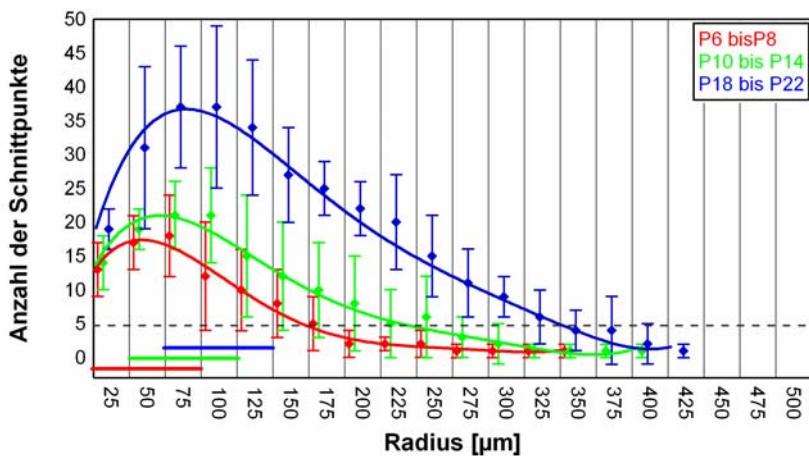


Abb. 18: Mittlere Anzahl der Schnittpunkte bei der Shollanalyse von GIN in verschiedenen Entwicklungsstadien. Das Diagramm zeigt die durch Shollanalyse ermittelte Anzahl (Mittelwert \pm Standardabweichung) an Schnittpunkten von Neuriten mit einem Kreis von bestimmtem Radius. Diese Werte wurden in Abhängigkeit vom Entwicklungsalter dargestellt. Pro Altersgruppe wurden fünf Neurone untersucht.

Zudem erreichen die Radien der Kreise, mit denen sich die Neuriten der Zellen jüngerer Tiere noch überkreuzen, nur 350 μm . Bei der mittleren Altersgruppe (P10 bis P14) beträgt dieser Wert 400 μm und bei den Neuronen der ältesten Gruppe (P18 bis P22) 425 μm . Die Radien der Kreise mit der größten Anzahl an Schnittpunkten pro Neuron nehmen mit dem Alter zu. Bei der jüngsten Gruppe (P6 bis P8) sind die meisten Schnittpunkte zwischen 25 μm und 75 μm zu finden, bei der mittleren Gruppe (P10 bis P14) zwischen 50 μm und 100 μm , und in der ältesten Gruppe zwischen 75 μm und 125 μm . Der Bereich der größten Verzweigung verschiebt sich also mit dem Alter weg vom Soma. Trotzdem verbleibt dieser Bereich eher nahe am Soma. Das heißt, dass die GIN eher eine lokale Verzweigung aufweisen und nur wenige ihrer Fortsätze weitreichend auswachsen.

Zusammen mit der Zunahme der Verzweigung zeigte sich eine Zunahme der Neuritenfläche (siehe oben) während der ersten zwei Wochen der postnatalen Entwicklung. Zellen der ersten und zweiten Alterskohorte wiesen eine wesentlich kleinere Fläche auf (P6 bis P8: $76178 \mu\text{m}^2 \pm 39782 \mu\text{m}^2$; P10 bis P14: $151955 \mu\text{m}^2 \pm 93676 \mu\text{m}^2$), als Neurone älterer Tiere (P18 bis P22: $361676 \mu\text{m}^2 \pm 122875 \mu\text{m}^2$) (Abb.19). Die statistische Analyse (Kruskal-Wallis-Test [$P = 0,0097$] mit Post-Test nach Dunn) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der ersten und der zweiten Altersstufe ($P > 0,05$), wohl aber zwischen den Tieren der dritten Altersgruppe und den jüngeren Tieren ($P < 0,01$).

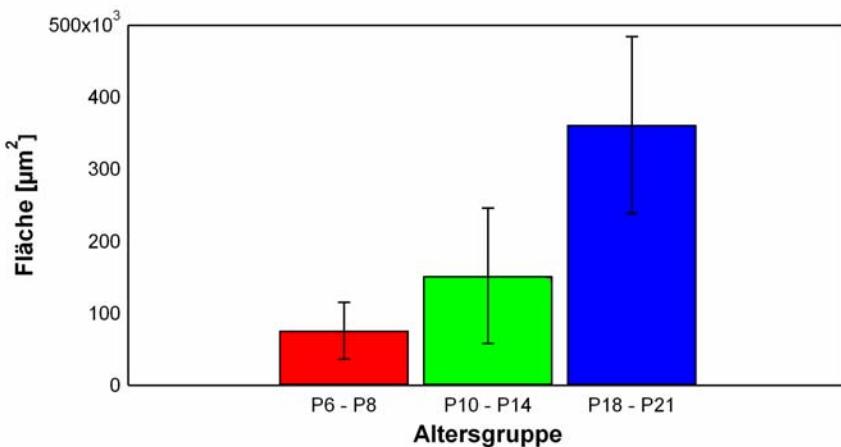


Abb. 19: Zunahme der Neuriten-Ausbreitung (Fläche) während der postnatalen Entwicklung von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus. Das Diagramm zeigt die mittels Shollanalyse errechnete Fläche (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Ausbreitung der Neuriten in Abhängigkeit vom Entwicklungsalter. Pro Altersgruppe wurden fünf Neurone untersucht.

4.1.5 Morphologischer Typ adulter GIN des sensomotorischen Cortex der Maus

Bei den fünf Neuronen der ältesten Gruppe (P18 bis P22) wurde versucht, den morphologischen Typ anhand bereits existierender Klassifizierungsschemata zu ermitteln (Markram et al., 2004). Da die GIN SST und CR exprimieren, zwei Marker, die in Martinottizellen vorkommen, und diese Neurone auch in der Literatur bereits mit diesem Zelltyp in Verbindung gebracht wurden (Ma et al., 2006), wurde überprüft, ob es sich bei den in dieser Arbeit rekonstruierten GIN um Martinottizellen handeln könnte.

Martinottizellen zeigen folgende morphologische Merkmale (Wang et al., 2004): Das Soma ist rund bis oval, manchmal auch pyramidenförmig oder polygonal. Es existieren mehrere vertikal orientierte primäre Dendriten mit geringer lateraler Ausdehnung. Manche dieser Dendriten können bis in tiefere Schichten des Neocortex ziehen. Als ein besonderes Merkmal besitzen Martinottizellen Dornfortsätze (Spines) an ihren Dendriten. Die Axone dieser Zellen entspringen oft aus einem Dendriten, seltener direkt aus dem Soma. Sie projizieren in Richtung Schicht I und verzweigen sich dort oft sehr stark mit horizontaler Ausdehnung (fächerartig). Zudem zeigen sich auf den Axonen sog. „spiny boutons“. Die wichtigsten Merkmale sind die fächerartige Projektion der Axone in Schicht I (mit einer Ausdehnung größer als 150 μm), die besondere Morphologie der Axone (spiny boutons) und die Spines auf den Dendriten.

An den fünf rekonstruierten Zellen aus der Gruppe P18 bis P22 aus Schicht II/III des sensomotorischen Cortex konnten in allen Fällen die eben erwähnten, für Martinottizellen

charakteristischen Merkmale gefunden werden. Alle Zellen zeigten eine ausgeprägte axonale Projektion in die Schicht I. Die Axone breiteten sich dort horizontal über eine Strecke von mehr als 150 µm aus (Abb. 20). Auf diesen Projektionen waren „spiny boutons“ zu finden (Abb. 21, blauer Ausschnitt). Die Somata der Zellen waren meist polygonal und es gab zwischen drei bis fünf dem Soma entspringende Fortsätze (primäre Dendriten). Diese Fortsätze wiesen bevorzugt eine vertikale Orientierung auf. Im Besonderen konnten auf den Dendriten Spines gefunden werden (Abb. 21, roter Ausschnitt).

Alle diese Merkmale bestätigen, dass es sich bei den fünf adulten GIN höchstwahrscheinlich um Martinottizellen handelte. Somit können die rekonstruierten GIN sowohl aufgrund ihrer morphologischen Merkmale als auch in Bezug auf ihre Protein- bzw. Neuropeptidexpression (CR / SST) der Klasse der Martinottizellen zugewiesen werden. Ob alle GIN diesem Typ angehören, ist nicht eindeutig geklärt.

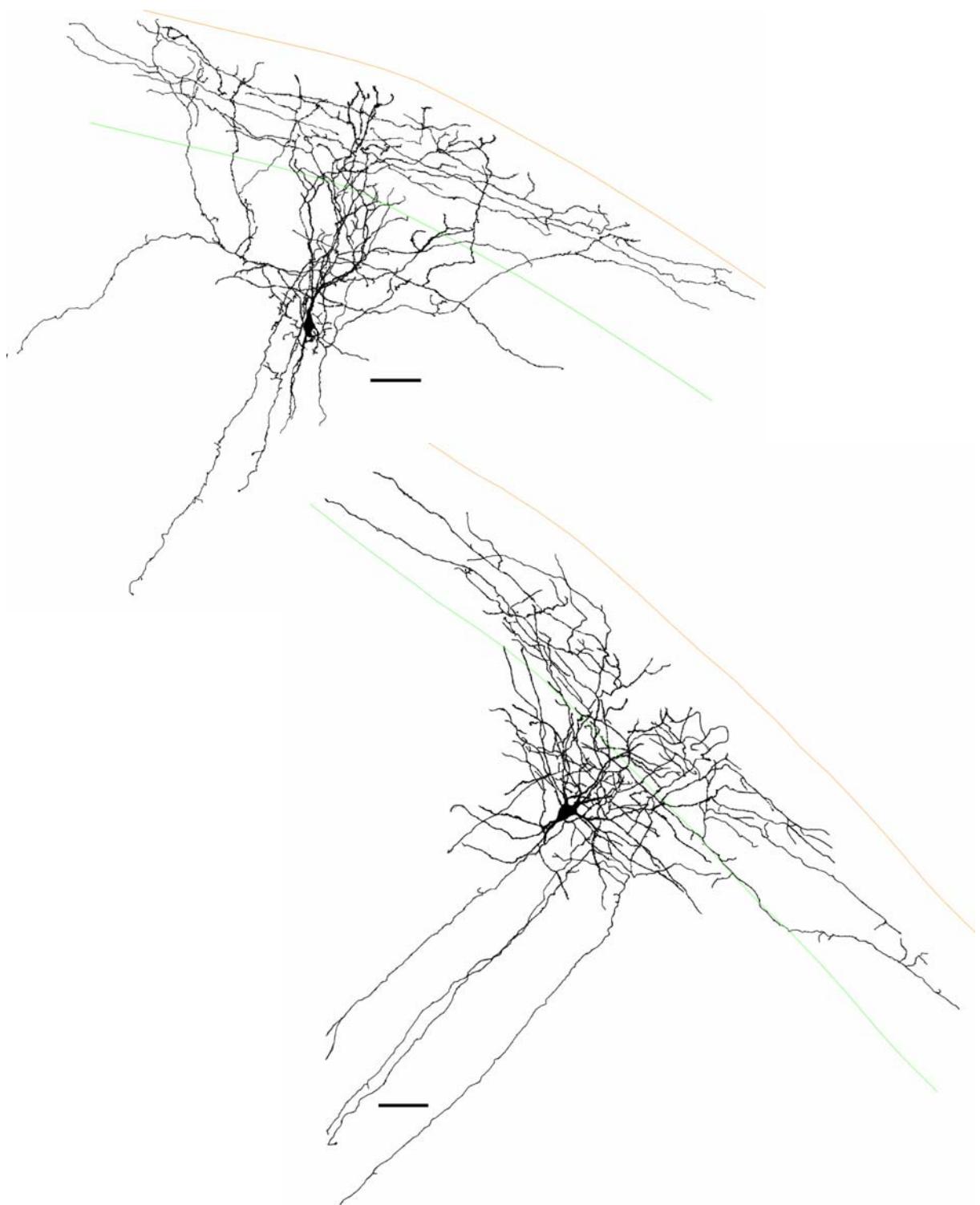


Abb. 20: Rekonstruierte GIN des sensomotorischen Cortex der Maus (P18 bis P21). (Maßstab: 50 μ m) (orange: Pia, grün: Grenze Schicht I/II).

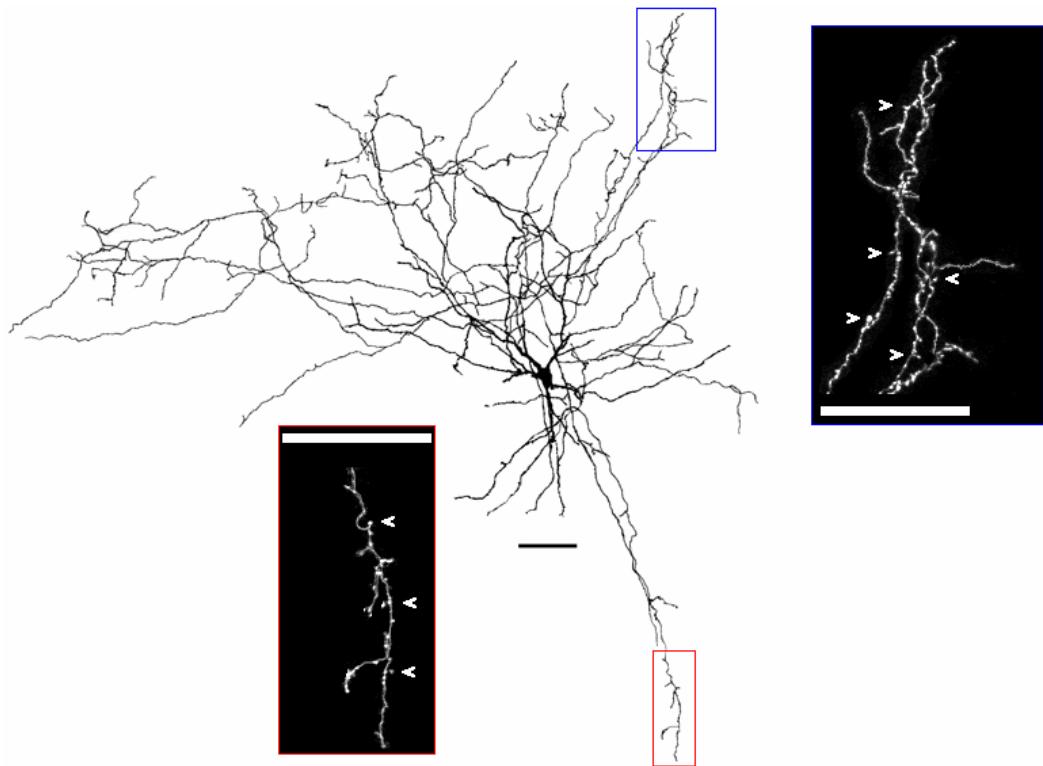


Abb. 21: Axonale und dendritische Merkmale der GIN des sensomotorischen Cortex der Maus (älter als P18). Rekonstruktion eines GIN aus Schicht II/III. Die Dendriten (roter Rahmen, Pfeile) weisen einige Spines auf und an den Axonen (blauer Rahmen, Pfeile) lassen sich sog. „spiny boutons“ erkennen. Diese beiden Merkmale sind ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei den rekonstruierten GIN höchstwahrscheinlich um Martinottizellen handelt (Maßbalken: 50 μ m).

4.2 Elektrophysiologie

Alle Messungen, welche zur Untersuchung der passiven Membraneigenschaften, der Strom-Spannungsbeziehung und der Aktionspotential- und Entladungseigenschaften gemacht wurden, erfolgten bei einem Haltepotential von -70 mV. Dies diente dazu, eine Vergleichbarkeit der Daten zu ermöglichen, also eventuelle Unterschiede der untersuchten Parameter auf Grund verschiedener Ruhemembranpotentiale zu vermeiden.

Das tatsächliche Ruhemembranpotential aller untersuchten GIN lag, unabhängig vom Alter, zwischen -65 mV und -75 mV (Tab. 3)

Tab. 3: Tatsächliche Ruhemembranpotentiale der GIN in verschiedenen Altersstufen.

Postnatales Alter	n	Ruhemembranpotential
6	5	-74,6 mV \pm 1,4 mV
7	6	-71,9 mV \pm 3,2 mV
8	6	-73,4 mV \pm 2,2 mV
10	10	-73,7 mV \pm 2,8 mV
11	6	-74,2 mV \pm 2,0 mV
12	8	-72,6 mV \pm 2,4 mV
13	11	-74,1 mV \pm 7,8 mV
14	10	-72,5 mV \pm 4,2 mV
18	11	-72,5 mV \pm 1,9 mV
19	9	-74,1 mV \pm 2,2 mV
20	12	-72,5 mV \pm 3,7 mV
21	14	-72,9 mV \pm 2,6 mV
22	12	-73,2 mV \pm 2,4 mV

4.2.1 Passive Membraneigenschaften von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus

Der Membraneingangswiderstand und die Membranzeitkonstanten repräsentieren die passiven elektrotonischen Eigenschaften eines Neurons. Der Eingangswiderstand wird ermittelt, indem man einen Strompuls bekannter Amplitude in das Neuron injiziert und die resultierende Spannungsabweichung misst. Er spiegelt den gesamten elektrischen Widerstand eines Neurons wider und wird durch dessen spezifischen Membranwiderstand, aber vor allem durch dessen Morphologie bestimmt. Die Membranzeitkonstanten erhält man, indem man an den

Spannungsabfall nach einer Strompuls-induzierten Spannungsänderung mono- oder biexponentielle Funktionen anpasst. Die Membranzeitkonstanten beruhen letztendlich auf dem raum-zeitlichen Stromfluss in einer Zelle und über deren Membran. Insofern sind die Membranzeitkonstanten ebenfalls abhängig von der Zellmorphologie (Carrascal et al., 2005; Nunez-Abades et all. 1993). Wie bereits gezeigt wurde, unterliegt die Morphologie der GIN einem charakteristischen Entwicklungsgang. Deshalb war zu erwarten, dass sich der Membraneingangswiderstand und die Membranzeitkonstanten dieser Neurone während der postnatalen Entwicklung in ähnlicher Weise verändern.

Zur Messung dieser beiden Parameter wurden während Patch-Clamp-Messungen hyperpolarisierende Strompulse in die Neurone injiziert und die entsprechenden Spannungsabweichungen registriert. Die Pulsdauer betrug 800 ms und die Injektionsfrequenz 0,25 Hz. Die Stromamplitude richtete sich nach dem Entwicklungsalter der untersuchten Tiere. Die durch den Strompuls hervorgerufene Spannungsabweichung sollte einen Wert von 10 mV nicht überschreiten, um das Auftreten von sog. Membran-Nichtlinearitäten zu vermeiden. In den Altersgruppen P6 bis P8 und P10 bis P14 wurde deshalb eine Amplitude von 10 pA und in der Alterstufe P18 bis P22 eine Amplitude von 20 pA gewählt. Pro Zelle wurden 20 hyperpolarisierende Pulse gleicher Stromstärke injiziert. Die registrierten Spannungsantworten eines Neurons wurden elektronisch gemittelt und danach ausgewertet. Die Abbildung 22 zeigt ein Beispiel einer solchen Messung. Die durch den Strompuls induzierte Spannungsabweichung wurde am Ende des Pulses gemessen. Der Eingangswiderstand ergab sich dann durch Anwendung des Ohmschen Gesetzes ($R = U/I$) in $M\Omega$. Die Membranzeitkonstanten wurden durch Anpassung einer bi-exponentiellen Funktion an die passive Repolarisationsphase nach der Spannungsantwort ermittelt:

$$V_t = V_0 + V_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + V_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}}$$

Diese Gleichung ist eine Lösung der Kabelgleichung nach der Zeit (Rall, 1969). Dabei ist V_t die Spannungsamplitude am Ende des Strompulses (Gleichgewicht). V_0 ist die Amplitude zum Zeitpunkt $t = 0$. τ_1 entspricht der Zeitkonstante der Somamembran und τ_2 nennt man eine Zeitkonstante, die dendritische Ausgleichsströme beschreibt, also den Stromfluss vom Soma in die Dendriten. V_1 und V_2 sind die Spannungsamplituden, die mit den entsprechenden Zeitkonstanten assoziiert sind.

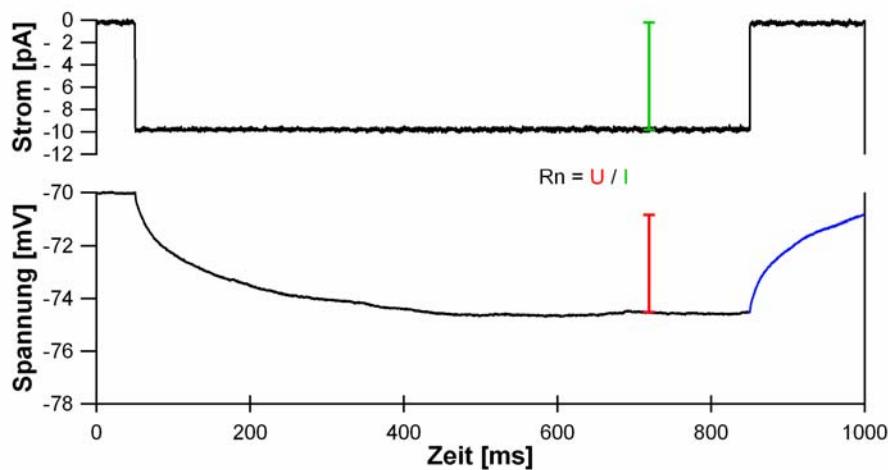


Abb. 22: Bestimmung von Membraneingangswiderstand R_n und Membranzeitkonstante τ . Aus der Strompulsamplitude (grün) und der Amplitude der Spannungsantwort (rot) lässt sich mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes der Widerstand errechnen. Die Membranzeitkonstanten wurden durch Kurvenanpassung während der passiven Repolarisationsphase der Spannungsantwort (blau) bestimmt.

Da sowohl Eingangswiderstand als auch die Zeitkonstanten spannungsabhängig sind, wurde das Membranpotential bei allen Messungen durch Gleichstrominjektion auf einen Wert von -70 mV eingestellt. Für jeden Parameter wurden aus allen Werten einer Altersstufe Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet und in einem Diagramm als Funktion des Entwicklungsalters aufgetragen. Die Einzelwerte wurden innerhalb einer Altersstufe auf Normalverteilung getestet und zur statistischen Analyse ein Kruskal-Wallis-Test mit Einzeltests nach Dunn durchgeführt.

4.2.1.1 Membraneingangswiderstand

GIN aus sechs Tage alten Tieren hatten einen mittleren Eingangswiderstand von $908 \text{ M}\Omega$ ($\pm 309 \text{ M}\Omega$). Es wurden in diesem Alter aber auch Neurone gefunden, deren Eingangswiderstände weit über einem Gigaohm lagen. Für die Altersstufen P7 und P8 war bereits eine geringfügige Abnahme der Widerstandswerte zu beobachten, die aber statistisch nicht signifikant war ($P > 0,05$). Das lag zum großen Teil an der enormen Variabilität der gemessenen Werte (Abb. 23 und Standardabweichungen in Tabelle 4, S. 74). Diese starken Schwankungen ließen ab dem Tag P10 nach. Beginnend mit diesem Tag verlief die Abnahme der Widerstandswerte merklich langsamer. Am Tag P11 hatte sich der Eingangswiderstand auf Werte zwischen $200 \text{ M}\Omega$ und $350 \text{ M}\Omega$ eingependelt.

Die statistische Analyse (Kruskal-Wallis-Test) ergab, dass die Veränderung des Eingangswiderstandes während der postnatalen Entwicklung hochsignifikant war ($P <$

0,0001). Die Einzeltests zeigten, dass sich die Altersstufen von P6 bis P8 nicht signifikant voneinander unterscheiden ($P > 0,05$), ebenso die Altersgruppen von P11 bis P22 ($P > 0,05$). Es fanden sich jedoch Signifikanzen beim Vergleich von P6 bis P8 mit den Altersstufen ab P11 ($P < 0,05$). Ab P10 waren diese Unterschiede nur noch im Vergleich zu Altersgruppen ab P18 bis P22 zu verzeichnen ($P < 0,05$). Der Membraneingangswiderstand von GIN des sensomotorischen Cortex nimmt also im Verlauf der ersten zwei postnatalen Wochen um mehr als die Hälfte ab.

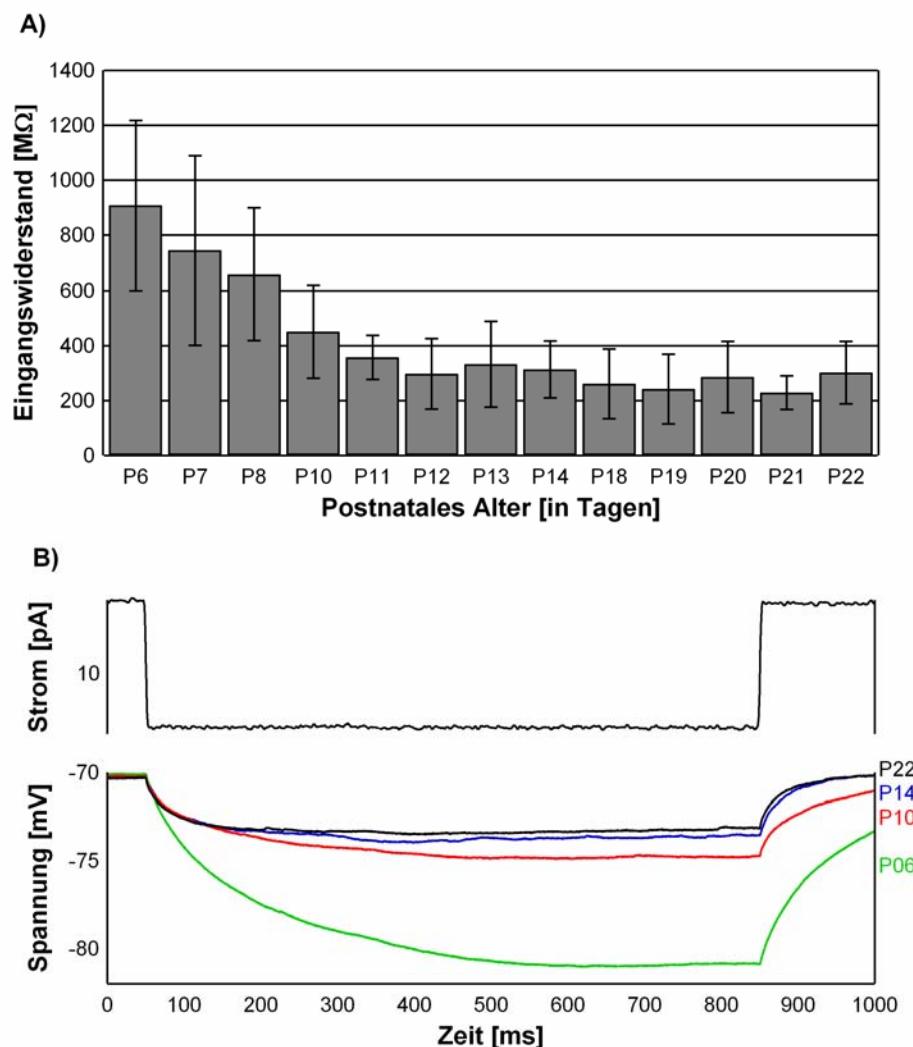


Abb. 23: Postnatale Entwicklung des Eingangswiderstandes von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus. A) Im Diagramm sind die Mittelwerte der Widerstände gegen das jeweilige Entwicklungsalter aufgetragen. NB: Die Standardabweichungen sind während der ersten zehn Tage größer als später. B) Es sind vier Spannungsantworten (Strompuls: 10 pA) zu sehen. Die Beispiele wurden so gewählt, dass ihre Widerstände sehr nahe am Mittelwert der jeweiligen Altersgruppe liegen.

4.2.1.2 Membranzeitkonstante

Von den beiden ermittelten Membranzeitkonstanten wurde nur die somatische Zeitkonstante bei der Auswertung berücksichtigt. Wie beim Eingangswiderstand fand eine Abnahme der Zeitkonstante mit zunehmendem Alter statt. Im Alter von sechs Tagen betrug die durchschnittliche Zeitkonstante 84 ms. Ausgehend von diesem Tag reduzierte sich die mittlere Zeitkonstante, bis sie sich bei P10 auf einen Wert einpendelte, der dem von Neuronen der Altersgruppe P18 bis 22 entsprach (Abb. 24 und Tabelle 4). Wie beim Eingangswiderstand, war die Variabilität der Zeitkonstanten in Neuronen junger Tiere am größten.

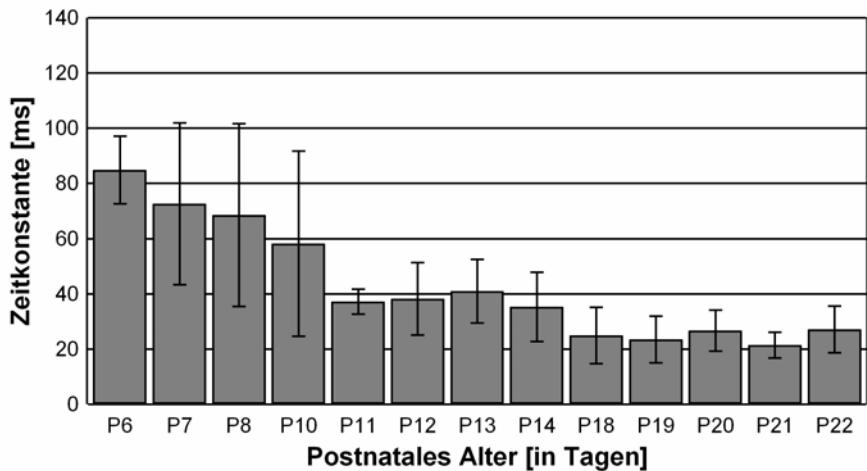


Abb. 24: Postnatale Entwicklung der somatischen Membranzeitkonstante von GIN des sensomotorischen Cortex der Maus. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen als Funktion des Entwicklungsalters.

Bei der statistischen Analyse ergab sich wiederum eine hochsignifikante Abnahme der Membranzeitkonstanten im Verlauf der ersten drei Entwicklungswochen ($P < 0,001$). Die Einzeltests zeigten, dass ab P11 im Vergleich mit den folgenden Altersstufen (bis P22) keine Signifikanzen nachweisbar waren ($P > 0,05$), was belegt, dass die mittlere Zeitkonstante ihren „adulten“ Wert bereits zu diesem Zeitpunkt erreicht hatte. Vergleicht man die Werte für die Zeitkonstanten von P6, P7 und P8 untereinander, ergeben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$). Allerdings besteht ein signifikanter Unterschied zwischen P6, P7, P8 und P10 zur Gruppe von P18 bis P22 ($P < 0,05$). Die Abnahme der Membranzeitkonstanten der GIN des sensomotorischen Cortex findet also in den ersten zehn Tagen der postnatalen Entwicklung statt.

Tab. 4: Postnatale Veränderung von Eingangswiderstand und somatischer Membranzeitkonstante in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Postnataler Tag	n	Membraneingangswiderstand	Membranzeitkonstante
6	8	$908 \text{ M}\Omega \pm 309 \text{ M}\Omega$	$84 \text{ ms} \pm 12 \text{ ms}$
7	11	$744 \text{ M}\Omega \pm 344 \text{ M}\Omega$	$72 \text{ ms} \pm 29 \text{ ms}$
8	18	$659 \text{ M}\Omega \pm 241 \text{ M}\Omega$	$68 \text{ ms} \pm 33 \text{ ms}$
10	17	$450 \text{ M}\Omega \pm 169 \text{ M}\Omega$	$58 \text{ ms} \pm 39 \text{ ms}$
11	8	$356 \text{ M}\Omega \pm 81 \text{ M}\Omega$	$37 \text{ ms} \pm 5 \text{ ms}$
12	25	$297 \text{ M}\Omega \pm 128 \text{ M}\Omega$	$35 \text{ ms} \pm 11 \text{ ms}$
13	23	$333 \text{ M}\Omega \pm 156 \text{ M}\Omega$	$38 \text{ ms} \pm 8 \text{ ms}$
14	21	$314 \text{ M}\Omega \pm 103 \text{ M}\Omega$	$35 \text{ ms} \pm 13 \text{ ms}$
18	22	$260 \text{ M}\Omega \pm 127 \text{ M}\Omega$	$25 \text{ ms} \pm 10 \text{ ms}$
19	23	$241 \text{ M}\Omega \pm 127 \text{ M}\Omega$	$23 \text{ ms} \pm 9 \text{ ms}$
20	20	$285 \text{ M}\Omega \pm 130 \text{ M}\Omega$	$26 \text{ ms} \pm 7 \text{ ms}$
21	21	$229 \text{ M}\Omega \pm 61 \text{ M}\Omega$	$21 \text{ ms} \pm 5 \text{ ms}$
22	20	$301 \text{ M}\Omega \pm 119 \text{ M}\Omega$	$27 \text{ ms} \pm 8 \text{ ms}$

4.2.2 Strom-Spannungsbeziehung von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus

Die Strom-Spannungsbeziehung (IV-Beziehung) eines Neurons deutet indirekt auf das Vorhandensein bestimmter spannungsabhängiger Membranleitfähigkeiten hin. Veränderungen der IV-Beziehung während der postnatalen Entwicklung können somit Auskunft über die entwicklungsabhängige Expression solcher Leitfähigkeiten geben.

Zur Messung von IV-Beziehungen wurde das Membranpotential der Neurone durch Gleichstrominjektion auf -70 mV eingestellt und eine Serie von hyper- und depolarisierenden Strompulsen (Dauer: 1 s) in die Neurone injiziert. Die Amplitude des ersten Strompulses wurde so gewählt, dass sie eine Hyperpolarisation von 30 bis 40 mV verursachte. Alle weiteren Strompulse waren dann um je zehn Prozent positiver als der unmittelbar vorausgehende. Auf diese Weise wurden immer zehn hyper- und zehn depolarisierende Strompulse appliziert. Zur Analyse wurden nur die unterschwelligen Spannungsantworten herangezogen. Die Messung der Spannungsamplituden erfolgte zum einen am Ende des Strompulses, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Spannung ein Gleichgewicht erreicht hatte (Steady State, Abb. 25A, blaue vertikale Linie). Der zweite Messpunkt lag zu einem Zeitpunkt, an dem bei Spannungsantworten, die durch einen hyperpolarisierenden Strompuls hervorgerufen wurden, ein Maximum auftrat (Abb. 25A, rote vertikale Linie). Die Werte der

Spannungsamplituden wurden dann in Abhängigkeit von der injizierten Stromstärke aufgetragen (Abb. 25B). Der Kurvenverlauf konnte phänomenologisch durch Anpassung eines Polynoms 3. Grades beschrieben werden.

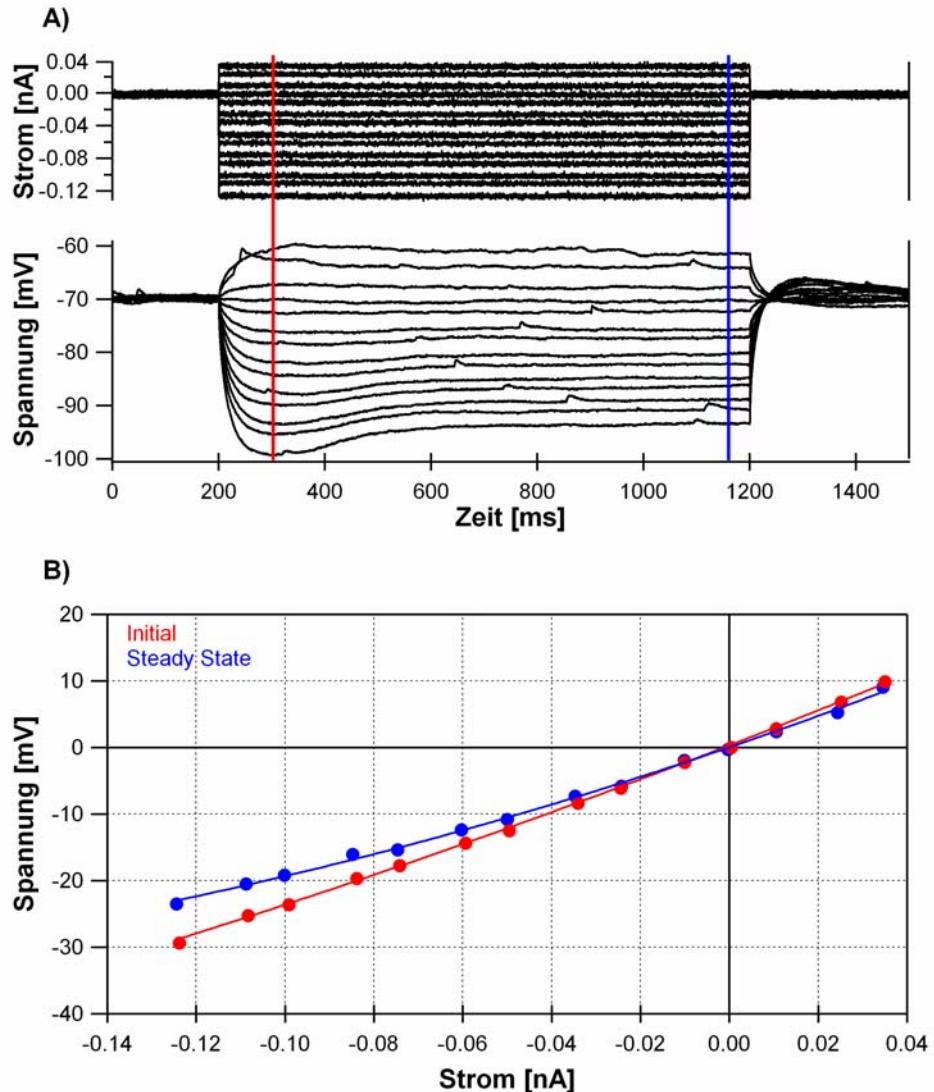


Abb. 25: Bestimmung der Strom-Spannungsbeziehung in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.
 A: Hyper- und depolarisierende Strompulse von 1 s Dauer (obere Spuren) wurden nacheinander über die Elektrode in das Neuron injiziert und die entsprechenden Spannungsantworten (untere Spuren) registriert. Zur Darstellung wurden die Einzelantworten übereinanderlagert.
 B: Auftragung der Spannungsamplituden als Funktion der injizierten Stromstärke. Der Kurvenverlauf wurde durch Anpassung eines Polynoms 3. Grades dargestellt. Blaue Kurve: Messung am Ende des Strompulses (Steady State). Rote Kurve: Messung ca. 100 ms nach Beginn des Strompulses. Zu diesem Zeitpunkt erreichte die Spannungsantwort, die durch den maximalen Strompuls hervorgerufen wurde, ein Maximum.

Wie in Abbildung 25 B zu erkennen ist, zeigten die IV-Kurven keinen linearen Zusammenhang zwischen injiziertem Strom und gemessener Spannung. Die deutlich vorhandene Krümmung der Kurven deutet auf die Aktivierung von spannungsabhängigen

Leitfähigkeiten hin, die entweder zu einer hyperpolarisierenden und / oder einer depolarisierenden Gleichrichtung (Rektifikation) führen.

Um das Ausmaß der Rektifikation zu quantifizieren, wurde die Steigung der angepassten Kurve, die dem sogenannten Steigungswiderstand entspricht, durch Differenzierung ermittelt. Der Maximalwert und der Minimalwert dieser ersten Ableitung der IV-Kurve wurden in ein Verhältnis gesetzt, das man als den Rektifikationskoeffizienten (RK) bezeichnet (Abb. 26). Ein Koeffizient von 1 bedeutet, dass weder einwärtsgerichtete noch auswärtsgerichtete Gleichrichtung vorliegt. Ist dieser Wert größer als 1, dann sind Membranleitfähigkeiten aktiv, die bevorzugt Einwärtsströme fließen lassen (Einwärtsrektifikation); bei einem Wert kleiner als 1 fließen überwiegend Auswärtsströme (Auswärtsrektifikation). Der Koeffizient ist dimensionslos.

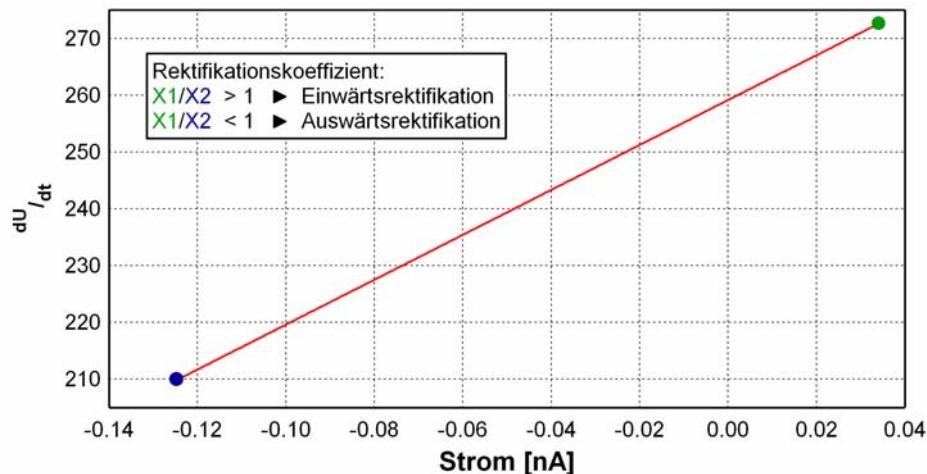


Abb.26: Bestimmung der Rektifikationskoeffizienten. Das Diagramm zeigt die erste Ableitung des Polynoms (in $M\Omega$), das an die rote Kurve in Abb. 25 B angepasst wurde, als Funktion des injizierten Stromes. Der Rektifikationskoeffizient ergibt sich als Quotient aus dem Steigungswiderstand bei maximalem depolarisierendem Strompuls und dem Steigungswiderstand bei maximalem hyperpolarisierendem Strompuls.

Strom-Spannungskurven und Rektifikationskoeffizienten wurden in Neuronen von Tieren der Altersstufen P6 bis P8 ($n = 19$), P10 bis P14 ($n = 48$) und P18 bis P22 ($n = 57$) ermittelt. Es zeigte sich, dass in allen GIN, egal welcher Altersgruppe, zeit- und spannungsabhängige Leitfähigkeiten in der hyperpolarisierenden Spannungsantwort zu finden waren. Wie aus Abbildung 25A zu erkennen ist, erreicht die durch den größten hyperpolarisierenden Strompuls hervorgerufene Spannungsantwort bei 300 ms ein Maximum und fällt dann, während der nächsten 300 ms bis 400 ms, auf einen neuen Gleichgewichtswert ab. Dieser Abfall wird in der Literatur als „Sag“ bezeichnet (Stafstrom et al., 1984). In den

IV-Kurven ist der „Sag“ als deutlicher Unterschied zwischen den Kurven, gemessen im Gleichgewicht, und denen, gemessen zu Beginn der Spannungsantwort, zu erkennen (Abb. 25B, Abb. 27A-D). Ursache für diesen „Sag“ ist sehr wahrscheinlich ein langsam aktivierender Kationeneinwärtsstrom (H-Strom oder Q-Strom), der durch Hyperpolarisation des Membranpotentials „eingeschaltet“ wird (Constanti und Galvan, 1983). Der H-Strom beruht auf den sogenannten HCN-Kanälen, die bei den GIN offenbar schon am sechsten postnatalen Tag exprimiert werden.

Die zweite wichtige Beobachtung, die sich aus der Analyse der IV-Kurven ergibt, ist, dass die Gesamtsteigung der Kurven, also der Steigungswiderstand mit zunehmendem Alter abnimmt (Abb. 27A-D). Jüngere Neurone hatten also einen höheren Membranwiderstand als ältere, wodurch der oben bereits beschriebene Befund bestätigt wurde (siehe **4.2.1.1 Membraneingangswiderstand: S.71**).

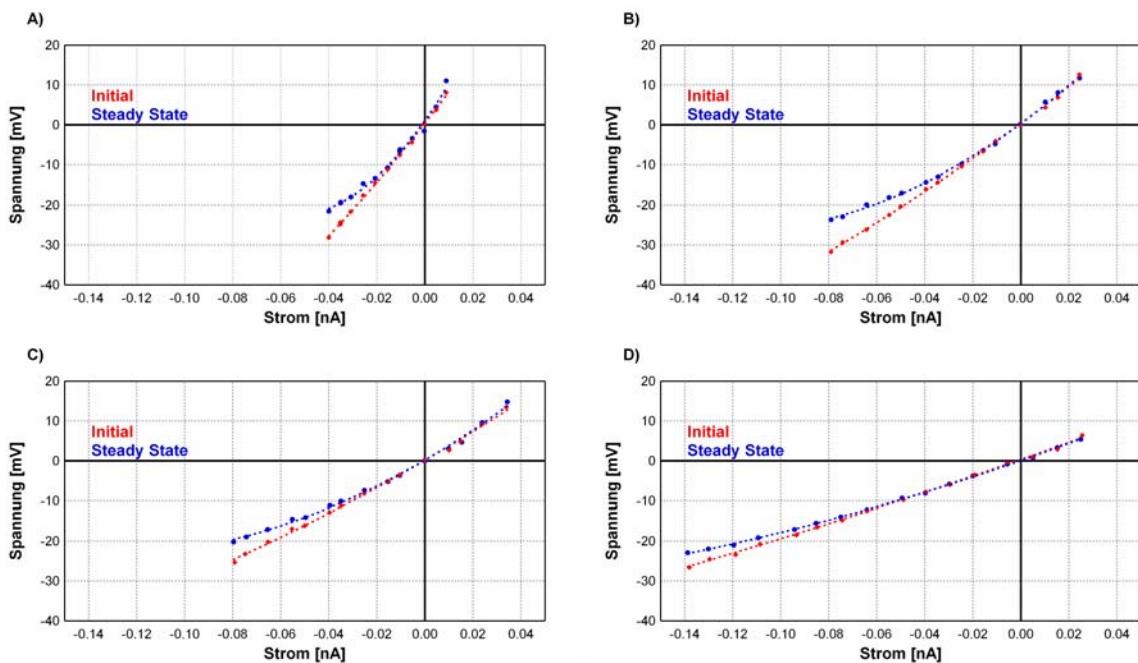


Abb. 27: Strom-Spannungsbeziehungen von GIN in Abhängigkeit vom Entwicklungsalter der Mäuse. Beispiele von typischen IV-Beziehungen an den postnatalen Tagen P6 (A), P10 (B), P14 (C) und P22 (D).

Wie bereits erwähnt, wurde zur Quantifizierung der Nichtlinearität der IV-Beziehung ein Rektifikationskoeffizient ermittelt. Dieser Koeffizient war bei allen untersuchten Neuronen, unabhängig vom Alter, im Gleichgewicht signifikant größer als 1 (Tab. 5). Das bedeutet, dass sowohl im hyperpolarisierenden als auch im depolarisierenden Bereich der IV-Kurven vornehmlich zeit- und spannungsabhängige Ionenkanäle aktiv waren, die bevorzugt Einwärtsströme ließen lassen (sog. Einwärtsgleichrichter). Die statistische Analyse (Kruskal-Wallis-Test) ergab eine hochsignifikante Abnahme des Rektifikationskoeffizienten mit

zunehmendem Alter während des Steady State ($P < 0.0001$). Wurde der Rektifikationskoeffizient vor Aktivierung des „Sags“, also zum Zeitpunkt des Maximums der hyperpolarisierenden Spannungsantwort bestimmt, dann fanden sich Werte zwischen 1 und 1,2. Zudem konnte keine entwicklungsabhängige Veränderung festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test: $P = 0,2199$, Abb. 28 und Tab. 5).

Diese Untersuchungen legen nahe, dass die Einwärtsgleichrichtung der IV-Kurven von GIN vor allem durch eine zeit- und spannungsabhängige Membranleitfähigkeit bestimmt wird. Diese Leitfähigkeit ist bereits dann vorhanden, wenn die Neurone durch GFP-Expression identifizierbar werden.

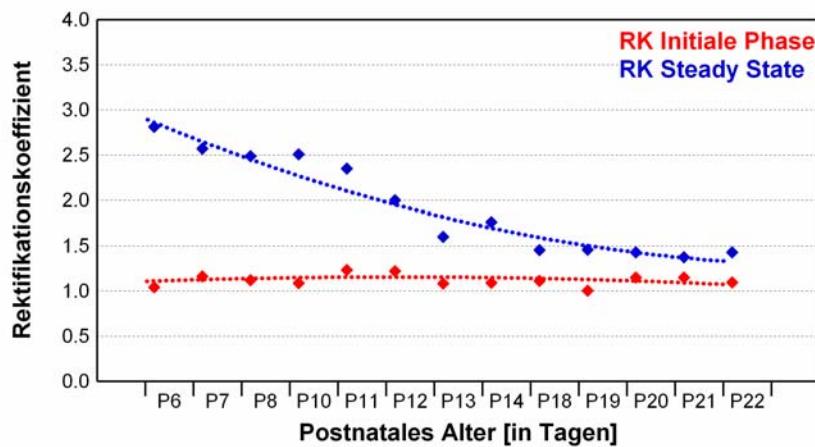


Abb. 28: Postnatale Entwicklung der Rektifikationskoeffizienten in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Tab. 5: Postnatale Entwicklung des Rektifikationskoeffizienten in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Postnataler Tag	n	Rektifikationskoeffizient im Gleichgewicht	Rektifikationskoeffizient vor Aktivierung des „Sags“
6	4	$2,81 \pm 1,12$	$1,04 \pm 0,25$
7	4	$2,57 \pm 0,99$	$1,16 \pm 0,08$
8	11	$2,48 \pm 0,91$	$1,12 \pm 0,19$
10	8	$2,50 \pm 0,98$	$1,08 \pm 0,19$
11	5	$2,35 \pm 0,36$	$1,23 \pm 0,12$
12	12	$2,00 \pm 0,52$	$1,22 \pm 0,24$
13	8	$1,60 \pm 0,46$	$1,08 \pm 0,24$
14	15	$1,76 \pm 0,60$	$1,09 \pm 0,24$
18	8	$1,45 \pm 0,31$	$1,11 \pm 0,19$
19	12	$1,45 \pm 0,30$	$1,00 \pm 0,18$
20	11	$1,42 \pm 0,31$	$1,14 \pm 0,18$
21	14	$1,37 \pm 0,33$	$1,15 \pm 0,13$
22	12	$1,42 \pm 0,23$	$1,09 \pm 0,12$

4.2.3 Eigenschaften von Aktionspotentialen in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus

Zur Untersuchung der Eigenschaften einzelner Aktionspotentiale wurden gerade unterschwellige, depolarisierende Strompulse (Dauer: 1 s) in die Neurone injiziert. Durch Steigerung der Stromamplitude in kleinen Schritten ($\Delta I = 10 \text{ pA}$) wurde die Entladungsschwelle ermittelt und von den ausgelösten Aktionspotentialen Amplitude und Dauer gemessen. Zur Analyse der Nachhyperpolarisation nach einzelnen Aktionspotentialen wurden deutlich überschwellige Strompulse appliziert, um repetitive Entladungen zu generieren. Diese Untersuchungen wurden an Neuronen in den Altersgruppen P6 bis P8, P10 bis P14 und P18 bis P22 durchgeführt. In der Abbildung 29 sind Beispiele für Aktionspotentiale dargestellt, wie sie in GIN zu verschiedenen Entwicklungsstadien auftraten.

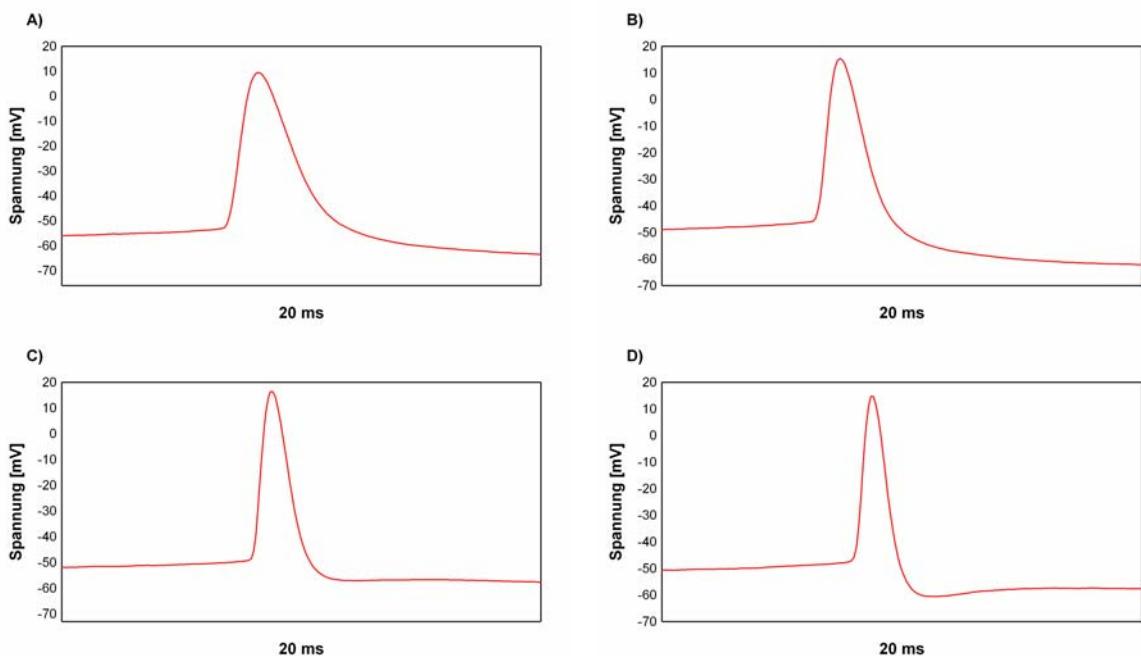


Abb. 29: Aktionspotentiale von GIN im sensomotorischen Cortex von Mäusen in verschiedenen postnatalen Entwicklungsstadien. Die Abbildung zeigt Beispiele für Aktionspotentiale, gemessen in vier verschiedenen Neuronen zum angegebenen Entwicklungszeitpunkt. Die Aktionspotentiale wurden durch depolarisierende Strominjektion ausgelöst (A: P6, B: P10, C: P14, D: P22).

4.2.3.1 Entladungsschwelle

Das Schwellenpotential zur Auslösung eines Aktionspotentials (Entladungsschwelle) wurde anhand des ersten Aktionspotentials ermittelt, das durch einen depolarisierenden Strompuls evoziert werden konnte. Dazu wurde das Aktionspotential elektronisch differenziert und diese

erste Ableitung gegen den normalen Spannungsverlauf während des Aktionspotentials aufgetragen. Mit Hilfe dieser sogenannten Phase-Plane-Darstellung konnte der relative Spannungswert, an dem das Aktionspotential in seine steilste Phase eintrat, eindeutig bestimmt werden. Dieser Wert entsprach der Depolarisationsamplitude, die zur Generierung eines Aktionspotentials notwendig war und wurde als Schwellendepolarisation bezeichnet (Abb. 30; Bean, 2007). Um Vergleiche zwischen verschiedenen Altersgruppen zu ermöglichen, wurden diese Messungen bei einem, durch Gleichstrominjektion eingestellten Membranpotential von -70 mV durchgeführt. Von allen Meßwerten einer Altersstufe wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet und gegen das Entwicklungsalter aufgetragen (Abb. 30 und Tab. 6). Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests (inkl. Dunns Einzeltests). Wie aus Abbildung 30 zu erkennen ist, lag die Schwellendepolarisation bei den GIN, unabhängig vom Entwicklungsalter, in einem Bereich zwischen 18 und 25 mV. Die Variationen zwischen den verschiedenen Altersgruppen waren statistisch nicht signifikant ($P = 0,061$).

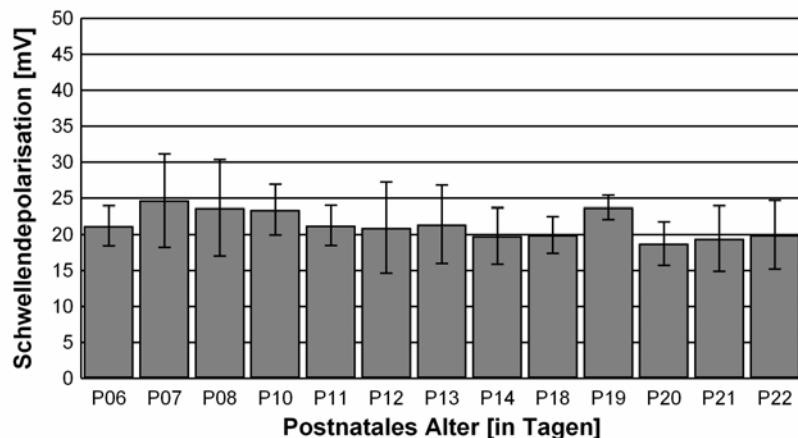


Abb. 30: Postnatale Entwicklung der, zur Auslösung eines Aktionspotentials notwendigen Schwellendepolarisation in GIN des sensorimotorischen Cortex der Maus. Die Variationen der Schwellendepolarisation in den verschiedenen Altersgruppen sind statistisch nicht signifikant.

4.2.3.2 Amplituden der Aktionspotentiale

Die Amplituden wurden jeweils am ersten Aktionspotential einer repetitiven Entladung gemessen. Als Amplitude galt die Differenz zwischen dem Spannungswert unmittelbar zu Beginn der schnellen Anstiegsphase des Aktionspotentials und seinem Maximum. Die Messwerte der verschiedenen Altersgruppen wurden gemittelt und die Mittelwerte zusammen mit ihren Standardabweichungen als Funktion des Entwicklungsalters aufgetragen (Abb. 31).

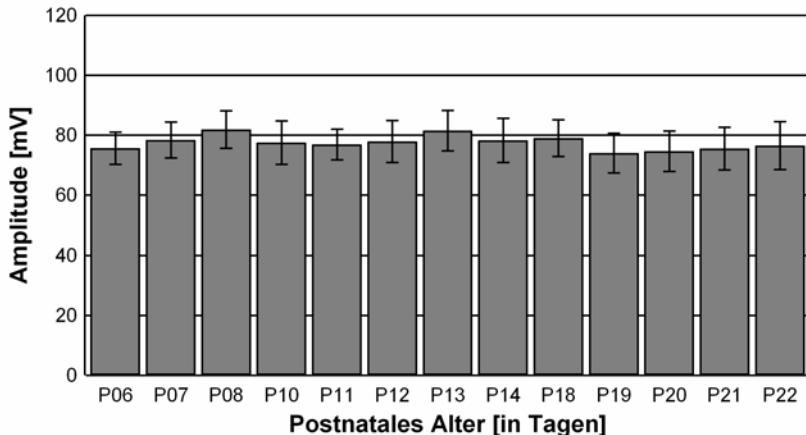


Abb. 31: Postnatale Entwicklung der Amplituden von Aktionspotentialen in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Die Amplituden der Aktionspotentiale bewegten sich in allen Altersstufen zwischen 70 mV und 85 mV (Abb. 31 und Tab. 6). Zwischen den Aktionspotentialamplituden der verschiedenen Altersgruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test mit Post-Test nach Dunn, $P = 0,1487$).

4.2.3.3 Dauer der Aktionspotentiale

Die Aktionspotentialdauer wurde ebenfalls am ersten Aktionspotential einer Strompuls-induzierten repetitiven Entladung gemessen. Dazu wurde das registrierte Aktionspotential elektronisch differenziert und die Zeitdauer vom Minimum bis zum Maximum dieser ersten Ableitung bestimmt (Bean, 2007). Die Mittelwerte der verschiedenen Altersgruppen wurden zusammen mit den entsprechenden Standardabweichungen als Funktion des Entwicklungsalters aufgetragen. Wie aus Abbildung 32 zu ersehen ist, wurde die Dauer des Aktionspotentials mit zunehmendem Entwicklungsalter kürzer. Bei P7 betrug die Dauer ca. 1,5 ms, bei P14 ca. 1,2 ms und bei P21 ca. 0,8 ms. Innerhalb von zwei Entwicklungswochen nahm die Dauer um ungefähr die Hälfte ab (Tabelle 6). Diese entwicklungsbedingte Reduktion der Aktionspotentialdauer war statistisch signifikant (Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$). Die Einzeltests nach Dunn ergaben, dass die Aktionspotentialdauer von P6 bis P10 gleich blieb und erst ab P10 statistisch signifikante Verkürzungen zu beobachten waren (P7 bis P10 vs. P18 bis P22: $P < 0,01$). Von P11 bis P14 war nur noch ein signifikanter Unterschied zu den Aktionspotentialdauern von P21 und P22 zu beobachten. Ab P18 traten dann keine Veränderungen mehr auf.

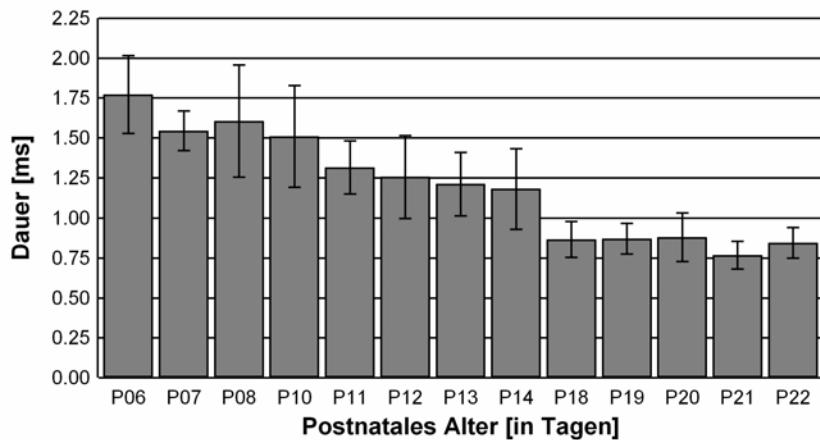


Abb.32: Postnatale Entwicklung der Aktionspotentialdauer in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Tab. 6: Postnatale Entwicklung der Eigenschaften von Aktionspotentialen in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Postnataler Tag	n	Schwellendepolarisation	Amplitude	Dauer
6	7	21,22 mV \pm 2,75 mV	75,61 mV \pm 5,41 mV	1,77 ms \pm 0,24 ms
7	9	24,66 mV \pm 6,48 mV	78,35 mV \pm 6,06 mV	1,54 ms \pm 0,12 ms
8	15	23,69 mV \pm 6,68 mV	81,87 mV \pm 6,26 mV	1,61 ms \pm 0,35 ms
10	11	23,42 mV \pm 3,50 mV	77,45 mV \pm 7,31 mV	1,51 ms \pm 0,32 ms
11	7	21,26 mV \pm 2,74 mV	76,86 mV \pm 5,09 mV	1,31 ms \pm 0,17 ms
12	16	20,95 mV \pm 6,30 mV	77,92 mV \pm 7,06 mV	1,26 ms \pm 0,26 ms
13	16	21,42 mV \pm 5,44 mV	81,50 mV \pm 6,75 mV	1,21 ms \pm 0,20 ms
14	16	19,80 mV \pm 3,90 mV	78,26 mV \pm 7,37 mV	1,18 ms \pm 0,25 ms
18	9	19,96 mV \pm 2,55 mV	78,96 mV \pm 6,17 mV	0,87 ms \pm 0,11 ms
19	7	23,73 mV \pm 1,65 mV	73,94 mV \pm 6,64 mV	0,87 ms \pm 0,10 ms
20	14	18,77 mV \pm 3,02 mV	74,61 mV \pm 6,78 mV	0,88 ms \pm 0,15 ms
21	16	19,42 mV \pm 4,56 mV	75,47 mV \pm 7,08 mV	0,77 ms \pm 0,09 ms
22	13	19,93 mV \pm 4,72 mV	76,54 mV \pm 7,96 mV	0,85 ms \pm 0,10 ms

4.2.3.4 Nachhyperpolarisation der Aktionspotentiale

Die Nachhyperpolarisation nach Aktionspotentialen veränderten sich deutlich während der postnatalen Entwicklung der GIN. Die Abbildung 33 zeigt typische Beispiele für Nachhyperpolarisationen verschiedener postnataler Altersstufen.

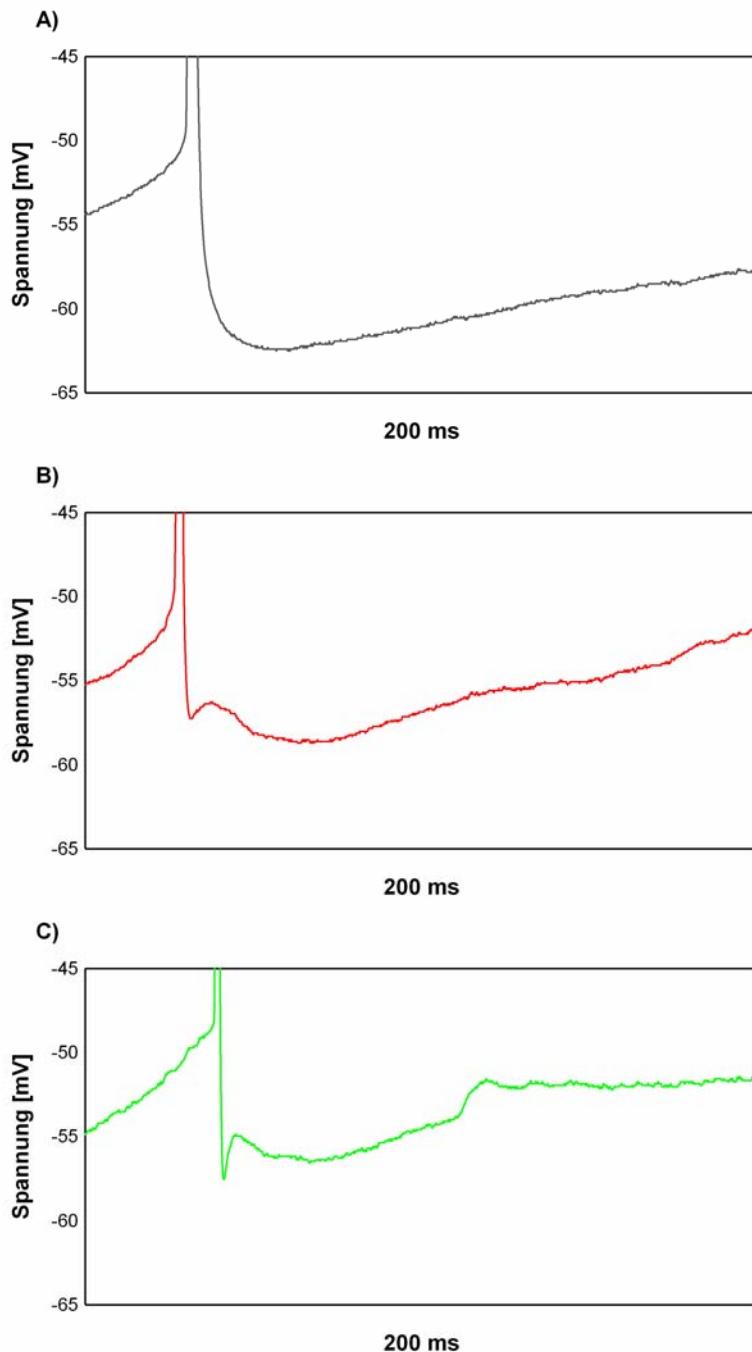


Abb. 33: Postnatale Entwicklung der Aktionspotential-Nachhyperpolarisation in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus. A) Einphasige Nachhyperpolarisation, vorherrschend von P6 bis P14. B) Eine zweiphasige Nachhyperpolarisation ist ab P12 zu beobachten, allerdings tritt bis P14 nur der Typ I auf. C) Ab P18 ist zusätzlich ein zweiter Typ vorhanden.

Von P6 bis P11 war jede Nachhyperpolarisation einphasig (Abb. 33A). Ab P12 tauchten die ersten zweiphasigen Potentiale auf (Abb. 33B), bei der eine erste kurze Phase von einer zweiten sehr viel längeren gefolgt wurde. Bis P14 sind die zweiphasigen Potentiale nur in vereinzelten GIN zu finden, der Großteil der Neurone bildet nach wie vor eine einphasige Nachhyperpolarisation aus. Ab P18 allerdings war jede Nachhyperpolarisation zweiphasig, wobei zwei unterschiedliche Typen beobachtet wurden: beim Typ I (Abb. 33B) war die Amplitude der ersten kurzen Phase stets kleiner als die der nachfolgenden längeren Phase, beim Typ II war es umgekehrt (Abb. 33C). Typ I trat, wie bereits erwähnt, ab P 14 auf und war auch noch nach P18 in manchen Neuronen nachweisbar. Der zweite Typ trat erst nach P18 auf.

4.2.3.5 Entladungsverhalten der GIN im sensomotorischen Cortex der Maus

4.2.3.5.1 Entladungsmuster

Das Entladungsmuster der GIN wurde zunächst rein qualitativ anhand zweier Schemata analysiert (Schema 1: Kawaguchi und Kondo, 2002; Schema 2: Gupta et al., 2000). Wie bereits im Kapitel „**2.2.2.3 Aktionspotential-Entladungsmuster**“ (S. 13) erwähnt wurde, beruhen diese Klassifikationen auf der phänomenologischen Beschreibung einzelner Antworten der Neurone bei Injektion überschwelliger Strompulse.

Die Abbildung 34 zeigt beispielhaft das Entladungsmuster zweier GIN, wie es in der Altersstufe von P18 bis P22 beobachtet werden kann. Das sogenannte reguläre Muster (Abb. 34A) bestand aus einer initialen, hochfrequenten Entladung, die dann in eine adaptierende Aktionspotentialsalve überging. Dem Klassifizierungsschema nach Kawaguchi und Kondo (2002) zufolge werden diese Neurone als „regular spiking nonpyramidal cells“ oder RSNP-Zellen bezeichnet. Im Schema nach Gupta et al. (2000) werden sie als „bursting accomodating cells“ oder bAC eingeordnet. Dieses Entladungsmuster fand sich beim größten Teil aller untersuchten GIN (49 von 71 Zellen).

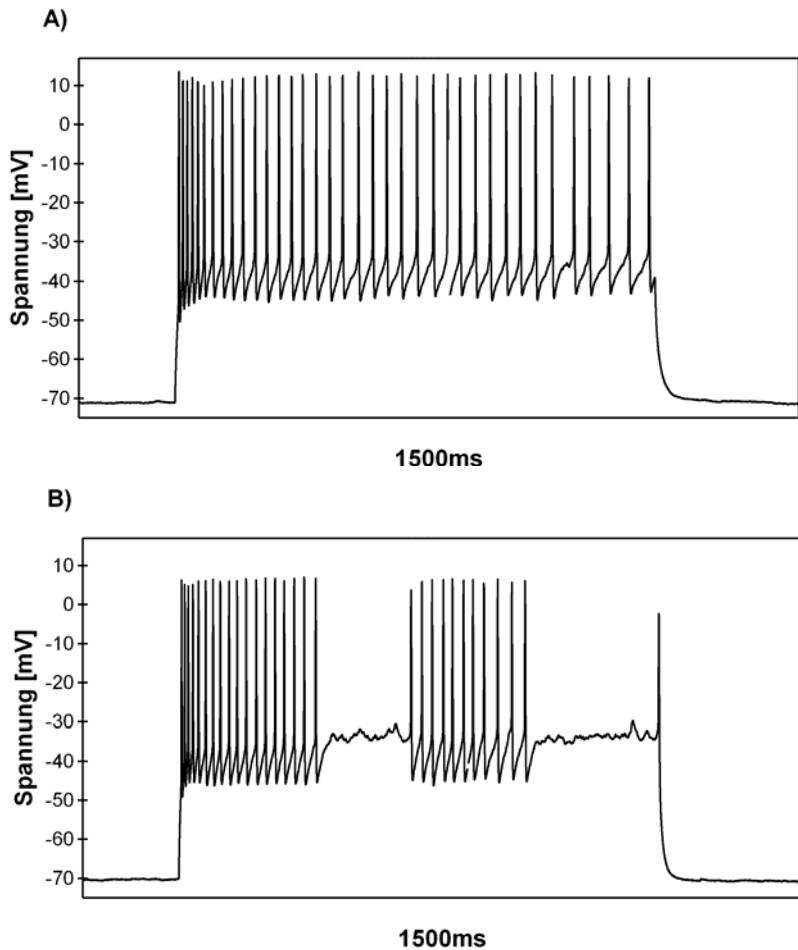


Abb. 34: Entladungsmuster von GIN (P18 bis P22) im sensomotorischen Cortex der Maus. A: reguläres Entladungsmuster (regular spiking nonpyramidal cell [RSNP] oder burst accomodating cell [bAC]). B: irreguläres Entladungsmuster (irregular spiking cell [IS], oder bursting and stuttering cell [bSTUT]). Die Entladungen wurden durch Injektion eines depolarisierenden Strompulses (Dauer: 1 s, Amplitude: 260 pA) bei einem Membranpotential von -70 mV ausgelöst.

Bei wenigen GIN trat ab dem postnatalen Tag P14 ein anderes Entladungsmuster auf (Abb. 34B). Zwischen regulären hochfrequenten Entladungsphasen kam es zu längeren Pausen. Dieses Muster wird als „stotternd“ (stuttering) oder „unregelmäßig“ (irregular) bezeichnet. Somit können diese Neurone entweder als „irregular spiking cells“ (IS, Kawaguchi und Kondo, 2000) oder als „bursting stuttering cells“ (bSTUT, Gupta et al. 2000) klassifiziert werden. Allerdings sind diese Schemata nicht universell gültig, da sich selbst in ein und derselben Zelle je nach Stärke des Stromreizes unterschiedliche Entladungsmuster ergeben können (Abb. 35).

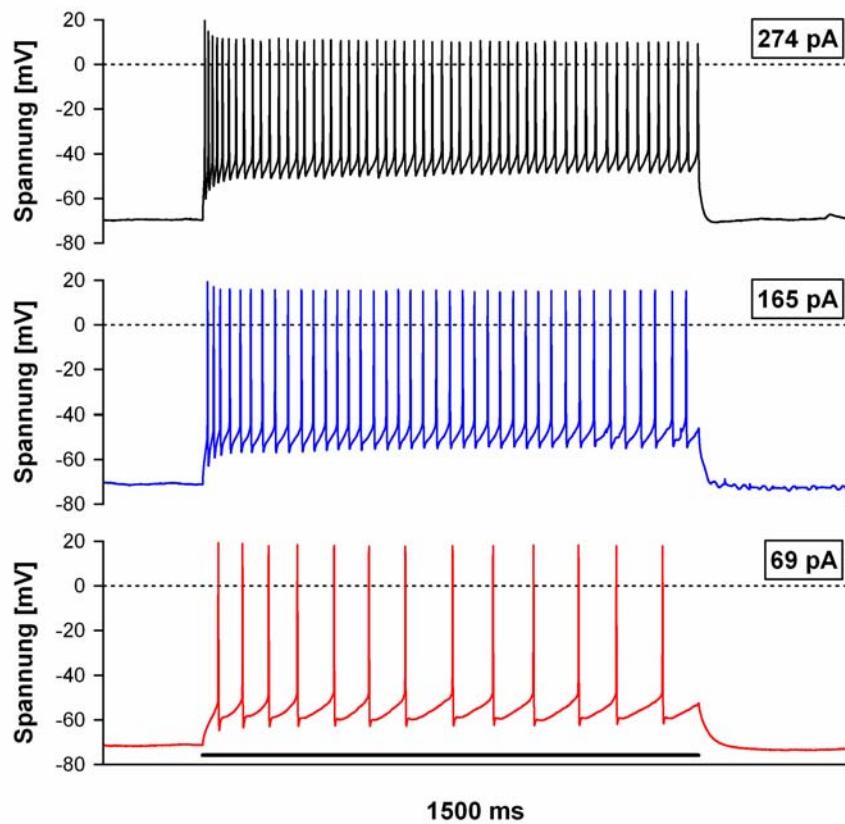


Abb. 35: Entladungsmuster eines GIN im sensomotorischen Cortex (P22) bei unterschiedlichen Reizstromstärken. Im schwellennahen Bereich (rot) kann das Neuron nach Kawaguchi und Kondo (2000) als RSNP und nach Gupta et al. (2000) als klassische, adaptierende Zelle (cAC) bezeichnet werden. Bei einem höheren Reizstrom (blau) ist das Entladungsmuster nicht mehr regelmäßig, es fehlt aber noch der initiale Burst, sodass die Klassifikation der Zelle nach Kawaguchi und Kondo als RSNP fraglich ist, und nach Gupta et al. immer noch als cAC gehandelt werden würde. Bei sehr hohen Reizströmen (schwarz) erkennt man den initialen Burst, sodass die Zelle nun nach Gupta et al. als bAC klassifiziert werden würde, nach Kawaguchi und Kondo aber immer noch eine RSNP wäre. Die verschiedenen Schemata sind also ungenau und richten sich nach einem rein qualitativen Prinzip.

4.2.3.5.2 Quantitative Analyse des Entladungsmusters von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus während der postnatalen Entwicklung

Um das Entladungsmuster der GIN quantitativ zu beschreiben, wurden sogenannte Frequenzdiagramme erstellt (Abb. 36B). Dazu wurde das Membranpotential der Neurone durch Gleichstrominjektion auf -70 mV eingestellt und depolarisierende Strompulse (Dauer: 1 s) mit steigender Stromstärke in die Neurone injiziert. In allen Altersgruppen (P6 bis P22) wurde die Stromstärke in Schritten von 10 pA verändert. Von den registrierten Antworten wurden dann die Zeitpunkte des Auftretens der einzelnen Aktionspotentiale nach Beginn des Strompulses gemessen und diese Zeitreihen in einem Raster-Plot dargestellt (Abb. 36A). Mit

Hilfe dieser Zeitreihen konnte nun der zeitliche Abstand zwischen zwei aufeinander folgenden Aktionspotentialen (Interspike-Intervall) ermittelt werden. Der Kehrwert der Interspike-Intervalle, welcher der Frequenz entspricht, wurde dann in Abhängigkeit von der Nummer der Interspike-Intervalle in der Zeitreihe aufgetragen (Abb. 36B). Diese Frequenzdiagramme geben zum einen Auskunft über die zeitabhängige Veränderung der Entladungsfrequenz während einer Strompuls-induzierten Entladung. Zum anderen zeigen sie auch die Abhängigkeit der Frequenz von der injizierten Stromstärke (Abb. 37B).

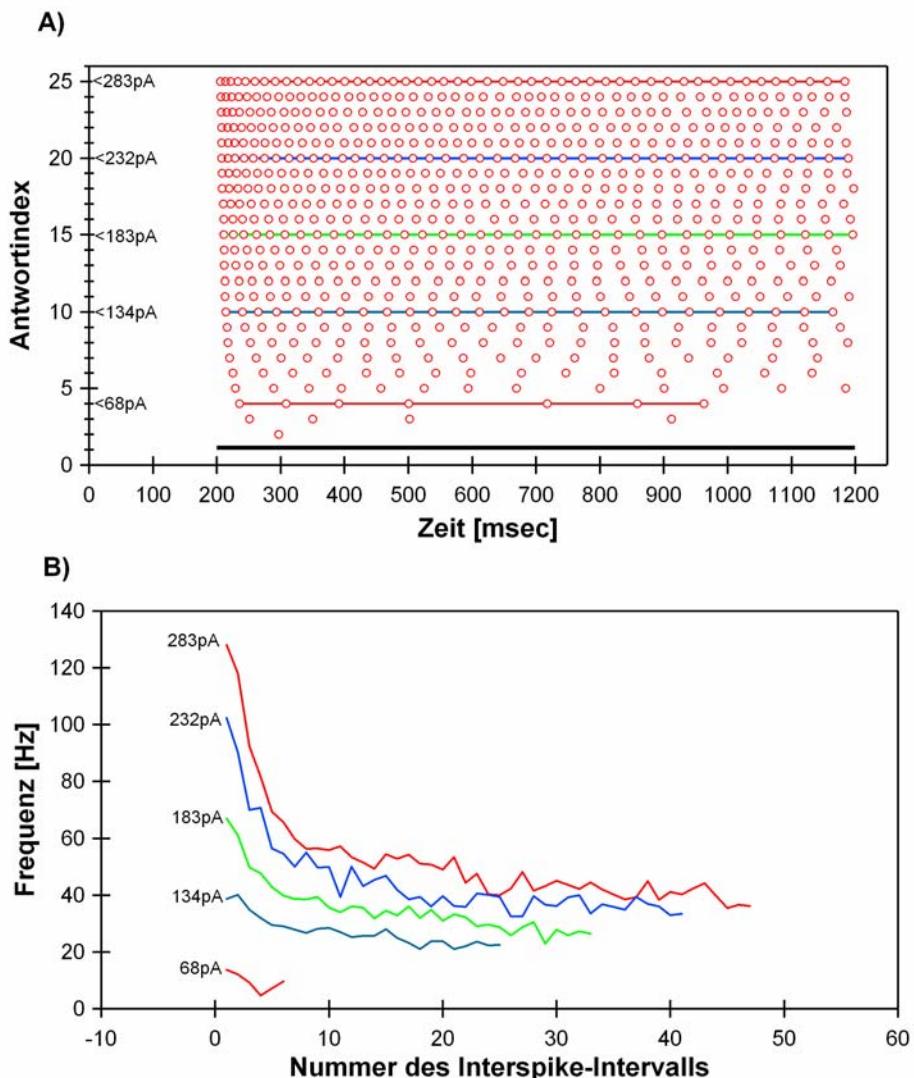


Abb. 36: Quantitative Analyse des Entladungsverhaltens von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus. A: Der Raster-Plot stellt die Zeitpunkte des Auftretens einzelner Aktionspotentiale (offene Kreise) während eines Strompulses dar (Beginn 200 ms, Ende 1200 ms, schwarzer Balken). Der Antwortindex gibt die Nummer der Antwort im Rahmen einer Pulsserie wieder. Die farbigen Linien zeigen die zur Analyse ausgewählten Einzelantworten an. B: Darstellung des Kehrwertes der Interspike-Intervalle (= Frequenz) in Abhängigkeit von der seriellen Nummer des Interspike-Intervalls. In diesem Diagramm sind Kurven bei fünf verschiedenen Stromstärken zu sehen.

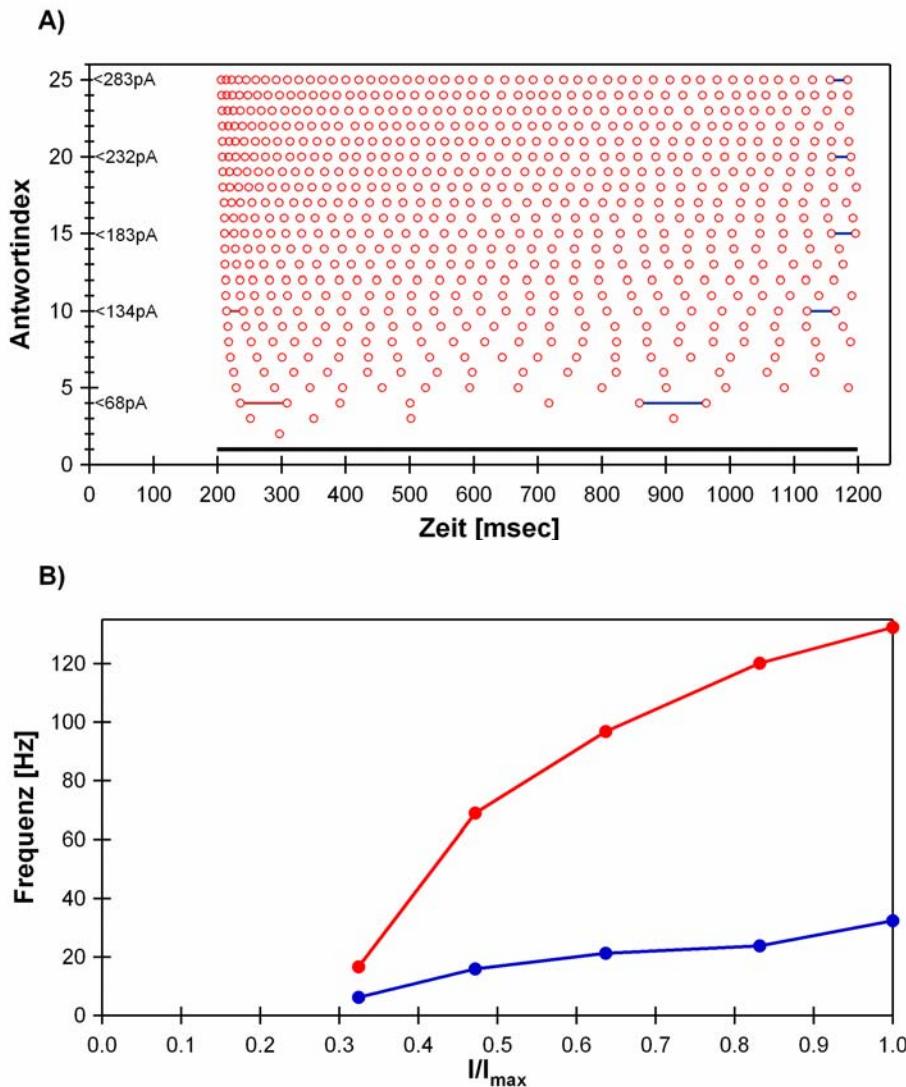


Abb. 37: Quantitative Analyse der Entladungsfrequenz: Abhängigkeit der initialen Frequenz und der Frequenz im Gleichgewicht (Steady State) von der Amplitude des Strompulses. A: Raster-Plot wie in Abbildung 35 A. Die waagrechten Linien zeigen die ausgewerteten Interspike-Intervalle an. B: Abhängigkeit der initialen Entladungsfrequenz (rot) und der Steady State-Frequenz (blau) von der Amplitude des Strompulses.

Zur Analyse des Entladungsverhaltens wurden von jedem registrierten Neuron die Antworten auf Strompulse mit fünf verschiedenen Stromstärken ausgewählt. Als minimale Stromstärke wurde die definiert, die mindestens vier Aktionspotentiale auslöste, als maximale jene, bei der während der hochfrequenten Entladung keine langsame depolarisierende Verschiebung des Membranpotentials im Verlauf der Strominjektion auftrat. Zwischen diesen beiden Extrema wurden noch die Antworten auf drei weitere Stromstärken ausgewählt, die der Hälfte, zwei Fünfteln und vier Fünfteln der maximalen Stromstärke entsprachen.

Um die Zeit- und Stromstärkenabhängigkeit der Entladungsfrequenz zu verdeutlichen, wurde die Frequenz des ersten und die des letzten Interspike-Intervalls als Funktion der Stromstärke aufgetragen (Abb. 37B). Zur Vergleichbarkeit der Messungen in verschiedenen

Altersgruppen, wurde die Stromstärke in Bezug auf die Maximalstromstärke normalisiert (siehe Abb. 38A-D). Die Frequenzen bei minimaler und bei maximaler Stromstärke wurden für den initialen und den Steady State-Bereich getrennt ausgewertet. Dazu wurden die Frequenzen des ersten und des letzten Interspike-Intervalls bei minimaler und maximaler Stromstärke ermittelt (siehe auch Abb. 37A), sowie Mittelwert und Standardabweichung aus den Werten einer Altersstufe errechnet. Somit erhielt man pro Altersgruppe vier Mittelwerte: Einmal die initiale Frequenz bei minimaler und bei maximaler Stromstärke, zum zweiten die Gleichgewichtsfrequenz bei minimaler und bei maximaler Stromstärke. Mit diesen Werten wurde die statistische Analyse durchgeführt (Kruskal-Wallis-Test mit Einzeltests nach Dunn).

Bei allen untersuchten GIN ($n = 147$) konnte, unabhängig von der Altersstufe, eine Frequenzadaptation beobachtet werden. Die Frequenz im initialen Bereich der Spannungsantwort war immer signifikant höher als die im Gleichgewicht am Ende des Strompulses (Mann-Whitney-Test, P6 Initial vs. P6 Steady State: $P = 0,0006$, ab P7: $P < 0,0001$). Außerdem war ein Anstieg der Entladungsfrequenz mit der Reizstromstärke unabhängig vom Alter zu beobachten (Abb. 38A-D). Dieser Effekt unterlag jedoch entwicklungsbedingten Veränderungen.

Bei minimaler Stromstärke zeigten sich nur bei der initialen Frequenz signifikante Unterschiede bei den Werten jüngerer und älterer GIN ($P < 0,0001$). So lagen die Werte des initialen Frequenzbereichs bei P6 und P8 zwischen fünf bis sieben Hertz und steigerten sich, innerhalb der ersten eineinhalb Wochen, auf ungefähr adulte Werte von 12 Hz bis 13 Hz (P18 bis P22). Die Frequenzwerte von P6 bis P8 unterschieden sich hierbei signifikant von den Werten der Altersstufen P18 bis P22 ($P < 0,05$). Nach P10 sind keine solchen Auffälligkeiten mehr nachzuweisen (Abb. 39A und Tab. 7). Im Steady State-Bereich lagen die Frequenzen während des gesamten untersuchten Zeitraums (P6 bis P22) unverändert bei Werten zwischen vier und sechs Hertz ($P = 0,9542$) (Abb. 39B und Tab. 7).

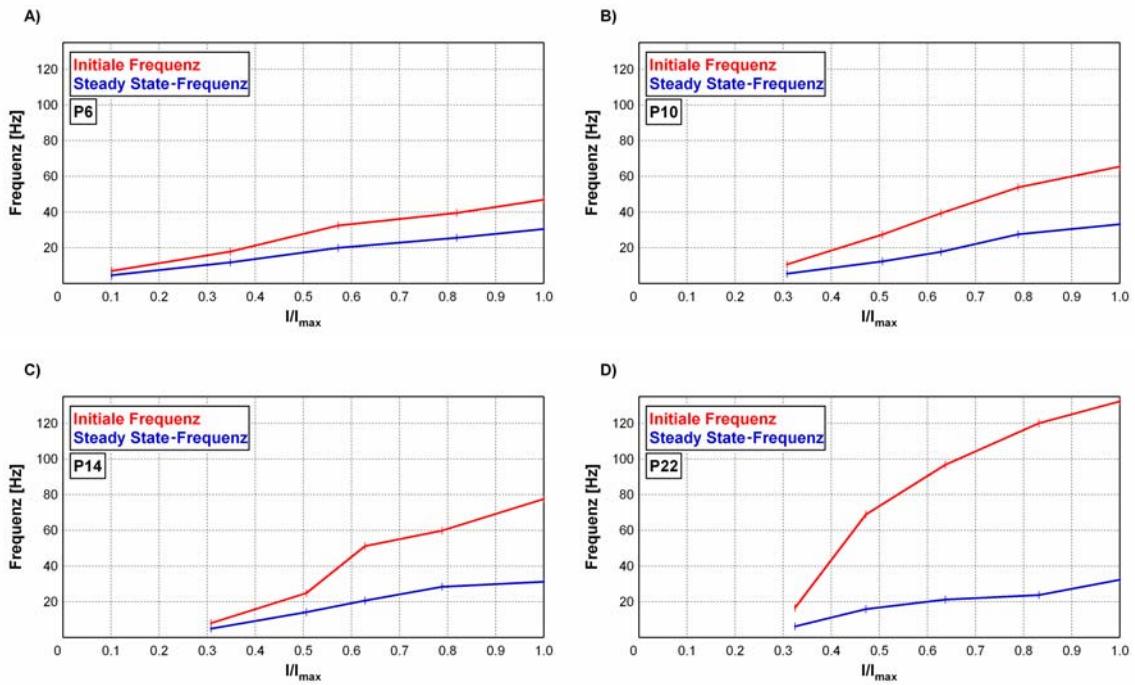


Abb. 38: Entladungsfrequenz im initialen und im Steady State-Bereich in Abhängigkeit der Stromstärke in GIN des sensomotorischen Cortex. Dargestellt sind jeweils die Frequenz des ersten und des letzten Interspike-Intervalls im initialen (rot) und Steady State-Bereich (blau) bei aufsteigender Stromstärke in verschiedenen Altersstufen. Die Reizströme wurden gegen den jeweiligen Maximalstrom normalisiert.

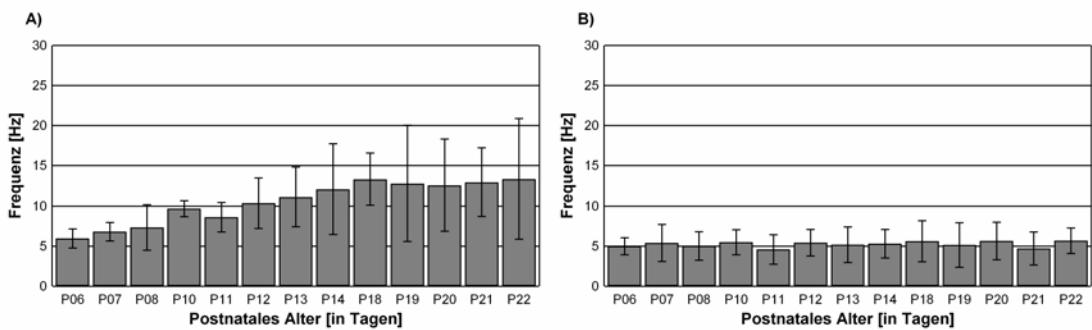


Abb. 39: Postnatale Entwicklung der initialen Frequenz (A) und der Steady State-Frequenz (B) bei minimaler Stromstärke in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Tab. 7: Mittelwerte und Standardabweichung der initialen Frequenz und der Steady State-Frequenz bei Strompuls-induzierten Entladungssalven, hervorgerufen mit minimaler Stromstärke.

Postnatale Tag	n	Initiale Frequenz	Steady State-Frequenz
6	7	5,96 Hz \pm 1,18 Hz	4,99 Hz \pm 1,07 Hz
7	9	6,81 Hz \pm 1,17 Hz	5,40 Hz \pm 2,33 Hz
8	15	7,34 Hz \pm 2,84 Hz	5,02 Hz \pm 1,77 Hz
10	11	9,69 Hz \pm 0,98 Hz	5,50 Hz \pm 1,55 Hz
11	7	8,64 Hz \pm 1,85 Hz	4,59 Hz \pm 1,84 Hz
12	16	10,38 Hz \pm 3,15 Hz	5,44 Hz \pm 1,65 Hz
13	16	11,11 Hz \pm 3,67 Hz	5,20 Hz \pm 2,23 Hz
14	16	12,08 Hz \pm 5,62 Hz	5,31 Hz \pm 1,79 Hz
18	8	13,34 Hz \pm 3,22 Hz	5,61 Hz \pm 2,58 Hz
19	7	12,81 Hz \pm 7,23 Hz	5,16 Hz \pm 2,77 Hz
20	13	12,60 Hz \pm 5,71 Hz	5,65 Hz \pm 2,35 Hz
21	11	12,96 Hz \pm 4,25 Hz	4,73 Hz \pm 2,05 Hz
22	11	13,38 Hz \pm 7,50 Hz	5,70 Hz \pm 1,59 Hz

Bei maximaler Stromstärke fanden sich, sowohl im initialen Bereich als auch im Steady State der Reizantwort, signifikante Unterschiede bei den Frequenzwerten der verschiedenen Altersstufen (jeweils $P < 0,0001$).

Im initialen Bereich zeigte sich eine sehr eindrucksvolle postnatale Entwicklung der Entladungsfrequenz. Die Werte lagen bei P6 bis P8 ca. bei 40 Hz bis 60 Hz und steigerten sich in den ersten zwei postnatalen Wochen auf Werte von bis zu 140 Hz (P18 bis P22). Es ist also eine gut hundertprozentige Erhöhung der initialen Frequenz im Laufe von zwei Wochen der postnatalen Entwicklung der GIN zu beobachten. Der Post-Test nach Dunn zeigte, dass ein signifikanter Unterschied der initialen Frequenzwerte von P6 bis P10 zu den Werten von P18 bis P22 ($P < 0,001$) besteht, und sich die Werte von P11 bis P13 signifikant von denen der Alter P20 bis P22 ($P < 0,05$) unterscheiden (Abb. 40A und Tab. 8, S. 94).

Im Steady State zeigt sich ebenfalls eine signifikante Frequenzerhöhung, allerdings ist diese nicht so spektakulär, wie im initialen Bereich. Hier findet man bei adulten GIN (P18 bis P22) Werte von ca. 40 Hz. Bei jungen GIN liegen die Steady State-Frequenzen im Bereich von 25 Hz bis 30 Hz. Hier zeigt sich auch, dass nur signifikante Unterschiede bei den Werten von P6 bis P8 zu denen von P18 bis P22 existieren ($P < 0,05$). Nach P10 unterscheiden sich die Frequenzwerte der folgenden Alter (P11 bis P22) nicht mehr signifikant ($P > 0,05$) (Abb. 40B und Tab. 8, S.94).

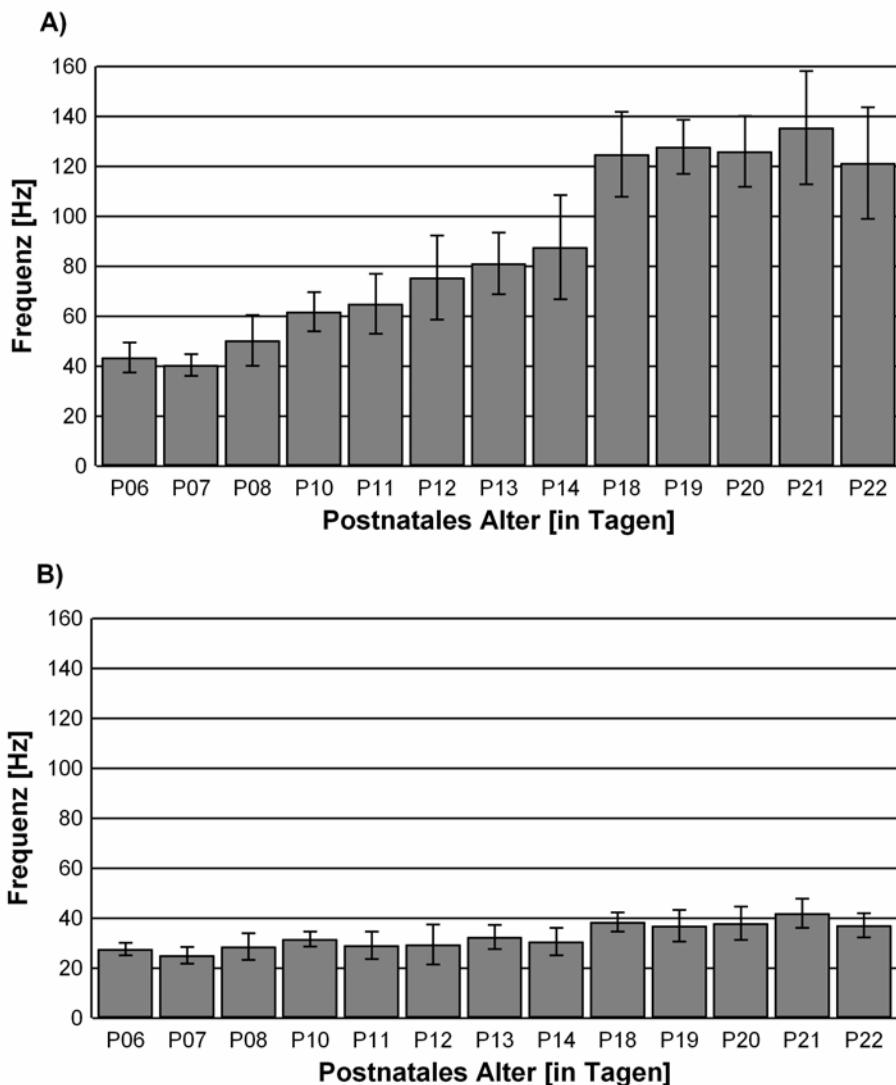


Abb. 40: Postnatale Entwicklung der initialen Entladungsfrequenz (A) und der Steady State-Frequenz (B) bei maximaler Stromstärke in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Dies bedeutet, dass bei jungen GIN nur eine sehr geringe (aber trotzdem signifikante) Frequenzadaptation auftritt, die sich bei älteren GIN jedoch immer stärker ausprägt, bis sie bei adulten Neuronen dieser Population eine fast dreifache Frequenzverringerung (initial vs. Steady State) hervorruft.

Insgesamt liegt also im Initialbereich eine signifikante Erhöhung der Frequenz im Verlauf der postnatalen Entwicklung vor (Abb. 41), sowohl in der Nähe der Schwelle als auch im hochfrequenten Bereich. Der Effekt im Steady State-Bereich ist wesentlich weniger ausgeprägt. Die GIN zeigen dadurch im Verlauf der Reifung eine immer stärker auftretende Frequenzadaptation, die sich als universelles Merkmal dieser Neurone zeigt.

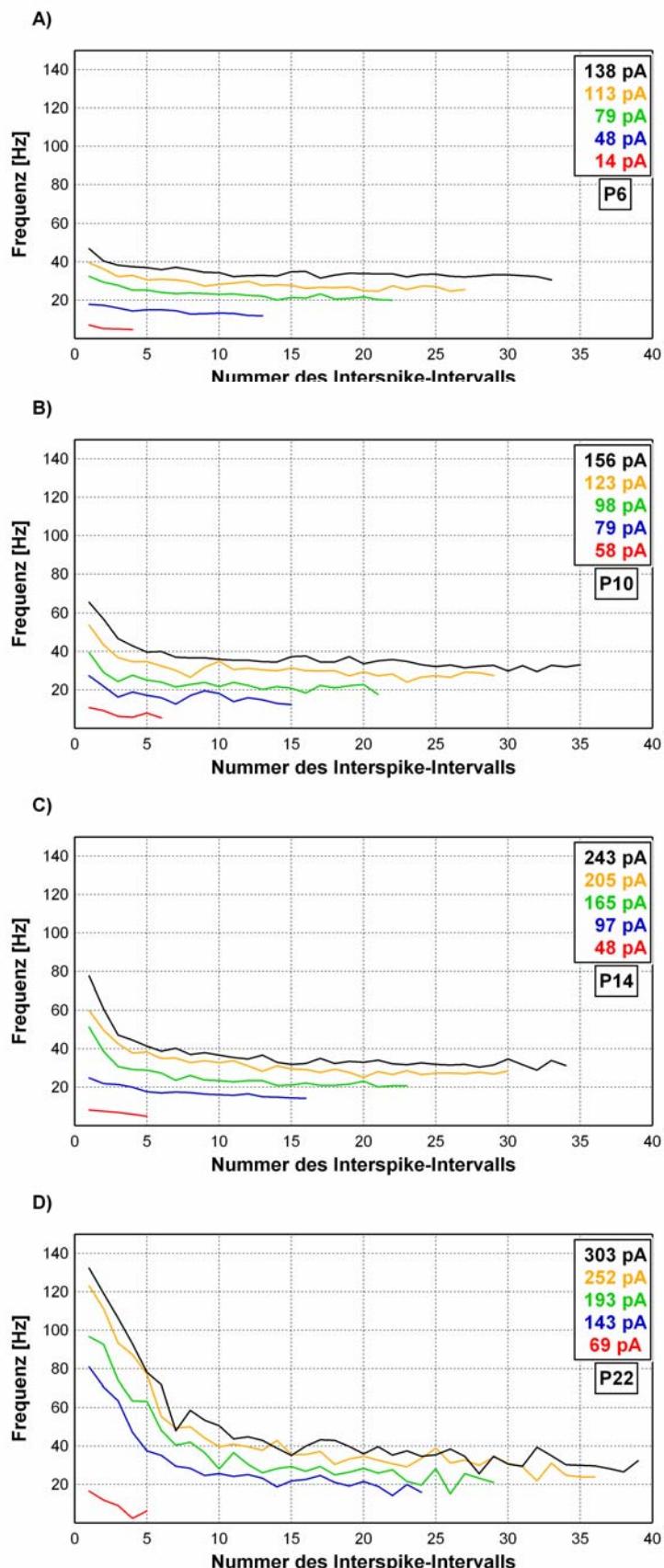


Abb. 41: Entladungsfrequenz und Adaptation während einer Aktionspotentialsalve bei GIN verschiedener Altersstufen. In den Abbildungen ist die Frequenz bei einer bestimmten Reizstromstärke (farblich codiert, rot: minimal, schwarz: maximal) in Abhängigkeit des Interspike-Intervalls dargestellt.

Tab. 8: Mittelwerte und Standardabweichung der initialen Frequenz und der Steady State-Frequenz bei Strompuls-induzierten Entladungssalven, hervorgerufen mit maximaler Stromstärke.

Postnataler Tag	n	Initiale Frequenz	Steady State-Frequenz
6	7	43,49 Hz \pm 6,03 Hz	27,59 Hz \pm 2,47 Hz
7	9	40,48 Hz \pm 4,31 Hz	25,21 Hz \pm 3,41 Hz
8	15	50,27 Hz \pm 10,17 Hz	28,73 Hz \pm 5,33 Hz
10	11	61,83 Hz \pm 7,75 Hz	31,62 Hz \pm 3,04 Hz
11	7	64,98 Hz \pm 12,06 Hz	29,16 Hz \pm 5,43 Hz
12	16	75,56 Hz \pm 16,76 Hz	29,42 Hz \pm 7,93 Hz
13	16	81,09 Hz \pm 12,30 Hz	32,47 Hz \pm 4,81 Hz
14	16	87,60 Hz \pm 20,90 Hz	30,65 Hz \pm 5,54 Hz
18	8	124,91 Hz \pm 16,92 Hz	38,43 Hz \pm 3,90 Hz
19	7	127,90 Hz \pm 10,81 Hz	37,03 Hz \pm 6,35 Hz
20	13	125,96 Hz \pm 14,14 Hz	37,94 Hz \pm 6,62 Hz
21	11	135,47 Hz \pm 22,67 Hz	41,92 Hz \pm 5,80 Hz
22	11	121,26 Hz \pm 22,32 Hz	37,11 Hz \pm 4,76 Hz

4.2.4 Postnatale Entwicklung des synaptischen Zustroms zu GIN im sensomotorischen Cortex der Maus

Um die entwicklungsabhängige Integration der GIN in die corticalen Netzwerke zu untersuchen, wurden die Häufigkeit des Auftretens (d.h. Frequenz) und die Eigenschaften von spontanen postsynaptischen Potentialen analysiert. Dazu wurde in den drei Altersgruppen P6 bis P8, P10 bis P14 und P18 bis P22 die synaptische Aktivität bei Membranpotentialen zwischen -65 und -75 mV über eine Zeitspanne von zwei Minuten registriert und danach Frequenz, Amplituden und Kinetik der Potentialverläufe bestimmt.

4.2.4.1 Frequenz und Amplitudenverteilung

Die Detektion der spontanen synaptischen Ereignisse zur Auswertung erfolgte automatisiert mit einer Suchmaske (Igor 6.0, Wave Metrics, Portland, USA), die alle positiven Potentiale ab einem Schwellenwert von 0,3 mV selektierte und anhand vorgegebener Zeitfenster den Zeitpunkt des Maximums feststellte. Nach diesem ersten automatischen Durchlauf wurden alle gekennzeichneten Potentiale einzeln visuell überprüft und solche ausgeschlossen, bei

denen es sich um unspezifische Schwankungen des Membranpotentials handelte. Als Kriterium zur Unterscheidung von unspezifischen Potentialschwankungen und synaptischen Potentialen wurde der Zeitverlauf der Ereignisse herangezogen. Dieser Zeitverlauf musste dem, des in Abbildung 46 (siehe S. 98) gezeigten synaptischen Potentials entsprechen. Für die nicht ausgeschlossenen Ereignisse wurden dann die mittlere Frequenz bestimmt und gegen die Analysezeit (2 Minuten) in einem sogenannten Ratemeter aufgetragen (siehe Abb. 43). Die mittleren Frequenzen pro Altersgruppe wurden gemittelt und als Funktion des Entwicklungsalters dargestellt. Zur Erstellung von Amplitudenhäufigkeitsdiagrammen und zur Bestimmung der Verlaufskinetik wurden die Registrierungen erneut visuell überprüft, um alle summierten Ereignisse auszuschließen. Die Abbildung 42 zeigt Beispiele für spontane synaptische Aktivität in den verschiedenen Altersgruppen, die Abbildung 43 Ratemeter-Darstellungen.

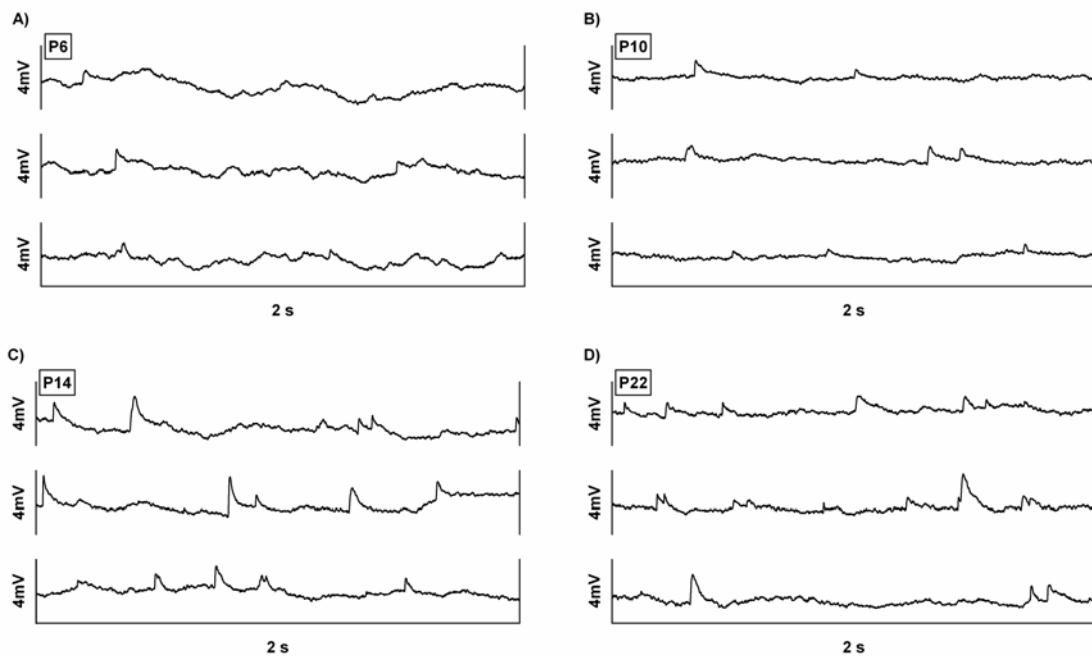


Abb. 42: Spontane synaptische Aktivität in GIN verschiedener Altersgruppen.

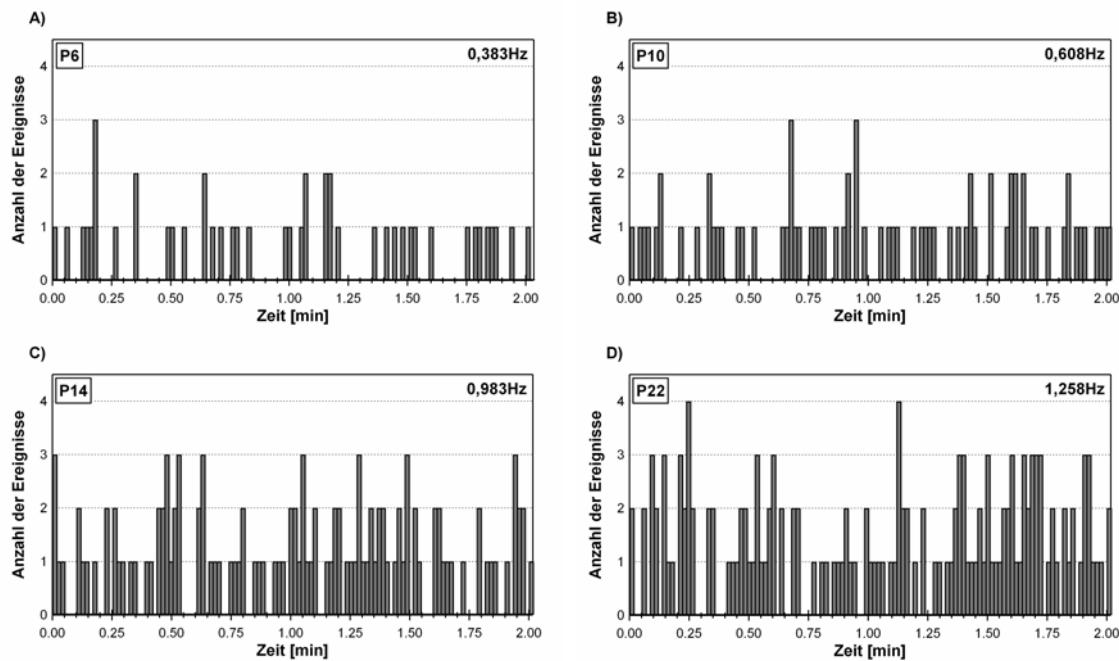


Abb. 43: Ratometer-Darstellungen spontaner synaptischer Potentiale in GIN verschiedener Altersgruppen. Die Zeitpunkte des Auftretens der einzelnen Ereignisse wurde gemessen und in vertikalen Balken mit einer Breite von 1 Sekunde gruppiert. Somit zeigt jeder Balken die Anzahl an Ereignissen pro Sekunde (= Frequenz). Die Zahl in der rechten oberen Ecke eines jeden Diagramms gibt die mittlere Frequenz an [A) P6, B) P10, C) P14, D) P22].

Tab. 9: Frequenz spontaner synaptischer Potentiale in GIN verschiedener Altersgruppen

Postnataler Tag	Mittlere Frequenz spontaner synaptischer Ereignisse
6	0,35 Hz \pm 0,15 Hz / n = 5
7	0,32 Hz \pm 0,18 Hz / n = 4
8	0,40 Hz \pm 0,08 Hz / n = 5
10	0,65 Hz \pm 0,28 Hz / n = 6
11	0,68 Hz \pm 0,32 Hz / n = 3
12	0,87 Hz \pm 0,11 Hz / n = 6
13	0,94 Hz \pm 0,42 Hz / n = 8
14	1,04 Hz \pm 0,32 Hz / n = 5
18	1,09 Hz \pm 0,42 Hz / n = 5
19	1,23 Hz \pm 0,31 Hz / n = 6
20	1,13 Hz \pm 0,43 Hz / n = 6
21	1,22 Hz \pm 0,23 Hz / n = 6
22	1,23 Hz \pm 0,15 Hz / n = 4

Die Bestimmung der mittleren Frequenz in Abhängigkeit vom Entwicklungsalter ergab eine Verdoppelung dieser Frequenz im Verlauf der ersten beiden postnatalen Wochen.

Bei P6, P7 und P8 lagen die mittleren Frequenzen deutlich unter 0,5 Hz, bei P14 bei ca. 1 Hz. In den folgenden Altersgruppen lagen dann die Werte zwischen 1,1 und 1,25 Hz (Abb. 44 und Tab. 9). Die statistische Analyse (Kruskal-Wallis-Test und Dunns Einzeltests) zeigte, dass diese Veränderungen hochsignifikant sind ($P < 0,0001$). Speziell die Frequenzwerte von P6, P7 und P8 zeigen einen signifikanten Unterschied zu denen der Alter ab P19 bis P22 ($P < \text{min. } 0,05$).

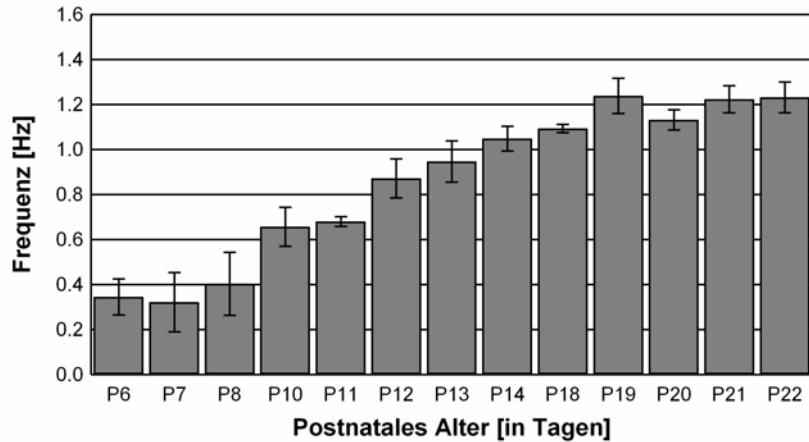


Abb. 44: Postnatale Entwicklung der mittleren Frequenz des synaptischen Zustroms zu GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

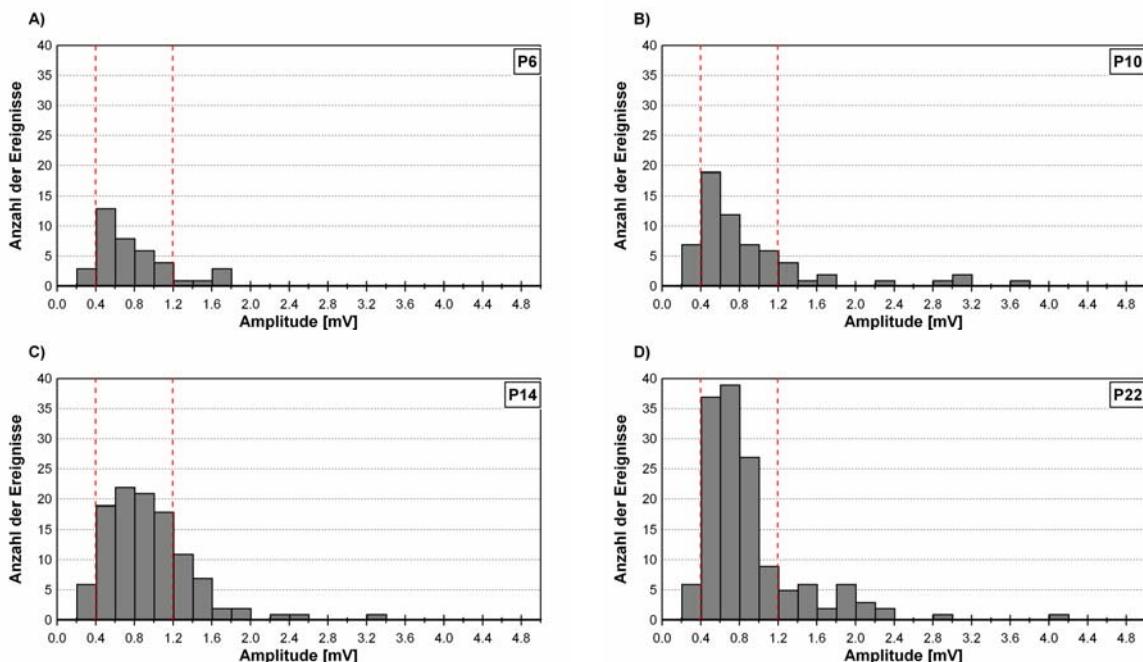


Abb. 45: Häufigkeitsverteilungen der Amplituden spontaner synaptischen Ereignisse, gemessen in GIN verschiedener Altersgruppen. Die meisten Ereignisse finden sich in einem Amplitudenintervall von 0,4 mV bis 1,2 mV (rote vertikale Linien). Diese Grenzen verändern sich nicht während der postnatalen Entwicklung [A) P6, B) P10, C) P14, D) P22].

Die Amplituden der spontanen synaptischen Potentiale wiesen hauptsächlich Werte in einem Bereich von 0,4 mV bis 1,2 mV auf ($n = 5$ pro Altersgruppe) (Abb. 45). Pro Altersgruppe wurde der prozentuale Anteil der Ereignisse in diesem Fenster an den gesamten, erfassten synaptischen Ereignissen errechnet. Aus diesen Prozentwerten wurden pro Altersstufe Mittelwert und Standardabweichung gebildet. Die Prozentwerte der verschiedenen Altersgruppen wurden mit einem Kruskal-Wallis-Test auf signifikante Unterschiede untersucht ($P = 0,3731$). Alle Werte rangierten, unabhängig vom Alter der GIN, zwischen 65% und 80%. Dies zeigt, dass fast alle synaptischen Ereignisse in GIN, unabhängig vom Entwicklungsstadium der Zellen, eine Amplitude zwischen 0,4 mV und 1,2 mV aufwiesen.

4.2.4.2 Verlaufskinetik der spontanen synaptischen Potentiale

Zur Analyse der Verlaufskinetik wurden die spontanen synaptischen Potentiale in zwei Gruppen eingeteilt: Der Gruppe 1 wurden alle Potentiale mit einer Amplitude von 0,3 mV bis 1,5 mV zugeordnet, der Gruppe 2 alle Potentiale mit Amplituden größer als 1,5 mV. Pro Versuch wurden alle erfassten Ereignisse einer Gruppe gemittelt und folgende Kinetikparameter gemessen: Amplituden, Zeit vom Ereignisbeginn bis zum Amplitudenmaximum, Anstiegszeit (gemessen zwischen dem 10%- und dem 90%-Wert der Maximalamplitude), Abfallszeitkonstante und Fläche des Ereignisses (Abb. 46).

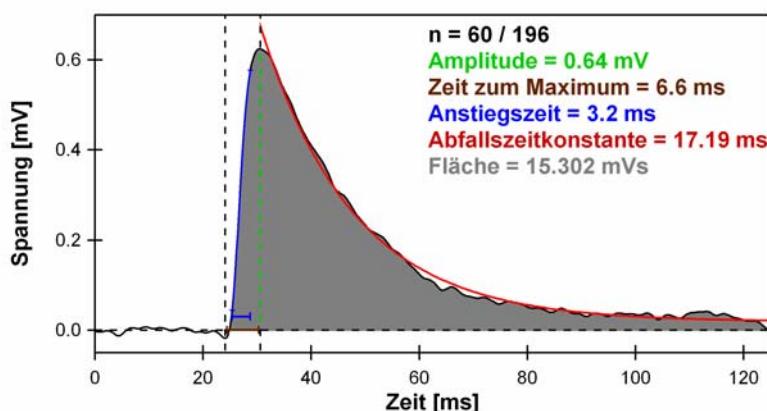


Abb. 46: Parameter der Verlaufskinetik spontaner synaptischer Potentiale in GIN. Die Abbildung zeigt ein, aus 60 Einzelereignissen gemitteltes Signal (Gruppe 1). Die ausgewerteten kinetischen Parameter sind farblich markiert. Die Amplitude wurde von der Basislinie (0 mV) bis zum Maximum des Ereignisses gemessen (grüne Linie). Die Zeit bis zum Erreichen des Maximums ergab sich vom Beginn des Potentials bis zum Zeitpunkt der maximalen Spannung (braune Linie); die Anstiegszeit wurde zwischen den Zeitpunkten gemessen, an denen der Anstieg die Spannungen der 10%-igen und 90%-igen Amplitude durchlief (blaue Linie). Die Abfallszeitkonstante wurde durch Anpassung einer monoexponentiellen Funktion in einem ca. 90 ms dauernden Bereich des Spannungsabfalls ermittelt (rote Linie). Außerdem wurde die Fläche unter dem Potential bestimmt (grauer Bereich).

4.2.4.2.1 Spontane synaptische Potentiale der Gruppe 1

Die Amplituden der spontanen Ereignisse der Gruppe 1 lagen in allen Altersgruppen zwischen 0,65 mV und 0,85 mV (Abb. 47 und Tab. 10). Die statistische Analyse (Kruskal-Wallis-Test, Einzeltests nach Dunn) ergab keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Entwicklungsstufen ($P = 0,3225$). Somit bestätigt sich das bereits oben beschriebene Ergebnis, dass die Amplituden der spontanen synaptischen Potentiale entwicklungsunabhängig sind. Ebenso zeigten weder die Zeit bis zum Erreichen des Maximums noch die Anstiegszeit statistisch signifikante Veränderungen während der postnatalen Entwicklung (Zeit bis zum Erreichen des Maximums: $P = 0,2786$; Anstiegszeit: $P = 0,6106$ [Abb. 47 und Tab. 10]). Die Dauer bis zum Erreichen der Maximalamplitude lag zwischen 6,5 ms und 8 ms, die Anstiegszeit zwischen 3 und 4 ms.

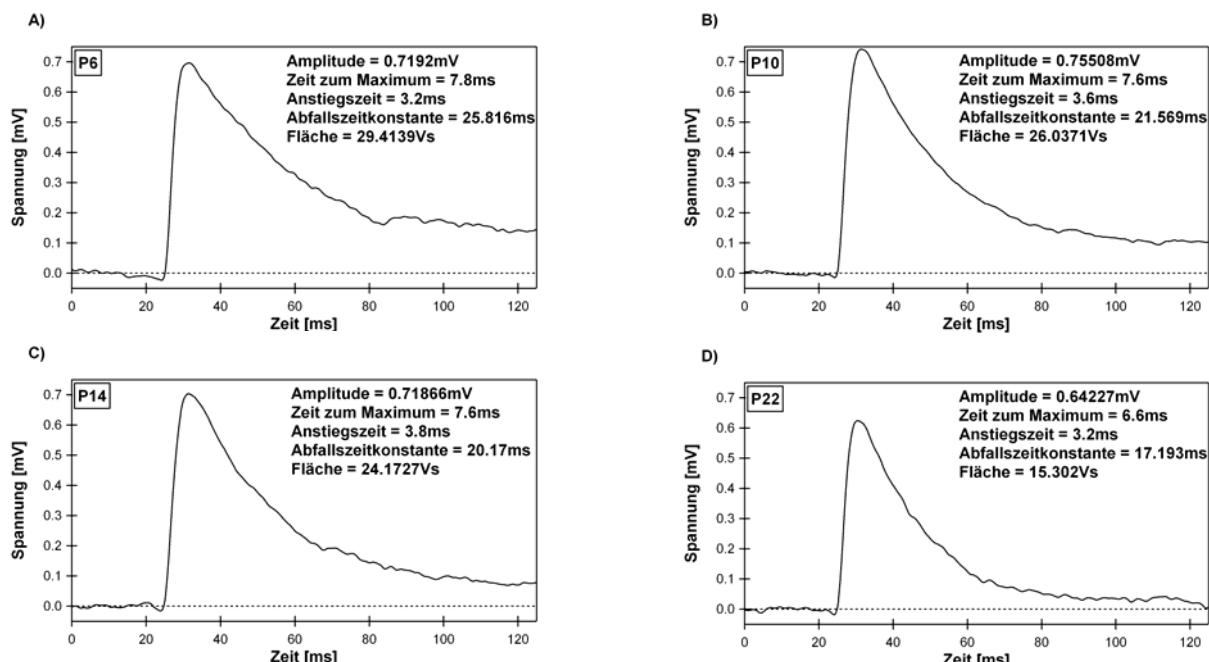


Abb. 47: Beispiele für gemittelte, spontane synaptische Potentiale, gemessen in GIN verschiedener Altersgruppen (Gruppe 1: Amplitude: 0,3 mV bis 1,5 mV).

Im Gegensatz dazu nahm die Abfallszeitkonstante der spontanen synaptischen Potentiale während der postnatalen Entwicklung signifikant ab ($P = 0,0076$). In der Altersgruppe von P6 bis P8 lag sie bei ca. 33 ms, von P18 bis P22 bei ca. 20 ms (Abb. 48 und Tab. 10).

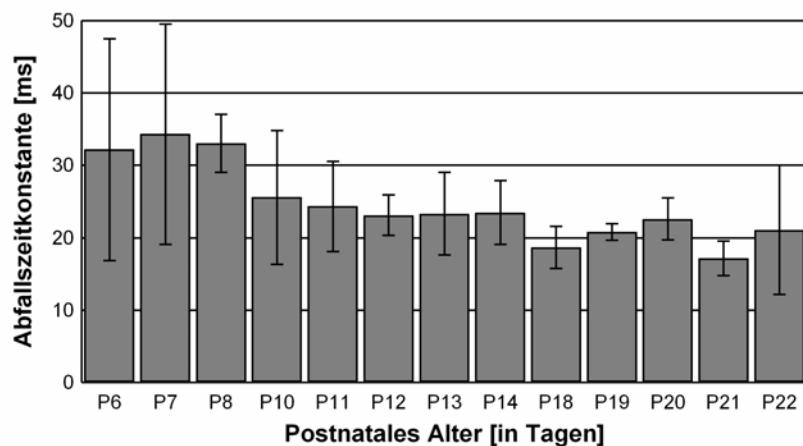


Abb. 48: Postnatale Entwicklung der Abfallszeitkonstante der spontanen synaptischen Potentiale in GIN verschiedener Altersgruppen (Gruppe 1: Amplitude: 0,3 mV bis 1,5 mV).

Die Fläche der spontanen synaptischen Potentiale nahm während der postnatalen Entwicklung ebenfalls signifikant ab ($P = 0,0017$). Die Werte lagen bei den GIN der Altersgruppe P6 bis P8 um die 30 Vs und nahmen bis gegen Ende der untersuchten Periode auf Werte um die 18 Vs ab (Abb. 49 und Tab. 10).

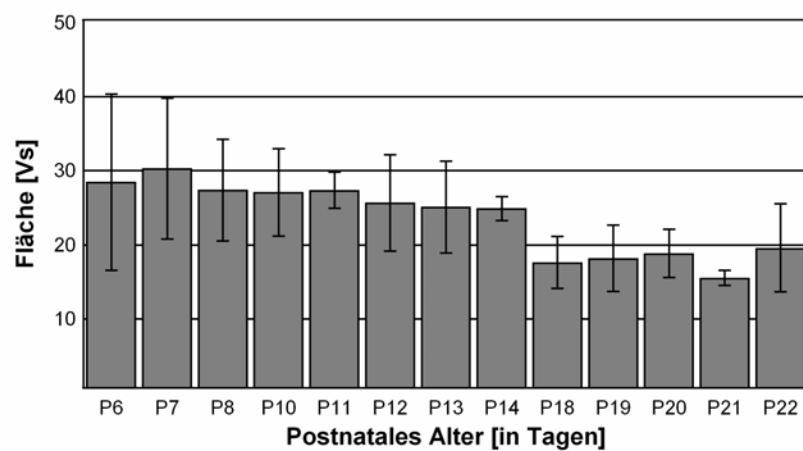


Abb. 49: Postnatale Entwicklung der Fläche von spontanen synaptischen Potentialen in GIN verschiedener Altersgruppen (Gruppe 1: Amplitude: 0,3 mV bis 1,5 mV).

Tab. 10: Kinetikparameter der spontanen synaptischen Potentiale der Gruppe 1.

Postnataler Tag	Anzahl	Amplitude [mV]	Zeit bis zum Maximum [ms]	Anstiegszeit [ms]	Abfallszeitkonstante [ms]	Fläche [Vs]
6	5	0,75 ± 0,08	6,92 ± 0,69	3,32 ± 0,33	32,20 ± 15,33	28,48 ± 11,90
7	4	0,73 ± 0,13	7,80 ± 1,60	3,60 ± 0,40	34,34 ± 15,22	30,29 ± 9,51
8	5	0,76 ± 0,14	7,40 ± 0,55	3,33 ± 0,41	33,02 ± 4,02	27,39 ± 6,86
10	7	0,82 ± 0,09	7,56 ± 0,38	3,63 ± 0,45	25,56 ± 9,23	27,09 ± 6,86
11	3	0,80 ± 0,02	7,86 ± 0,90	3,66 ± 0,42	24,30 ± 6,21	27,33 ± 2,44
12	7	0,75 ± 0,09	7,62 ± 0,80	3,54 ± 0,34	23,14 ± 2,74	25,66 ± 6,48
13	8	0,74 ± 0,09	8,05 ± 0,79	3,77 ± 0,39	23,33 ± 5,67	25,11 ± 6,20
14	5	0,74 ± 0,05	7,64 ± 1,08	3,75 ± 0,10	23,48 ± 4,37	24,89 ± 1,57
18	4	0,68 ± 0,02	7,40 ± 0,80	3,46 ± 0,31	18,70 ± 2,90	17,63 ± 3,53
19	6	0,72 ± 0,08	7,96 ± 0,50	3,68 ± 0,30	20,83 ± 1,17	18,20 ± 4,48
20	6	0,73 ± 0,04	7,56 ± 0,43	3,70 ± 0,41	22,59 ± 2,87	18,86 ± 3,28
21	6	0,71 ± 0,06	7,02 ± 0,26	3,40 ± 0,40	17,17 ± 2,40	15,53 ± 1,012
22	5	0,69 ± 0,07	7,56 ± 1,09	3,60 ± 0,51	21,10 ± 8,93	19,58 ± 5,92

4.2.4.2.2 Spontane synaptische Potentiale der Gruppe 2

Die Abbildung 50 zeigt Beispiele für spontane synaptische Potentiale verschiedener Altersstufen, die der Gruppe 2 (Amplitude > 1,5 mV) zugeordnet wurden; in der Tabelle 11 sind die Parameter der Verlaufskinetik in Abhängigkeit vom Alter aufgelistet.

Die Amplituden der großen, spontanen synaptischen Ereignisse veränderten sich während des Beobachtungszeitraumes von drei Wochen nicht signifikant ($P = 0,5703$). Sie lagen zwischen 2,2 mV und 2,7 mV (Tab. 11). Die Zeit bis zum Erreichen der Maximalamplitude war bei den großen synaptischen Ereignissen ebenfalls ein Parameter, dessen Änderungen statistisch nicht signifikant waren ($P = 0,1344$). Alle Werte befanden sich in einem Bereich zwischen 7,5 mV und 9,5 ms (Tab. 11). Auch bei der Anstiegszeit der großen synaptischen Ereignisse konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen beobachtet werden ($P = 0,4421$; Tab. 11).

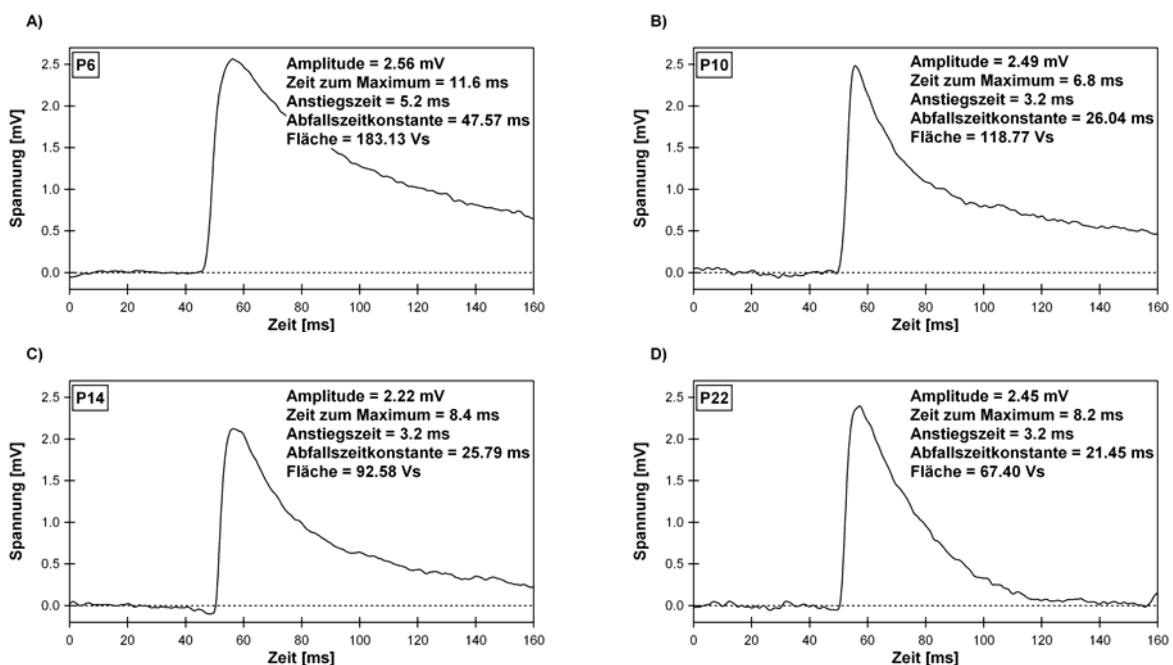


Abb. 50: Beispiele für gemittelte, spontane synaptische Potentiale, gemessen in GIN verschiedener Altersgruppen (Gruppe 2: Amplitude > 1,5 mV).

Bei der Abfallszeitkonstante der großen, spontanen synaptischen Ereignisse ergab sich, wie bei den kleinen Ereignissen, eine deutliche und statistisch signifikante Verkürzung ($P = 0,0017$). Während bei den Neuronen junger Tiere die Werte zwischen 35 ms und 45 ms variierten, lagen sie bei Neuronen älterer Mäuse zwischen 20 ms und 23 ms (Abb. 51 und Tab. 11).

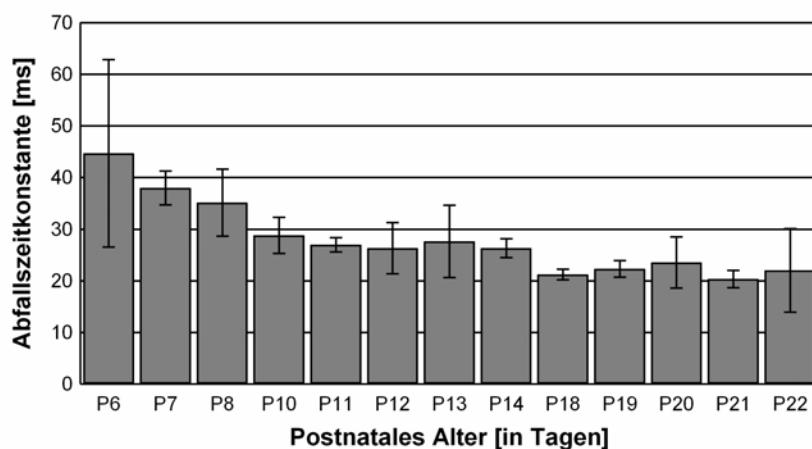


Abb. 51: Postnatale Entwicklung der Abfallszeitkonstante der spontanen synaptischen Potentiale in GIN verschiedener Altersgruppen (Gruppe 2: Amplitude > 1,5 mV).

Die Fläche der großen, spontanen synaptischen Potentiale nahm mit zunehmendem Entwicklungsalter signifikant ab ($P = 0,0065$). Die Potentiale in Neuronen junger Tiere hatten Flächen von 150 Vs bis 170 Vs (Abb. 52 und Tab.11). Im Verlauf der Entwicklung nahmen diese auf Werte zwischen 40 Vs und 60 Vs ab.

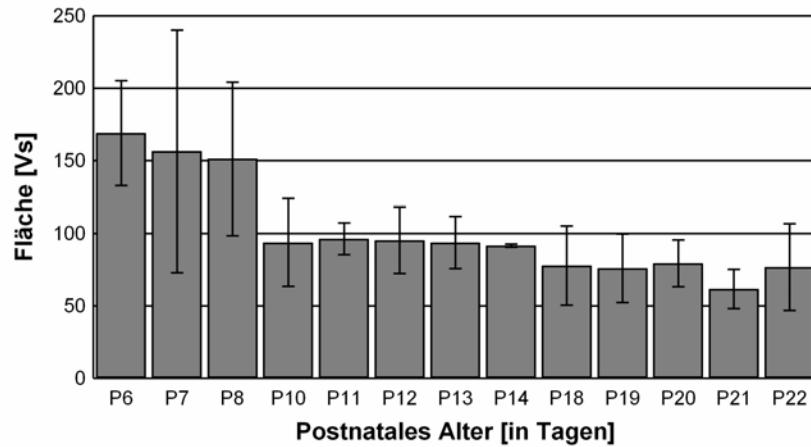


Abb. 52: Postnatale Entwicklung der Fläche von spontanen synaptischen Potentialen in GIN verschiedener Altersgruppen (Gruppe 2: Amplitude > 1,5 mV).

Tab. 11: Kinetikparameter der spontanen synaptischen Potentiale der Gruppe 2.

Postnataler Tag	Anzahl	Amplitude [mV]	Zeit bis zum Maximum [ms]	Anstiegszeit [ms]	Abfallszeitkonstante [ms]	Fläche [Vs]
6	5	$2,50 \pm 0,52$	$9,10 \pm 0,42$	$3,93 \pm 0,23$	$44,67 \pm 18,18$	$168,9 \pm 36,12$
7	4	$2,43 \pm 0,70$	$8,80 \pm 0,85$	$4,20 \pm 0,88$	$38,02 \pm 3,29$	$156,5 \pm 83,54$
8	5	$2,52 \pm 0,58$	$8,55 \pm 1,38$	$4,00 \pm 0,67$	$35,16 \pm 6,47$	$151,3 \pm 52,96$
10	7	$2,47 \pm 0,54$	$7,63 \pm 0,71$	$3,57 \pm 0,48$	$28,83 \pm 3,52$	$93,77 \pm 30,30$
11	3	$2,40 \pm 0,28$	$7,70 \pm 0,42$	$3,53 \pm 0,46$	$26,98 \pm 1,39$	$96,45 \pm 10,96$
12	7	$2,18 \pm 0,27$	$7,51 \pm 0,74$	$3,40 \pm 0,16$	$26,34 \pm 4,93$	$95,43 \pm 22,84$
13	8	$2,60 \pm 0,37$	$7,94 \pm 0,71$	$3,60 \pm 0,57$	$27,63 \pm 7,03$	$93,63 \pm 17,85$
14	5	$2,35 \pm 0,24$	$9,15 \pm 0,53$	$3,35 \pm 0,82$	$26,33 \pm 1,84$	$91,71 \pm 0,94$
18	4	$2,70 \pm 0,58$	$8,10 \pm 1,07$	$3,60 \pm 0,20$	$21,23 \pm 1,02$	$77,97 \pm 27,42$
19	6	$2,28 \pm 0,41$	$7,80 \pm 1,08$	$3,50 \pm 0,50$	$22,32 \pm 1,60$	$75,92 \pm 23,63$
20	6	$2,19 \pm 0,16$	$7,76 \pm 1,01$	$3,60 \pm 0,49$	$23,55 \pm 4,97$	$79,40 \pm 16,23$
21	6	$2,40 \pm 0,29$	$7,84 \pm 1,10$	$3,28 \pm 0,33$	$20,31 \pm 1,67$	$61,74 \pm 13,56$
22	5	$2,28 \pm 0,31$	$7,20 \pm 0,72$	$3,20 \pm 0,35$	$22,01 \pm 8,12$	$76,94 \pm 29,83$

Insgesamt zeigte sich, dass sich während der postnatalen Entwicklung bei den spontanen synaptischen Potentialen drei Eigenschaften, unabhängig von der Größe der Amplitude der Potentiale, veränderten: Die Frequenz der Ereignisse nahm mit zunehmendem postnatalen Alter zu, die Abfallszeitkonstante der Potentiale wurde im gleichen Zeitraum kürzer und die Fläche der Potentiale wurde kleiner.

4.2.4.3 Sensitivität der spontanen synaptischen Potentiale gegenüber Glutamat- und GABA_A-Rezeptorantagonisten

Um Hinweise auf die Neurotransmitter zu bekommen, die an der Vermittlung der spontanen synaptischen Potentiale beteiligt sind, wurde die Sensitivität dieser Potentiale gegenüber Glutamat- und GABA_A-Rezeptorantagonisten untersucht. Die Messungen wurden an Neuronen der Altersgruppen P6 bis P8 (n = 6), P10 bis P14 (n = 4) und P18 bis P22 (n = 3) durchgeführt. Von den abgeleiteten Neuronen wurde zunächst die Spontanaktivität während einer zehn Minuten dauernden Kontrollperiode registriert. Dann wurden folgende Substanzen kumulativ der Badlösung zugesetzt und für jeweils 15 Minuten in das Organbad eingewaschen: Bicucullin (10 μ M, GABA_A-Rezeptorantagonist), D-AP-5 (20 μ M, kompetitiver Antagonist am NMDA-Rezeptor) und CNQX (10 μ M, AMPA/Kainatrezeptorantagonist). Während dieses Applikationsvorganges wurde die Spontanaktivität synaptischer Potentiale kontinuierlich aufgenommen. Um die Reversibilität der Substanzwirkungen zu zeigen, wurden die Antagonisten durch normale Perfusionslösung ausgewaschen. Mit Hilfe von Ratemeter-Darstellungen wurde die mittlere Frequenz der spontanen Ereignisse bestimmt. Analysen zur Wirksamkeit der Antagonisten auf die Verlaufskinetik der spontanen synaptischen Potentiale wurden nicht vorgenommen. Die Abbildung 53 stellt beispielhaft Ratemeter-Diagramme dar, die in einem Neuron (P8) in An- und Abwesenheit der verschiedenen Antagonisten ermittelt wurden. In der Altersgruppe von P6 bis P8 hatten die untersuchten GIN während der Kontrollaufnahmen eine mittlere Frequenz von 0,89 Hz. Die Applikation von Bicucullin hatte eine geringfügige Reduktion der mittleren Frequenz zur Folge (auf 0,77 Hz). Nach der Zugabe von D-AP-5 sank die mittlere Frequenz auf 0,67 Hz ab. Eine fast vollständige Ausschaltung der Aktivität erfolgte nach der Zugabe des AMPA/Kainat-Blockers CNQX. Die Frequenz lag im Mittel nur noch bei 0,03 Hz. Nach dem Waschvorgang kehrten die Frequenzwerte zurück auf ein Niveau von ca. einem Hertz.

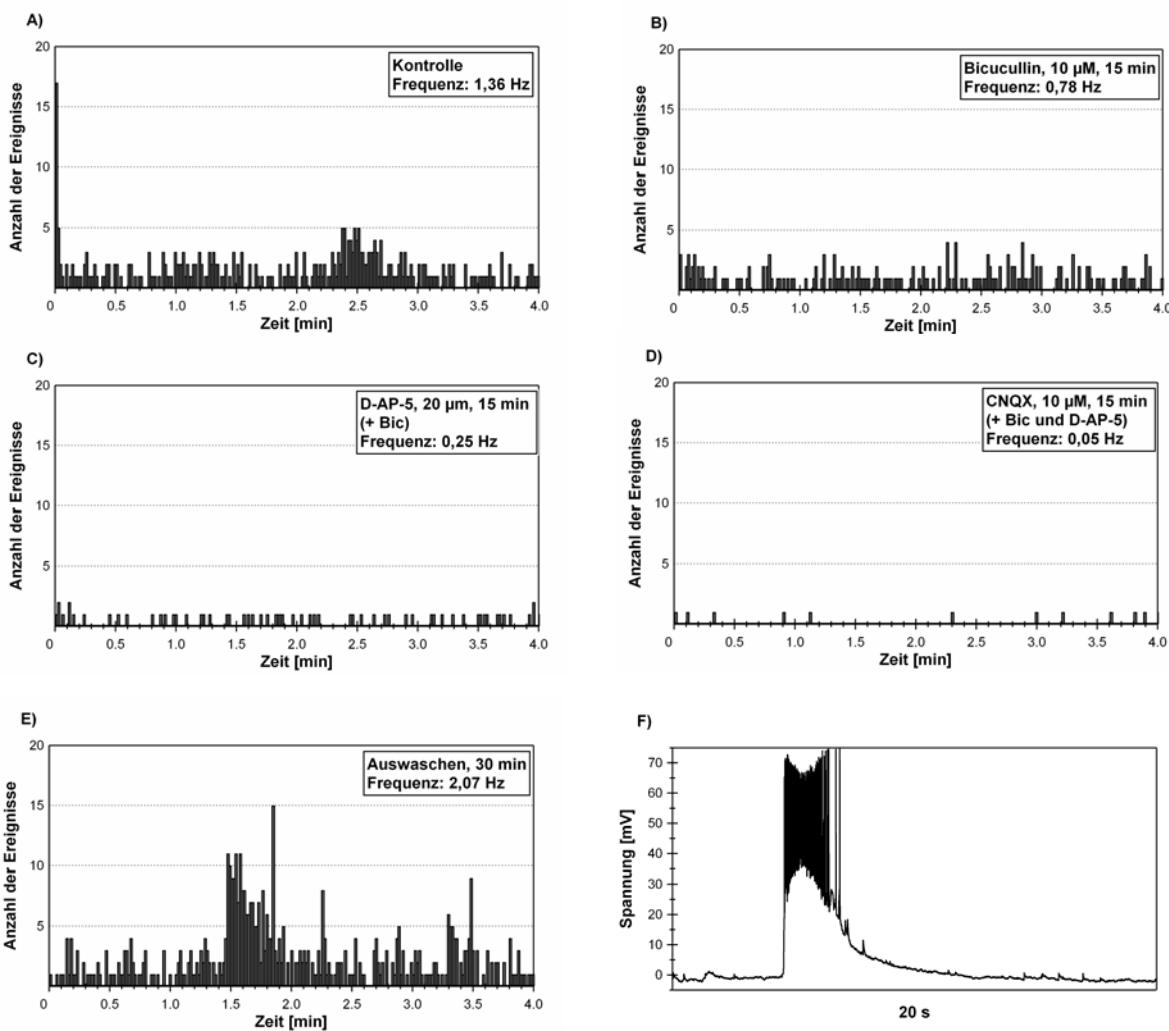


Abb. 53: Beispiel für die Wirkung der kumulativen Applikation verschiedener Rezeptorantagonisten in einem GIN einer acht Tage alten Maus. A - E: Ratemeter-Diagramme, gemessen unter Kontrollbedingungen und nach mindestens 10-minütiger Anwesenheit der jeweiligen Antagonisten. F: ausgeprägte und lang andauernde Membrandepolarisation (paroxysmale Depolarisation) in Gegenwart von Bicucullin.

Der Friedman-Test für gepaarte, aber nicht normalverteilte Werte zeigte, dass sich die Mittelwerte der mittleren Frequenzen in Gegenwart der verschiedenen Antagonisten signifikant unterscheiden ($P = 0,0021$). Diese Signifikanz beruhte v.a. auf Unterschieden zwischen der mittleren Frequenz, gemessen in Gegenwart von CNQX, und allen anderen Werten (Dunns Einzeltests: $P < 0,05$, Abb. 54). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass in dieser Entwicklungsstufe der direkte synaptische Zustrom zu GIN vor allem erregender Natur ist und durch AMPA/Kainatrezzeptoren vermittelt wird. Allerdings konnten nach Gabe von Bicucullin sogenannte paroxysmale Depolarisationen beobachtet werden (Abb. 53F). Das

Auftreten dieser Depolarisationen nach Blockade der GABA_A-Rezeptoren bedeutet, dass die GIN zu diesem Entwicklungszeitpunkt bereits in ein hemmendes Netzwerk eingebettet sind.

In der zweiten Altersgruppe (P10 bis P14) war die mittlere Frequenz der synaptischen Spontanaktivität entwicklungsbedingt höher als in der ersten Altersgruppe (Abb. 55 und Abb. 56). Zugabe von Bicucullin bewirkte auch hier eine Abnahme der Frequenz von 0,95 Hz auf 0,78 Hz. Bei der folgenden Applikation von D-AP-5 zeigte sich eine leichte Erhöhung der Frequenz auf ca. 1,08 Hz. Bei der nachfolgenden Gabe von CNQX wurde die spontane Aktivität mehr oder weniger vollständig geblockt. Die Wirkung der Antagonisten war reversibel. Nach dem 30-minütigen Auswaschen der Substanzen betrug die mittlere Frequenz wieder 0,73 Hz.

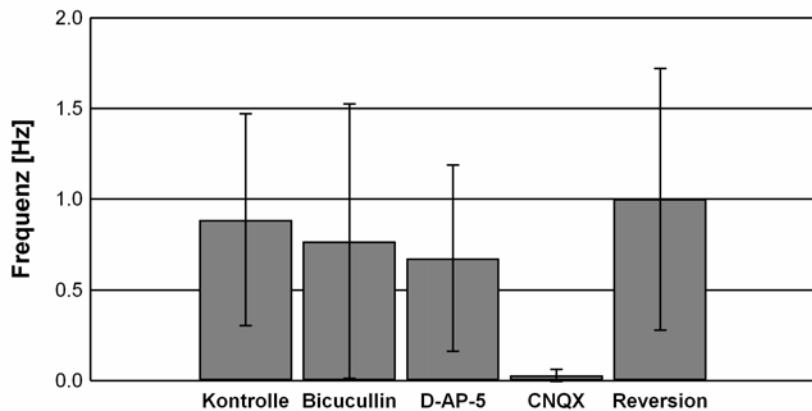


Abb. 54: Wirkungen von Glutamat- und GABA_A-Rezeptorantagonisten auf die mittlere Frequenz spontaner synaptischer Potentiale (Altersgruppe P6 bis P8).

Der Friedmantest (inkl. Dunns Einzeltests) zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten ($P = 0,0224$). Auch hier beruht die Signifikanz vor allem auf dem Effekt des AMPA/Kainatrezzeptorantagonisten CNQX. Wie in der ersten Altersgruppe traten auch bei P10 bis P14 paroxysmale Depolarisationen in Gegenwart von Bicucullin auf (Abb. 56F).

In der letzten der drei Altersgruppen (P18 bis P22) war die mittlere Frequenz der spontanen synaptischen Potentiale unter Kontrollbedingungen wiederum entwicklungsbedingt höher als in den beiden vorhergehenden Altersgruppen (2,03 Hz). Nach der Gabe von Bicucullin erniedrigte sich die mittlere Frequenz auf 1,49 Hz, und D-AP-5 drückte diese im Folgenden weiter auf ca. 1,22 Hz. Durch Zugabe von CNQX wurden fast alle synaptischen Ereignisse blockiert und, die mittlere Frequenz senkte sich ab auf 0,01 Hz. Nach dem

Auswaschen der Substanzen wurde eine mittlere Frequenz von 0,83 Hz gemessen (Abb. 57 und 58).

Der Friedmantest zeigte auch in dieser Gruppe einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der mittleren Frequenz der verschiedenen Applikationen an ($P = 0,0151$). Auch in dieser Altersgruppe waren in Gegenwart von Bicucullin paroxysmale Depolarisationen zu beobachten (Abb. 57F).

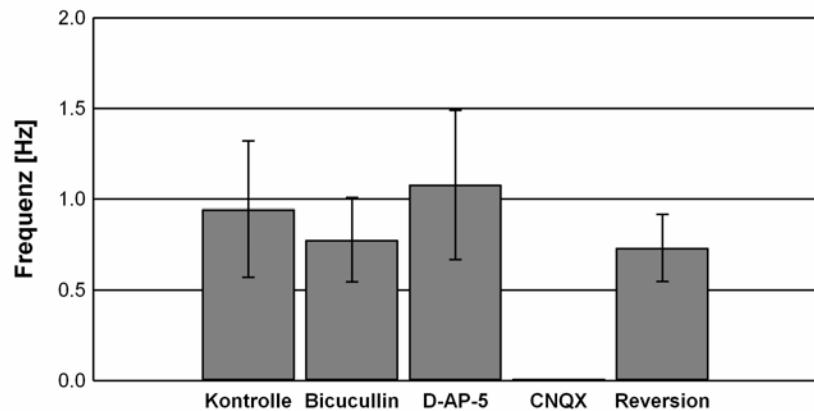


Abb. 55: Wirkungen von Glutamat- und GABA_A-Rezeptorantagonisten auf die mittlere Frequenz spontaner synaptischer Potentiale (Altersgruppe P10 bis P14).

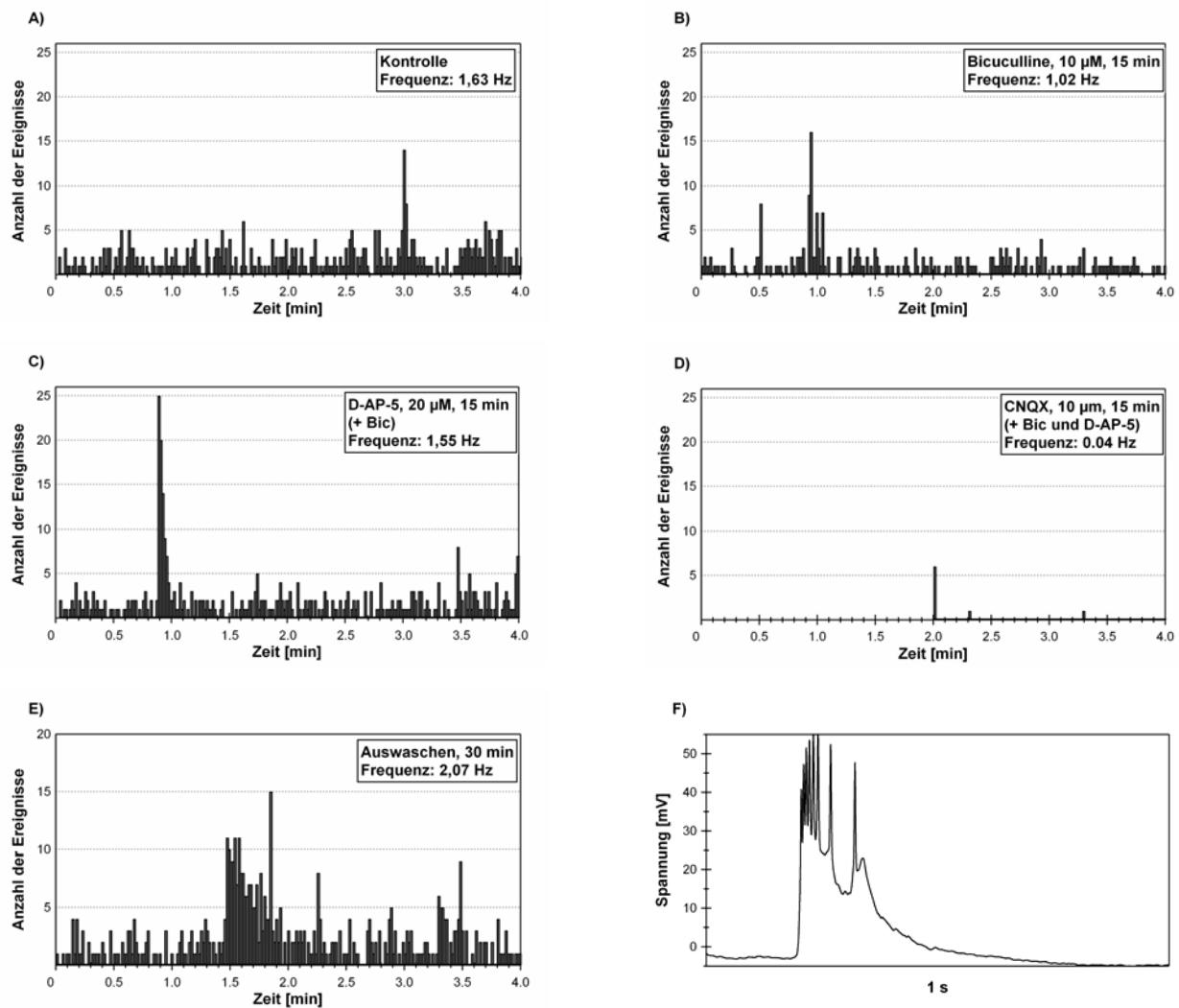


Abb. 56: Beispiel für die Wirkung der kumulativen Applikation verschiedener Rezeptorantagonisten in einem GIN einer vierzehn Tage alten Maus. A - E: Ratemeter-Diagramme, gemessen unter Kontrollbedingungen und nach mindestens 10-minütiger Anwesenheit der jeweiligen Antagonisten. F: ausgeprägte und lang andauernde Membranpolarisation (paroxysmale Depolarisation) in Gegenwart von Bicucullin.

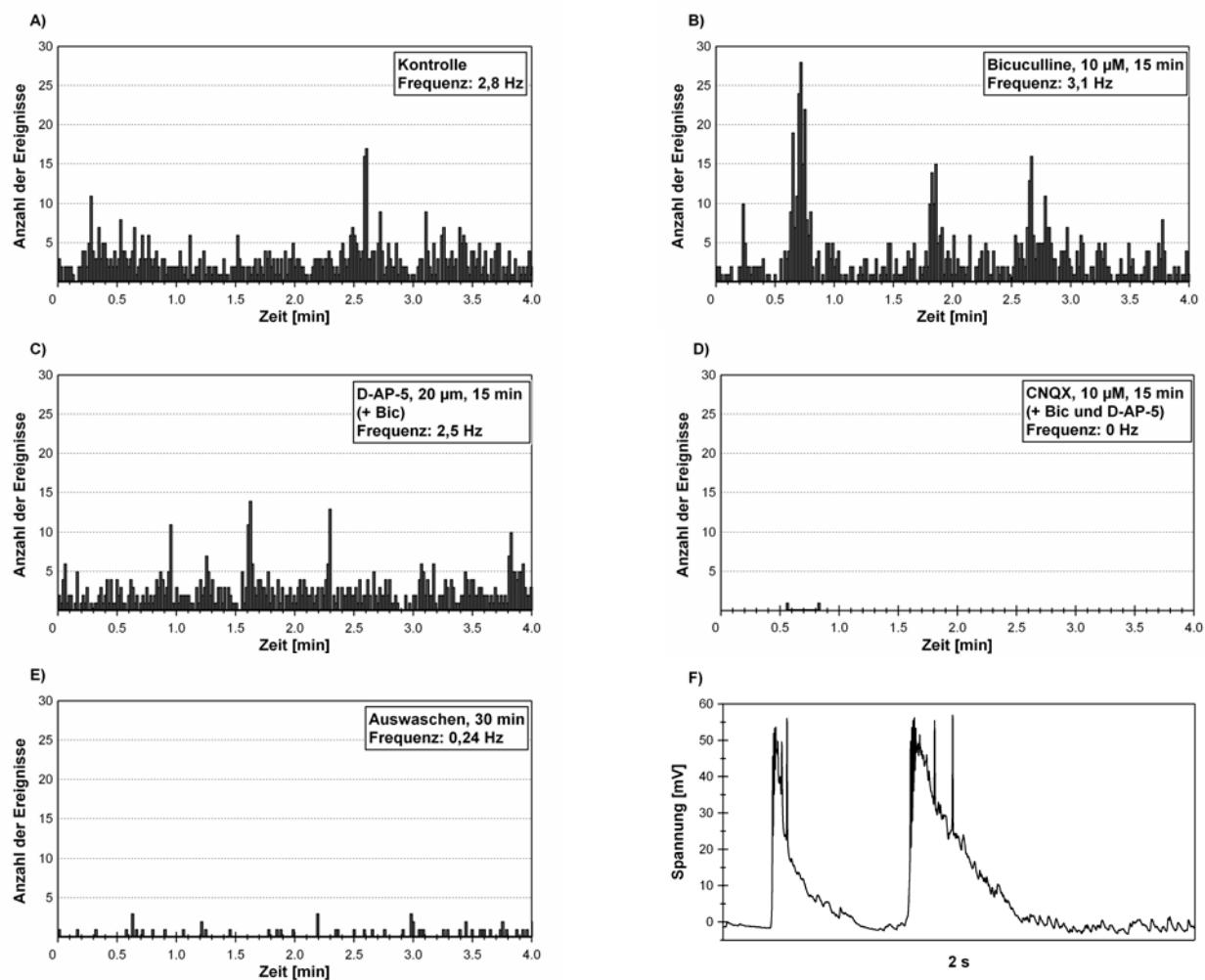


Abb. 57: Beispiel für die Wirkung der kumulativen Applikation verschiedener Rezeptorantagonisten in einem GIN einer 22 Tage alten Maus. A - E: Ratemeter-Diagramme, gemessen unter Kontrollbedingungen und nach mindestens 10-minütiger Anwesenheit der jeweiligen Antagonisten. F: ausgeprägte, lang andauernde und repetitive Membrandepolarisationen (paroxysmale Depolarisation) in Gegenwart von Bicucullin.

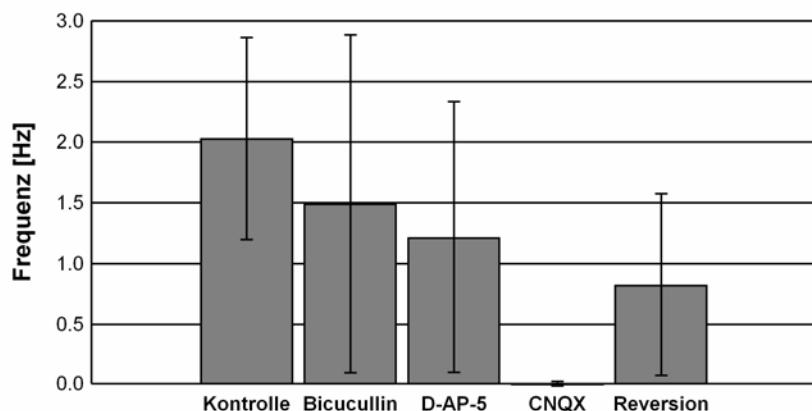


Abb. 58: Wirkungen von Glutamat- und GABA_A-Rezeptorantagonisten auf die mittlere Frequenz spontaner synaptischer Potentiale (Altersgruppe P18 bis P22).

4.2.4.4 GABA-vermittelte spontane synaptische Potentiale

Bisher wurde dargestellt, dass GIN bereits ab dem sechsten postnatalen Tag erregenden synaptischen Zustrom erhalten, der durch AMPA/Kainatrezzeptoren vermittelt wird. Da der GABA_A-Rezeptorantagonist Bicucullin keine signifikanten Wirkungen auslöste, könnte man annehmen, dass die GIN nur zu einem geringen Umfang mit hemmendem synaptischem Zustrom versorgt werden. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass die bisherigen Messungen bei Membranpotentialen um die -70 mV, also in der Nähe des Chloridgleichgewichtspotentials in den GIN (-82 mV), durchgeführt wurden. Da die elektromotorische Kraft für chloridabhängige Potentiale unter diesen Bedingungen nicht stark ist, könnten spontane GABA_A-Rezeptor-vermittelte Potentiale unterhalb der Detektionsgrenze geblieben sein. Aus diesem Grund wurden in den Altersgruppen P10 bis P14 (n = 5) und P18 bis P22 (n = 6) Messungen durchgeführt, bei denen die Lösung der Pipette eine Chloridkonzentration enthielt, die der extracellulären Chloridkonzentration entsprach. Das Gleichgewichtspotential befand sich somit bei ca. 0 mV, d.h. es bestand eine starke elektromotorische Kraft für chloridabhängige Potentiale.

Bei diesen Versuchen wurde nach einer vierminütigen Kontrollperiode der Perfusionslösung der Natriumkanalblocker TTX (0,25 μ M) zugesetzt. Da TTX die Aktionspotential-abhängige Transmitterfreisetzung blockierte, konnten unter diesen Bedingungen auftretende spontane synaptische Potentiale nur noch zu Synapsen erzeugt werden, die sich direkt auf dem abgeleiteten Neuron befanden und Neurotransmitter spontan freisetzten. Wie aus der Abbildung 59 (vgl. A mit B) zu ersehen ist, wurde bei Ableitung mit einer „Hochchloridlösung“ in der Pipette eine relativ hohe mittlere Frequenz beobachtet, die sich nach Applikation von TTX kaum änderte.

Wurde nun der Badlösung noch Bicucullin (10 μ M) zugesetzt, dann kam es zu einem völligen Verschwinden der Aktivität (Abb. 58C). Vergleicht man die mittleren Frequenzen unter Kontrollbedingungen von Ableitung mit einer hohen Chloridkonzentration in der Patch-Pipette mit denen, die bei normaler Chloridkonzentration gefunden wurden, stellt man fest, dass zwischen diesen Versuchsbedingungen kein signifikanter Unterschied bestand. Im Mittel lagen die mittleren Frequenzen der Kontrolle unter Hochchloridbedingungen in der Altersgruppe P10 bis P14 bei 0,87 Hz und in der Gruppe P18 bis P22 bei 2,13 Hz. Unter normalen Bedingungen betrugen die entsprechenden Werte: P10 bis P14: 0,94 Hz und P18 bis P22: 2,12 Hz.

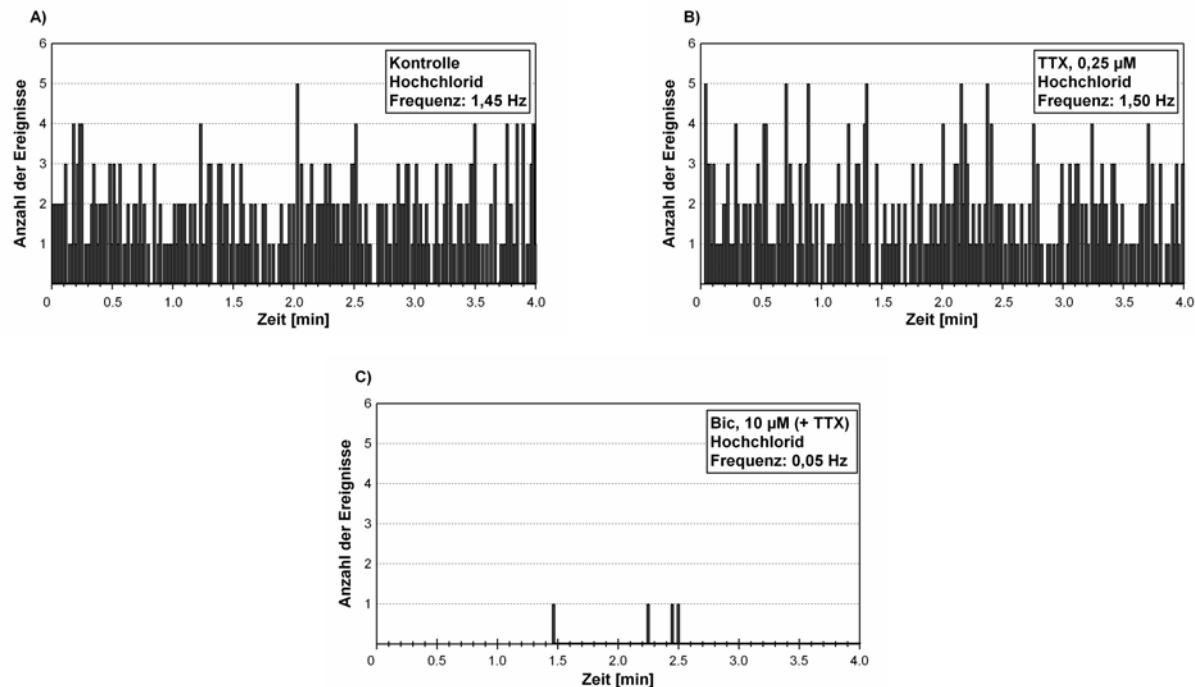


Abb. 59: Einfluss des GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin auf die mittlere Frequenz spontaner synaptischer Ereignisse in einem GIN einer achtzehn Tage alten Maus.
Die Lösung der Patch-Pipette enthielt eine Chloridkonzentration, die der extrazellulären Chloridkonzentration entsprach. A: Kontrollmessung, B: Messung nach Applikation von TTX, C: Messung nach Applikation von Bicucullin.

In beiden Altersgruppen zeigte sich, dass eine Applikation von TTX kaum eine Reduktion in der Frequenz der synaptischen Ereignisse hervorrief (P10 bis P14: 0,62 Hz; P18 bis P22: 1,50 Hz) und dass Bicucullin zu einer nahezu vollständigen Blockade der Aktivität führte (Abb. 60).

Dies bedeutet, dass die GIN neben dem bereits erwähnten glutamatergen Zustrom über AMPA/Kainatrezzeptoren ebenfalls einen GABAergen Eingang über GABA_A-Rezeptoren erhalten, der bereits ab P10 vorhanden ist. In der Altersgruppe von P6 bis P8 konnten diese Versuche nicht durchgeführt werden, da diese Hochchloridbedingungen keine stabilen lang andauernden Messungen zuließen.

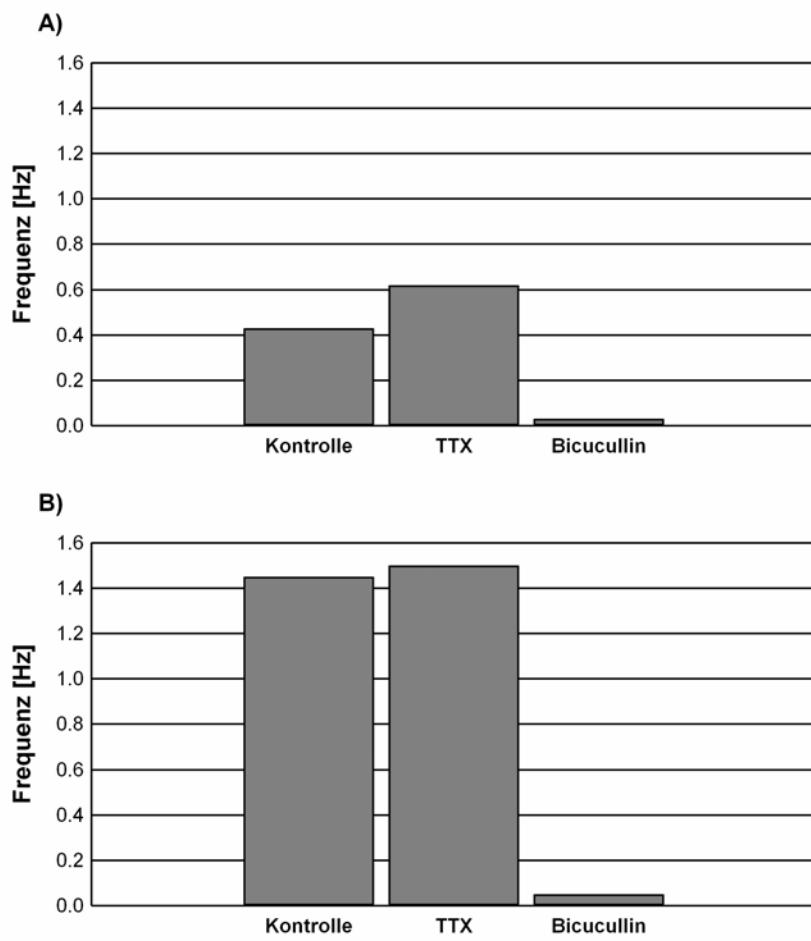


Abb. 60: Wirkungen von TTX und GABA_A-Rezeptorantagonisten auf die mittlere Frequenz spontaner synaptischer Potentiale (A: Altersgruppe P10 bis P14, B: Altersgruppe P18 bis P22).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden immunhistochemische und elektrophysiologische Methoden angewendet, um die postnatale Entwicklung einer definierten Population an GABAergen Interneuronen zu untersuchen. Die Experimente wurden an Gehirnschnitten des sensomotorischen Cortex einer transgenen Mauslinie durchgeführt, in der das Strukturen für das grün-fluoreszierende Protein unter Kontrolle des Gad67-Promotors steht (Olivia et al., 2000). In diesen Mäusen können die sogenannten GIN (GFP-exprimierende Interneurone) anhand ihrer Fluoreszenzmarkierung identifiziert werden. Die Namensgebung „GIN“ ist irreführend, weil in diesen Mäusen bei weitem nicht alle GABAergen Interneurone markiert sind. In der Literatur ist der Name „GIN“ aber mittlerweile fest mit den GFP-positiven Neuronen in den FVB-Tg(GadGFP)45704Swn/J-Mäusen assoziiert.

5.1 Methodenbetrachtungen

5.1.1 Immunhistochemische Methoden

Die immunhistochemischen Methoden dienten dem Nachweis verschiedener Marker, von denen bekannt ist, dass sie spezifisch in GIN exprimiert werden (Xu et al., 2006). Hierzu gehören vor allem das Neuropeptid Somatostatin und das Calcium-bindende Protein Calretinin. Der Nachweis des GFP wurde herangezogen, um bestimmen zu können, wann während der postnatalen Entwicklung die GIN erstmals im sensomotorischen Cortex auftreten. Die BrdU-Technik wurde eingesetzt, um das Geburtsdatum der GIN festzustellen.

Bei den Experimenten zur Bestimmung des Geburtsdatums der GIN wurden die interkalierenden Eigenschaften von BrdU genutzt. Diese Substanz wird während der Mitose in die DNA von Zellen eingebaut. Dadurch werden solche Zellen markiert, die während der BrdU-Gabe mitotisch aktiv waren. Mit dieser Technik sind allerdings einige Probleme verbunden. Die Halbwertszeit von BrdU im Körper der Versuchstiere ist begrenzt (ca. zwei Stunden, Takahashi et al., 1992). Deshalb mussten die BrdU-Applikationen wiederholt vorgenommen werden, damit die BrdU-Konzentration im Körper einen ausreichenden Wirkspiegel erreicht. In der vorliegenden Arbeit erfolgten die BrdU-Gaben nur in einem Zeitraum von ca. acht Stunden des jeweiligen embryonalen Tages. Häufigere Applikationen versetzen die Muttertiere in Stresszustände, die im schlimmsten Fall zum Abort der

Embryonen führen können. Somit geben die Resultate zu den Geburtsdaten der GIN nur einen groben Überblick über die Periode der Neurogenese dieser Zellen. Trotz dieser Einschränkungen können aus den Versuchsergebnissen wichtige Schlussfolgerungen gezogen werden, vor allem die, dass die GIN offenbar während einem relativ langen Zeitraum der Neurogenese GABAerger Neurone (von E9 bis E17, [Butt et al. 2007; Miyoshi et al., 2007]) generiert werden.

Um über die Verteilung und das erste Auftreten von GIN im sensomotorischen Cortex einen Überblick zu erhalten, wurden mit Hilfe von GFP-Immunfärbungen Karten des Neocortex verschiedener Altersstufen angefertigt. Die dazu gewählte Schnittdicke von 50 µm war ein Kompromiss zwischen Genauigkeit der Übersicht und zusätzlichen Verfahren (z.B. Agareinbettung, Kryoschnitte), die notwendig sind, um Strukturen in dünneren Schnitten zu erhalten. Um eine möglichst große Auflösung zu gewährleisten, wurden die Karten aus mehreren, sich überlappenden Bildausschnitten eines horizontalen Cortexschnittes hergestellt. Da es sich hierbei um ein äußerst zeitaufwendiges Verfahren handelt, wurde auf die Rekonstruktion aller gefärbten Gehirnschnitte eines Tieres verzichtet. Dies schränkt die Auflösung der Karten etwas ein, jedoch sollten anhand dieser Karten nur der Zeitpunkt des Auftretens und die Verteilung der GIN im Neocortex festgestellt werden.

Die Analyse der postnatalen Entwicklung der Expression von molekularen Markern in GIN war ein weiterer Punkt, der mit immunhistochemischen Methoden untersucht wurde. Das Neuropeptid SST und das Calcium-bindende Protein CR wurden nachgewiesen, und ihre Expressionsentwicklung in Verbindung mit der GFP-Coexpression analysiert. Generell spielen hier die Nachweisgrenzen der Peptide bzw. Proteine bei Anwendung von Antikörpern eine Rolle. Hinzu kommt die Art und die Empfindlichkeit der zur Detektion der Antikörper eingesetzten Fluorochrome. Während der ersten Tage der postnatalen Entwicklung könnte es aber Probleme mit der Nachweisgrenze von Peptiden und Proteinen geben. Wenn man davon ausgeht, dass die Expression der Markerproteine in einer Zelle im Verlauf der Entwicklung allmählich zunimmt, so kann es sein, dass in sehr jungen Zellen die Marker in geringem Ausmaß bereits vorhanden, aber auf Grund der geringen Konzentration durch Antikörper nicht nachweisbar sind. Das könnte bedeuten, dass der Beginn der nachweisbaren Markerexpression nicht identisch ist mit dem biologischen Expressionsbeginn. Es kann natürlich nicht festgestellt werden, wie groß der Unterschied zwischen diesen beiden

Zeitpunkten ist. Der in dieser Arbeit beschriebene postnatale Entwicklungsverlauf könnte also etwas früher beginnen als angegeben.

Die eben beschriebene Problematik trifft im Übrigen auch auf die GFP-Expression zu. Wenn hier festgestellt wird, dass GFP-positive Neurone im sensomotorischen Cortex erstmals um P5 auftreten, dann bedeutet das exakt ausgedrückt, dass GFP ab diesem Entwicklungstag unter den gegebenen Versuchsbedingungen nachweisbar war. Es bedeutet auf keinen Fall, dass diese Neurone vor diesem Zeitpunkt (P5) im sensomotorischen Cortex nicht vorhanden waren. Selbstverständlich können Zellen existieren, die dann an Ort und Stelle zu nachweisbaren GIN differenzieren.

Zur morphologischen Rekonstruktion einzelner GIN wurden die Zellen während der elektrophysiologischen Ableitung mit Biocytin gefüllt. Allerdings birgt diese Methode einige Schwierigkeiten, die nicht zu umgehen sind. Nach dem Füllen der Neurone muss die Elektrode vorsichtig vom Soma abgezogen werden, um die Zelle möglichst wenig zu beschädigen. Teilweise wird hierbei das Neuron einer starken mechanischen Belastung ausgesetzt, die zu Veränderungen in der Morphologie (z.B. Abreißen von Neuriten, Veränderung der Form des Somas, Veränderung in der Form der proximalen Neuriten) führen können. Dies ist ein systematischer Fehler dieser Technik. Die einzige Möglichkeit zur Verhinderung von morphologischen Veränderungen ist ein sehr schonendes Vorgehen während der Ableitung.

Eine zweite Schwierigkeit ist die gleichmäßige Verteilung des injizierten Biocytins im Neuron. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Biocytin distale Abschnitte der Dendriten und der Axone nicht erreicht. Um eine möglichst gute und vollständige Verteilung des Biocytins zu erreichen, wurden die gefüllten GIN vor der Fixierung noch mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in begaster physiologischer Lösung nachinkubiert, um den Prozess der Diffusion zu unterstützen. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der größte Teil der Neurone mit Biocytin gefüllt werden konnte.

Bei der anschließenden konfokalen Darstellung der GIN und ihrer manuellen Rekonstruktion aus den digitalen Einzelbildern wurden die teilweise sehr stark verästelten Strukturen der GIN so genau wie möglich erfasst. Schwankungen in der Fluoreszenz (z.B. bei verschiedenen dicken Neuriten) lassen es leider nicht zu, die Möglichkeit einer „Überstrahlung“ von sehr feinen und damit sehr wenig fluoreszenten Neuriten auszuschließen. Zudem war, besonders um das Soma herum, ein starker Hintergrund vorhanden, der die Rekonstruktion in diesen Bereichen schwierig, aber nicht ganz unmöglich machte. Die erlangten Ergebnisse

geben einen guten Aufschluss über den Grad der morphologischen postnatalen Entwicklung der GIN, was für die angewandte Methode spricht. Bei der Sholl-Analyse wurde nicht zwischen Dendriten und Axonen unterschieden. Deshalb wird bei der Beschreibung der Ergebnisse von der Neuritenentwicklung gesprochen.

5.1.2 Elektrophysiologische Methoden

Bei den in dieser Arbeit angewendeten elektrophysiologischen Methoden handelt es sich um Techniken, die seit langem etabliert sind. Es wurden ausnahmslos Spannungsmessungen mit Hilfe der sogenannten diskontinuierlichen Strominjektion durchgeführt (Sutor und Hablitz, 1989). Diese hat im Vergleich zu einer Messung mit der Brückennmethode den Vorteil, dass Veränderungen des Elektrodenwiderstandes sich nicht stark auswirken können, da auf Grund des schnellen Wechsels zwischen Strominjektion und Spannungsmessung die letzteren nicht durch über die Elektrode fließenden Strom verändert werden können. Der kritische Punkt bei der diskontinuierlichen Strominjektion ist der Abgleich der Elektrodenkapazität, der während der Experimente ständig überprüft wurde.

Für die Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften während verschiedener Stadien der postnatalen Entwicklung der GIN wurde das Membranpotential durch Gleichstrominjektion auf einen Wert von -70 mV eingestellt. Dieses Potential wurde gewählt, weil es in der Nähe des natürlichen Ruhemembranpotentials der GIN liegt (zwischen -65 mV und -75 mV). Die Einstellung des Membranpotentials auf einen festen Wert wurde vorgenommen, um die Ergebnisse der Messungen aus unterschiedlichen Neuronen verschiedener Altersstufen vergleichen zu können. Wie sich gezeigt hat, sind die GIN mit zeit- und spannungsabhängigen Membranleitfähigkeiten ausgestattet. Solche Leitfähigkeiten sind z.B. für die Abhängigkeit des Eingangswiderstandes vom Membranpotential verantwortlich (Nunez-Abades et al., 1993). Diese Abhängigkeit wirkt sich u.a. auf das Entladungsverhalten der Neurone aus, so dass Entladungsmuster, die bei unterschiedlichen Membranpotentialen registriert wurden, selbst im selben Neuron nicht ohne weiteres vergleichbar sind.

5.2 Entwicklung von GFP-positiven Neuronen des sensomotorischen Cortex von FVB-Tg(GadGFP)45704Swn/J-Mäusen

5.2.1 Pränatale Entwicklung der GIN

Über den Ursprung und die pränatale Entwicklung der GIN lassen sich im Rahmen dieser Arbeit nur Mutmaßungen anstellen. Mit den Ergebnissen der Geburtsdatenbestimmung und den Informationen über die Markermoleküle der GIN – SST und CR – lassen sich aber bestimmte Schlussfolgerungen bezüglich des Geburtsortes und der pränatalen Entwicklung dieser speziellen Neurone ziehen. Wie bereits in der Einleitung geschildert, stammt der Großteil der corticalen GABAergen Interneurone bei Nagetieren aus der ganglionären Eminenz (Metin et al., 2006; Wonders und Anderson, 2006; Marin und Rubenstein, 2003; Xu et al., 2003). Als andere mögliche Quellen wurden zudem das Septum (Taglialatela et al., 2004; Anderson et al., 1999), das anteriore entopendunculäre Areal (Sussel et al., 1999; Meyer et al., 1998) und auch corticale Gebiete (Bellion et al., 2003; He et al., 2001; Götz et al., 1995) beschrieben. Allerdings ist der Beitrag der corticalen Gebiete zur Generation von GABAergen Interneuronen eher gering. Die ganglionäre Eminenz ist mit sehr großer Wahrscheinlichkeit das Hauptgebiet für die Produktion der verschiedenen Interneurone.

Die ganglionäre Eminenz gliedert sich in einen medialen, einen lateralen und einen caudalen Bereich (Butt et al., 2007; Wonders und Anderson, 2006), die deutliche Unterschiede bei der Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren ausweisen (Fogarty et al., 2007). Diese Faktoren werden mit der großen Heterogenität der GABAergen Interneurone in Verbindung gebracht. So wird in der MGE vor allem Nkx2.1 exprimiert, in der LGE Er81 zusammen mit Gsh2 (dorsaler Bereich) oder nur Er81 (ventraler Bereich). In der ventralen CGE Nkx2.1 exprimiert, in der dorsalen CGE Er81 und Gsh2 (Butt et al., 2007; Wonders und Anderson, 2006; Wonders und Anderson, 2005). Die Grenze zwischen MGE und LGE wird durch einen Bereich, in dem neben Gsh2 auch Pax6 exprimiert wird, festgelegt (Stoykova et al. 2000, Sussel et al., 1999). Die CGE ist die caudale Fortsetzung der MGE und LGE. Diese Kombination an Transkriptionsfaktoren, die je nach Ursprung in den späteren Neuronen exprimiert werden, scheinen wichtig zu sein bei der Festlegung der adulten Phänotypen der verschiedenen Interneurone. Oft sind diese Phänotypen zu diesem frühen Zeitpunkt noch gar nicht ausgeprägt, sondern entstehen erst im späteren Verlauf der Entwicklung.

Anhand dieser Fakten und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können über den Ursprung der GIN in der ganglionären Eminenz und über ihre Migrationsrouten in den Neocortex einige Vermutungen angestellt werden.

5.2.1.1 Ursprung der GIN in der ganglionären Eminenz

Die GIN werden in einem Zeitraum von E11 bis E17 geboren (mit einem Maximum bei E13 bis E15), zudem exprimieren sie SST und CR. Ungefähr zwei Drittel der SST- oder PV-exprimierenden Interneurone stammen aus der MGE (Wonders und Anderson, 2006; Sussel et al., 1999). In diesem Teil der GE wird Nkx2.1 exprimiert, ein Transkriptionsfaktor, der offensichtlich für die Festlegung der Interneurone auf die Expression von SST oder PV verantwortlich ist (Butt et al., 2005; Xu et al., 2004; Wichterle et al., 2001). Die genetische Elimination dieses Faktors führt dazu, dass große Teile des MGE-Gewebes fehlen und durch eine vergrößerte LGE ersetzt sind (Xu et al., 2004; Sussel et al., 1999). Außerdem ist die Zahl der corticalen Interneurone reduziert, die Marker PV und SST fehlen vollständig. Die SST-exprimierenden GIN stammen also höchstwahrscheinlich zum größten Teil aus der MGE.

Ein weiterer Teil der SST-exprimierenden GIN könnte der CGE entstammen. Im ventralen Teil der CGE ist ebenfalls der Transkriptionsfaktor Nkx2.1 exprimiert. Aus diesem Teil der GE stammen SST-exprimierende Interneurone der tiefen Cortexschichten, die alle vor E13 geboren werden (Xu et al., 2004; Nery et al., 2002). Somit könnte ein Teil der SST-exprimierenden GIN, welche in Schicht IV und dem oberen Teil der Schicht V vorkommen (Halabisky et al., 2006), auch aus der ventralen CGE stammen. Dies wären dann GIN, die vor E13 produziert wurden und sich nach der Migration in den Cortex dort in diesen Teilen des sensomotorischen Cortex anreichern (GIN von E11 bis E13). Dies würde auch mit der Tatsache übereinstimmen, dass SST- und PV-exprimierende Interneurone – im Gegensatz zu den CR-exprimierenden Interneuronen – eine „inside-first-outside-last“-Beziehung, abhängig vom Geburtsdatum, zeigen (früh geborene Neurone siedeln sich in tieferen Schichten an als später geborene) (Miyoshi et al., 2007; Rymar und Sadikot, 2007; Cavanagh und Parnavelas, 1989). Somit könnten die SST-exprimierenden GIN der tieferen Cortexschichten, die vor E13 geboren wurden, aus der MGE und der ventralen CGE stammen, nach E13 würde nur noch die MGE alle weiteren SST-exprimierenden GIN für die oberen Lagen des Cortex produzieren.

Allerdings ist es möglich, dass im frontalen und v.a. im cingulären Cortex eine andere Verteilung der GIN vorherrscht. Dort wurde beobachtet, dass die GIN sich hauptsächlich in

Schicht II/III befinden. Da bereits gezeigt wurde, dass sich cingulärer und sensomotorischer Cortex in ihrem Geburtsdatenprofil der GIN unterscheiden, könnte es durchaus möglich sein, dass die SST-exprimierenden GIN des cingulären Cortex nur aus der MGE stammen und sich nur in Schicht II/III anreichern. Die SST-haltigen GIN des sensomotorischen Cortex (in Schicht II bis IV) könnten sowohl aus der MGE (E11 bis E17) und der ventralen CGE (E11 bis E13) stammen.

Die CR-exprimierenden GIN stammen höchstwahrscheinlich nicht aus der MGE. Nur in der LGE und der dorsalen CGE werden CR-exprimierende Interneurone produziert. Die LGE generiert hauptsächlich GABAerge Interneurone für den Bulbus olfactorius (Xu et al., 2004), aber auch CR-exprimierende Interneurone für den lateralen Cortex (Stenman et al., 2003), jedoch nur zwischen E14,5 und E16,5 (diese stammen aus dem dorsalen Teil der LGE) (Brazel et al., 2003). In der dorsalen LGE sind die Transkriptionsfaktoren Er81 und Gsh2 exprimiert (Stenman et al. 2003), ebenso in der dorsalen CGE, einer weiteren Quelle für corticale CR-exprimierende Interneurone (Corbin et al., 2003; Stenman et al. 2003). In der dorsalen CGE werden aber erst ab E14 CR-exprimierende Interneurone produziert. Dieser Teil der CGE gilt auch als Hauptquelle für CR-exprimierende Interneurone (Butt et al., 2005; Lopez-Bendito et al., 2004; Xu et al., 2004). Zudem ist bekannt, dass die CR-exprimierenden Neurone aus der CGE keine „inside-first-outside-last“-Beziehung zum Geburtsdatum aufweisen, wie es bei den SST-exprimierenden Neuronen der MGE der Fall ist (Miyoshi et al., 2007; Rymar und Sadikot, 2007; Cavanagh und Parnavelas, 1989). Somit könnten die GIN, die CR exprimieren, aus der dorsalen LGE oder CGE stammen. Weiterhin ist wahrscheinlich, dass die CR-exprimierenden GIN erst nach E14 geboren werden, da davor in der LGE und der CGE keine CR-exprimierenden Interneurone entstehen. Dies würde bedeuten, dass die ersten produzierten GIN (bis ca. E14) nur SST exprimieren und erst jüngere GIN (ab E14 in der dorsalen CGE und LGE geboren) zu einer Expression von CR neigen würden. Da keine „inside-first-outside-last“-Beziehung zum Geburtsdatum vorliegt, würden sich die CR-exprimierenden GIN in einer völlig anderen Art und Weise im Cortex ansiedeln, als die SST-exprimierenden GIN. Dies würde aber auch bedeuten, dass die GFP-positiven Neurone in GIN-Mäusen keine homogene Population darstellen.

Neben den GIN, die jeweils nur einen der Markermoleküle SST bzw. CR exprimieren, sind solche bekannt, in denen SST **und** CR vorliegen (Xu et al., 2006). Die Frage, wie diese Neurone entstehen, soll ebenfalls spekulativ beantwortet werden. SST- und CR-exprimierende

GIN werden in verschiedenen Gebieten der GE produziert (SST: MGE, vCGE; CR: dCGE, dLGE). Allerdings ist auch bekannt, dass die Neurone aus der MGE durch die Mantelzone und die SVZ der LGE migrieren (Jimenez et al., 2002; Anderson et al., 2001). Auch wird über einen migratorischen Strom aus der MGE in die ventrale CGE gemutmaßt (Butt et al., 2005, Yozu et al., 2005). Man könnte sich also Folgendes vorstellen: In der MGE werden SST-exprimierende GIN generiert. Einige davon wandern dann über die LGE oder dorsale CGE in den Neocortex. In diesen beiden Gebieten kommen die SST-exprimierenden GIN mit Signalen in Kontakt, die wichtig sind für CR-exprimierende Interneurone. Die SST-exprimierenden Neurone erfahren daraufhin den Befehl, neben SST auch CR zu exprimieren.

Eine zweite Möglichkeit wäre, dass diese GIN nur in der CGE entstehen. Da dort vor E14 ebenfalls SST-exprimierende GIN produziert werden, wäre es möglich, dass einige dieser Neurone aus der ventralen in die dorsale CGE wandern und dort mit den Signalen für eine zusätzliche CR-Expression in Kontakt kommen. Da in der ventralen CGE aber nur SST-exprimierende Neurone der tiefen Cortexschichten gebildet werden, wäre diese Möglichkeit nur für GIN aus Schicht IV des sensomotorischen Cortex zutreffend. Die SST- und CR-exprimierenden GIN aus den oberen Schichten müssten dann auf die zuerst erwähnte Weise (Migration aus MGE über LGE und CGE) entstehen, ebenso die SST- / CR-haltigen GIN des cingulären und frontalen Cortex (nur Schicht II/III).

Natürlich besteht auch die Möglichkeit, dass in der ventralen CGE entstandene Interneurone (CR-Signal) in die dorsale MGE wandern und dort eine Wartephase einlegen (SST-Signal), um später in die oberen Schichten des Cortex zu wandern. Ebenso könnte es sein, dass die SST- und CR-exprimierenden GIN nicht an die „inside-first-outside-last“-Regel gebunden sind, und – wie die CR-exprimierenden Neurone – völlig unabhängig von dieser Regel in die corticalen Schichten einwandern.

Zusammengefasst würde dies bedeuten, dass ab P11 in der MGE und der ventralen CGE SST-exprimierende GIN gebildet werden. Erst ab P14 wird dann die CR-exprimierende Population der GIN in der dorsalen CGE und der dorsalen LGE produziert. Nur die SST-exprimierenden GIN siedeln sich dann nach einer „inside-first-outside-last“-Regel im Cortex an, welche mit dem Geburtsdatum korreliert. Die GIN, die beide Marker exprimieren, entstehen entweder in der MGE und wandern dem „inside-first-outside-last“-Modus folgend über die LGE und CGE in den Neocortex. Oder sie werden nur in der CGE generiert (ventrale und dorsale CGE) und zeigen dann ein anderes Migrationsverhalten, bei dem Ziel und Geburtszeitpunkt nicht korrelieren.

All dies sind reine Spekulationen, die auf den Ergebnissen dieser Arbeit und anderen, bereits in der Literatur veröffentlichten Befunden beruhen. Ob sich die Entstehung der GIN in der GE so abspielt, ist ungeklärt. Ebenso wenig ist bekannt, ob die GIN komplett aus der GE stammen oder auch in anderen Gebieten des entstehenden Gehirns (wie z.B. dem Septum, dem anterioren entopedunculären Areal) produziert werden. Unabhängig davon ist aber klar, dass die GIN, falls sie tatsächlich aus der GE stammen, in unterschiedlichen Gebieten der GE produziert werden müssen. Zeitpunkt und Ort der Geburt eines Neurontyps sind wichtige Faktoren, die den späteren Phänotyp, auch den der GIN, determinieren. Dass die Neurone bei der Geburt bereits vollständig in ihrem Schicksal festgelegt sind, erscheint aber unwahrscheinlich. Auf diesen Punkt soll an späteren Stellen noch eingegangen werden.

5.2.1.2 Migration der GIN

Die Neurone des Neocortex werden in verschiedenen proliferativen Zonen generiert und müssen von dort an ihre endgültigen Positionen in den corticalen Schichten wandern. Glutamaterge Pyramidenzellen werden hauptsächlich in den proliferativen Zonen des Palliums geboren, der corticalen Ventrikulärzone und Subventrikulärzone (z.B. Nakajima, 2007; Caviness et al., 2003; Gorski et al., 2002; Chan et al., 2001). Diese Gebiete entlang der lateralen Ventrikel liegen direkt unter dem entstehenden Neocortex, und die Zellen wandern auf radialen Wegen in die sich entwickelnden Schichten des Neocortex ein (Kriegstein, 2005; Marin und Rubenstein, 2003; Nadarajah und Parnavelas, 2002). Für GABAerge Interneurone ergeben sich auf Grund ihrer entfernt liegenden Entstehungsorte (ganglionäre Eminenz, Septum, anteriores entopedunculäres Areal) andere und vor allem längere Migrationsstrecken. Diese sogenannte tangentiale Migration führt die jungen Interneurone um die striatale Anlage herum (Andrews et al., 2007; Marin und Rubenstein, 2001) in die Gebiete unterhalb der entstehenden Cortexschichten (Subventrikulärzone und Intermediärzone) (Nakajima, 2007; Metin et al., 2006). Dort angekommen, schlagen sie dann ebenfalls radiale Migrationswege ein, um in den Cortex zu gelangen (Metin et al., 2006). Dabei zeigt sich, dass mehrere voneinander abgesetzte Kohorten von Interneuronen existieren, die sich in Zeitpunkt und Ursprungsort innerhalb der GE unterscheiden (Metin et al., 2006, Anderson et al., 2001). Auf Grund der Geburtsdatenbestimmung kann man die GIN in diese Kohorten einordnen und über ihre möglichen Migrationsstrecken spekulieren. Dies geschieht auf der Basis von Beispielen aus der Literatur und darf ebenfalls nur als grobe Mutmaßung aufgefasst werden.

Sehr früh in der Entwicklung des Neocortex formiert sich eine sog. „Preplate“, eine ungeschichtete Ansammlung von Zellen, die den Grundstein des späteren Cortex legen (Super

und Uylings, 2001; Lambert de Rouvroit und Goffinet, 1998). Um E11 / E12 verlässt eine erste Kohorte aus tangential migrierenden Zellen die MGE und invadiert diese Struktur. Die Migrationsroute dieser Zellen verläuft nahe der pialen Oberfläche (Andrews et al., 2007; Metin et al., 2006; Wichterle et al. 2001). Die Zellen zeigen typische Merkmale von Cajal-Retzius-Zellen (Nakajima, 2007; Marin und Rubenstein, 2001), die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Cortexschichten spielen, indem sie das Protein Reelin sezernieren (Tisir und Goffinet, 2003). Im weiteren Verlauf der Entwicklung wandern Zellen aus anderen Quellen in den entstehenden Cortex ein und bilden die sog. Corticalplatte, aus der sich später die Schichten II bis VI entwickeln (Super und Uylings, 2001). In diesem Verlauf wird die „Preplate“ in zwei Schichten gespalten, die auf bzw. unter der Corticalplatte zu liegen kommen (Lambert de Rouvroit und Goffinet, 1998). Dies sind die Marginalzone (später Schicht I) bzw. die Subplatte (später Teil der weißen Substanz) (Marin und Rubenstein, 2003; Angevine und Sidman, 1961). Zwischen E13 und E15 verlässt eine zweite Kohorte von tangential migrierenden Zellen die MGE und wandert in die Corticalplatte ein. Diese Zellen nehmen eine Route, die hauptsächlich durch die intermediäre Zone zwischen Ventrikulärzone und Subplatte des Cortex führt (Andrews et al., 2007; Metin et al., 2006; Wichterle et al. 2001). Sie unterscheidet sich damit deutlich von der Route der ersten Kohorte. Eine dritte und letzte Kohorte verlässt die GE nach E16 (Andrews et al., 2007). In dieser sind Zellen aus allen Gebieten der GE (MGE, LGE, CGE) vorhanden. Außerdem benutzen diese Zellen einen wesentlich breiteren Migrationskanal als die beiden vorherigen Kohorten. Sie migrieren durch die Intermediärzone und die Subventrikulärzone und siedeln sich in der Corticalplatte an (Andrews et al., 2007; Wichterle et al. 2001). Diese drei Kohorten führen Zellen aus der GE tangential in den entstehenden Cortex.

GIN werden bereits ab E11 produziert, wahrscheinlich in der MGE und CGE. Die Bildung dieser Neurone erstreckt sich bis zum embryonalen Tag 17. Somit könnten die späteren GIN in allen drei Kohorten enthalten sein. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass GIN bereits in der ersten Kohorte vorhanden sind, da es sich hierbei v.a. um Cajal-Retzius-Zellen handelt. Da man in den FVB-Tg(GadGFP)45704Swn/J-Mäusen bisher keine GFP-positiven Neurone in der Schicht I gefunden hat, ist es sehr unwahrscheinlich, dass einige der Cajal-Retzius-Zellen zu den GIN gezählt werden müssen. Um E13 beginnt in der GE die Periode der stärksten Produktion von GIN. Dieses Maximum dauert bis E15. In dieser Zeit verlässt die zweite Kohorte die MGE, um in die Corticalplatte zu wandern. In der MGE werden unter anderem auch SST-exprimierende Interneurone gebildet, zu denen ja auch die GIN gehören. Diese Tatsache macht es wahrscheinlich, dass in dieser zweiten Kohorte SST-

exprimierende GIN tangential über die intermediäre Zone in die Corticalplatte wandern. Dies würde bedeuten, dass sehr früh geborene GIN (ab E11 bis E13) nicht sofort mit der Migration in den Cortex starten, sondern eine Wartezeit in der GE verbringen. Diese Zeit könnte für SST- / CR-GIN eine Möglichkeit darstellen, in die CGE zu wandern und dort die Signale zu erhalten, die sie zur Expression von CR, zusätzlich zu SST, veranlassen.

Da aus der LGE nur im Zeitraum zwischen E14 und E16 Zellen in den Cortex einwandern (Brazel et al. 2003), und CR-exprimierende Zellen in der CGE erst nach E14 gebildet werden (Wonders und Anderson, 2005), kann ausgeschlossen werden, dass in diesem zweiten Migrationsstrom (aus der MGE) außer SST-exprimierenden GIN auch CR-exprimierende GIN vorhanden sind. Diese müssten sich dann in der dritten Migrationskohorte nach E16 aus der GE befinden. Zu dieser Kohorte tragen, außer der MGE, auch LGE und CGE bei, so dass die CR-exprimierenden GIN hier vorhanden sein könnten.

Für die Migration der GIN könnte sich also folgendes Bild ergeben: Nach ihrer Generation ab E11 treten SST-exprimierende GIN in der zweiten Kohorte aus der MGE (E13 bis E15) ihre Migration durch die Intermediärzone in die Corticalplatte an. Einige dieser Neurone könnten entweder über die LGE wandern oder eine Abzweigung in die dorsale CGE nehmen und dort die Signale für eine zusätzliche CR-Expression empfangen. Danach kommen zu den SST-exprimierenden GIN die CR-exprimierenden aus LGE und CGE hinzu und migrieren zusammen in der letzten Kohorte (ab E16) aus der GE tangential über Intermediärzone und Subventrikulärzone in die Corticalplatte. Auch hier könnte es sein, dass die GIN neben ihrem unterschiedlichen Ursprung in der GE auch unterschiedliche Migrationsstrecken und -zeiten aufweisen. Die SST-exprimierenden GIN würden demnach ihre Migration früher beginnen und vorerst in einem engeren Korridor wandern als die CR-exprimierenden GIN. Damit würden die verschiedenen Ursprungsorte der GIN in der GE nicht nur deren spätere Markerexpression determinieren, sondern auch ihre Migrationswege und -zeiten. Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass Ort und Zeitpunkt der Entstehung wichtige Parameter sind, die die GIN in ihren adulten Eigenschaften determinieren. Eine Aussage über die Vollständigkeit dieser Festlegung ist bis jetzt nicht möglich. Jedoch erscheint es unwahrscheinlich, dass alle Eigenschaften der adulten GIN intrinsisch beim Zeitpunkt der Geburt definiert werden. Einige Eigenschaften können auch erst während der postnatalen Entwicklung entstehen und eine Ausprägung „vor Ort“ erfahren, die sich auf extrinsische Signale stützt.

5.2.1.3 Unterschiede bei der Generation der GIN

Bis jetzt wurden mögliche Ursprungsorte der GIN und ihre möglichen Migrationswege in den Neocortex beschrieben. Dabei stützte sich die Argumentation vor allem auf zwei Ergebnisse – die Geburtsdatenbestimmung und die exprimierten Markermoleküle. Es wurde die Möglichkeit aufgezeigt, dass SST- und CR-exprimierende Interneurone aus verschiedenen Regionen der GE stammen und außerdem in zeitlich voneinander abgesetzten Kohorten in den Cortex migrieren könnten. Hierbei zeigt sich sehr deutlich, dass die adulten Eigenschaften der GIN zu gewissen Teilen bereits früh in der Entwicklung festgelegt werden (z.B. Markerexpression, Lage in einer bestimmten corticalen Schicht). Allerdings zeigt sich bei der Generation der GIN noch ein weiterer, diesmal durch Ergebnisse dieser Arbeit belegter Unterschied.

Wie bereits erwähnt, werden die GIN im Zeitraum von E11 bis E17 generiert, das Produktionsmaximum liegt zwischen E13 und E15. Dies gilt für alle untersuchten Areale des Neocortex, also für den cingulären und den sensomotorischen Cortex. Betrachtet man die Ergebnisse für den cingulären Cortex getrennt von denen des sensomotorischen Cortex, dann findet man einen Unterschied in der Dauer des Produktionsmaximums. Die meisten GIN für den cingulären Cortex werden zwischen E13 und E14 produziert, die meisten GIN für den sensomotorischen Cortex zwischen E13 und E15. Zudem findet man im cingulären Cortex GFP-positive Zellen bereits an P2, während im sensomotorischen Cortex diese Neurone erst ab P5 / P6 nachweisbar werden.

Der Weg in den medial liegenden cingulären Cortex ist für migrierende Neurone aus der GE jedoch wesentlich weiter als der Weg in die lateralen, sensomotorischen Bereiche. Die GIN für den cingulären Cortex müssten demnach sofort nach der Generation die GE verlassen und in den cingulären Cortex wandern.

Eine andere Möglichkeit wären – bei zeitgleichem Start der Migration in der GE – verschiedene lange Wartephassen in der SVZ des Neocortex. Es ist bekannt, dass Interneurone in der SVZ Wartephassen einlegen oder sogar ein Stück in Richtung der Ventrikulärzone absinken (Nadarajah et al., 2002). Dies könnte im Falle der GIN zur Folge haben, dass die cingulären GIN diese Wartephassen nicht oder nur verkürzt aufweisen und daher vor den lateralen GIN an ihren Zielorten erscheinen.

Insgesamt kann man hieraus schließen, dass die GFP-positiven Neurone von FVB-Tg(GadGFP)45704Swn/J-Mäusen bei Weitem nicht so homogen sind, wie sie in der Literatur dargestellt werden (Xu et al., 2006; Olivia et al. 2000). Da die GFP-positiven Neurone des cingulären Cortex sehr wahrscheinlich zu einem etwas anderen Zeitpunkt generiert werden als

die entsprechenden Zellen des sensomotorischen Cortex, und da die GFP-positiven Neurone des cingulären Cortex bereits bei P2 auftreten, während sie im sensomotorischen Cortex erst bei P5 / P6 nachweisbar werden, hat man guten Grund zur Annahme unterschiedlicher Populationen.

5.2.2 Postnatale Entwicklung der GIN im sensomotorischen Cortex der Maus

Die postnatale Entwicklung der GIN – das eigentliche Thema dieser Arbeit – wurde mit verschiedenen Methoden untersucht. Die Verteilung der Neurone im Neocortex, die Expression der Markermoleküle SST und CR, sowie die Entwicklung der Morphologie wurden mit immunhistochemischen Techniken analysiert. Für die Bestimmung der elektrophysiologischen Eigenschaften der GIN wurde die Ganzzell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik angewendet. Obwohl diese beiden Themenbereiche getrennt bearbeitet wurden, müssen die Ergebnisse im Zusammenhang interpretiert werden. So sollen im Folgenden die Resultate der einzelnen Versuche erörtert und dann im Zusammenhang diskutiert werden.

5.2.2.1 Verteilung der Neurone im sensomotorischen Cortex

Nachdem die GIN in der GE produziert wurden, verlassen sie diese und wandern tangential in den Cortex. Dort positionieren sie sich in den Schichten der Corticalplatte. Im sensomotorischen Cortex sind am zweiten und dritten postnatalen Tag noch keine GIN zu beobachten. Erst ab P5 / P6 tauchen sie in diesem Cortexbereich auf. Innerhalb der ersten eineinhalb Wochen nach der Geburt besiedeln immer mehr GIN diesen Bereich, bis sie bei P10 die maximale Dichte an Zellen erreichen. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass sich in den ersten drei bis vier Tagen nach der Geburt im sensomotorischen Cortex keine GIN befinden, während im cingulären Cortex bereits um P2 GIN zu beobachten sind. Dies bedeutet, dass die GIN nicht gleichmäßig in den Neocortex einwandern, sondern präferentiell bestimmte Gebiete zuerst besiedeln. Die Invasion des Cortex durch die GIN läuft also nach einem bestimmten Muster ab, bei dem zuerst der cinguläre Cortex erreicht wird und danach der sensomotorische Bereich.

Dass zuerst der cinguläre Cortex von den GIN besiedelt wird kann bedeuten, dass für diese beiden Gebiete die Notwendigkeit besteht, schon sehr früh über diesen Zelltyp zu verfügen, um die neuronale Aktivität in diesen Gebieten lenkend zu beeinflussen. Hinzu kommt, dass die Differenzierung der GIN nicht abgeschlossen ist, wenn sie im Cortex

erscheinen. Die frühe Ankunft der Neurone im cingulären Cortex kann mit einem Entwicklungsvorsprung einhergehen. Das könnte bedeuten, dass die GIN in diesem Gebiet früher ihren adulten Phänotyp erreichen, als die später erscheinenden GIN im sensomotorischen Cortex. Dies würde neben der morphologischen Entwicklung auch die Expression von SST und CR betreffen. Allerdings konnte ein solcher Effekt nicht beobachtet werden.

Eine andere Möglichkeit, warum die GIN erst nach P3 / P4 im sensomotorischen Cortex erscheinen ist, dass die GIN in der frühen Phase der postnatalen Entwicklung noch kein GFP exprimieren. Das könnte bedeuten, dass die GIN bereits im Cortex vorhanden, aber auf Grund der fehlenden GFP-Expression noch nicht identifizierbar sind. Da jedoch nicht bekannt ist, wie das Transgen der GIN-Mäuse, das für die Expression von GFP in einem Teil ihrer Interneurone verantwortlich ist, reguliert wird, ist es schwierig zu sagen, ob die Produktion von GABA und GFP direkt voneinander abhängen. So könnten die GIN im sensomotorischen Cortex vor P3 / P4 kein GFP exprimieren, weil sie ebenfalls noch kein GABA produzieren. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass das Transgen, trotz einer bereits vorhandenen GABA-Expression, noch nicht angesprochen wird, und die Zellen trotz GABA-Gehalt kein GFP exprimieren. In diesem Fall ist ein unbekannter Vorgang beteiligt (z.B. zusätzliche ex- oder intrinsische Signale), der für den verzögerten Anlauf der GFP-Expression im Vergleich zur GABA-Produktion sorgt.

In jedem Fall zeigt die Besiedelung des Cortex durch die GIN offensichtliche, regionsspezifische Unterschiede. Die weitere Differenzierung der GIN findet dann vor Ort im Neocortex statt.

5.2.2.2 Expression von Markermolekülen in GIN des sensomotorischen Cortex

Die GIN verfügen, entsprechend der Literatur (Xu et al., 2006), über zwei verschiedene Markermoleküle. Dies sind das Neuropeptid SST und das Calcium-bindende Protein CR. Wie in der Einleitung beschrieben, nehmen diese beiden Stoffe verschiedene wichtige Aufgaben in der Zelle war, die von der Modulation der Aktivität und Signalverarbeitung (SST) über eine Calciumpufferfunktion bis hin zur Beteiligung an Signalkaskaden und Transportprozessen (CR) reicht (Camp und Wijesinghe, 2009). Es ist davon auszugehen, dass beide Substanzen für die korrekte Funktion der GIN wichtig sind. Jedoch ist unklar, auf welche Weise die beiden Markermoleküle die Funktion der GIN bestimmen.

Die Expression dieser Marker wird bereits vor der Geburt der GIN in verschiedenen Teilen der GE determiniert. Die akute Expression der Proteine beginnt aber erst einige Zeit

nach der Geburt des Tieres. Der Entwicklungszeitverlauf der Expression scheint für beide Moleküle mehr oder weniger gleich zu sein. Kurz vor oder ab P7, also fast im Einklang mit dem ungefährten Erscheinen des GFP-Signals im sensomotorischen Cortex, kann man in einigen GIN die Expression dieser Substanzen beobachten. Im weiteren Verlauf der postnatalen Entwicklung exprimieren immer mehr GIN diese Marker, bis dann die adulten Level erreicht sind (SST: ca. 75% der GIN, CR: ca. 35% der GIN). Allerdings ist der Entwicklungsgang der SST-Expression bereits um P15 abgeschlossen, wohingegen der von CR bis ca. P20 andauert. Von außerordentlicher Bedeutung ist die Beobachtung, dass man im ausgereiften Neocortex vier verschiedene Gruppen an GIN immunhistochemisch unterscheiden kann:

1. Neurone nur mit GFP-Expression.
2. Neurone mit GFP- und SST-Expression.
3. Neurone mit GFP- und CR-Expression.
4. Neurone mit GFP-, SST- und CR-Expression (Halabisky et al., 2006; Xu et al., 2006).

Ob die GIN diese Markermoleküle erst nach der Migration exprimieren, ist nicht ganz klar. Es sprechen jedoch mehrere Gründe für diese Annahme. Die Dichte der GFP-positiven Zellen nimmt nach P10 nicht mehr zu, was als Zeichen für die Beendigung der Migration angesehen werden kann. Die Dichte der SST- bzw. CR-positiven Neurone nimmt aber bis P15 bzw. P20 weiter zu. Dies kann bedeuten, dass manche GIN (vor allem nach P10) im Cortex eine Zeit lang ohne die Expression von SST oder CR existieren und erst nach einiger Zeit diese Proteine produzieren. Zudem sind die ersten GIN, die um P2 im cingulären Cortex gefunden wurden, negativ für beide Markermoleküle. Es ist also nicht sehr wahrscheinlich, dass die GIN bereits während der Migration SST und / oder CR exprimieren.

In diesem Zusammenhang ist natürlich die Frage nach den Signalen für den Beginn der Markerexpression interessant. Entweder sind dies extrinsische Signale aus der Cortexumgebung oder intrinsische Signale, die die Produktion von SST und CR starten. Für den Fall der extrinsischen Signale könnte es sich um die Ankunft im Cortex selbst handeln, bei der die ankommenden GIN mit diesen Signalen in Berührung kommen und dann mit der Expression der Proteine beginnen. Damit wäre eine gestaffelte Entwicklung der Expression möglich. Im Falle der GIN, bei denen die Expressionsentwicklung der Marker erst nach dem Erreichen der adulten Zellzahlen abgeschlossen ist, könnte ein solches Signal nicht das Erreichen des Cortex selbst sein, sondern die Ankunft im endgültigen Zielgebiet im Cortex. In diesem Falle würden früh im Cortex erscheinende GIN schnell an ihre Endpositionen kommen und mit der Markerexpression beginnen. Spätere GIN müssten erst im Cortex

ankommen und dann noch an ihre endgültigen Positionen im Neocortex wandern. Sie würden also noch keine Markermoleküle exprimieren, sondern dies erst nach dem Erreichen der finalen Position tun. Somit könnte zwar die adulte Zahl an GIN im Cortex vorhanden sein, aber, da sich einige GIN noch nicht an ihren finalen Positionen befinden, die Expression von SST und CR ihr endgültiges Level noch nicht erreicht haben. Dies würde die verschiedenen Zeitverläufe der Cortexinvasion und der Proteinexpression erklären und ein Argument liefern, das gegen den Expressionsbeginn der beiden Marker vor Erreichen des Cortex spricht. Bei den lokalen Faktoren, die die Markerexpression in den GIN initiieren, könnte es sich um Stoffe handeln, die im Cortex nur während der Entwicklung ausgeprägt sind (z.B. motogene Faktoren).

Andere Möglichkeiten wären der Reifegrad der GIN oder die Expression bestimmter Rezeptoren, die dann extrinsische Signale aus dem Cortex registrieren könnten. Was im Endeffekt genau für den Start der Markerexpression verantwortlich ist, bleibt unbekannt. Fest steht jedoch, dass die GIN bereits in der GE determiniert werden, SST und CR im Cortex zu exprimieren, aber diese Proteine erst im Cortex nach der Migration der Zellen produziert werden.

5.2.2.3 Morphologische Entwicklung der GIN im sensomotorischen Cortex

Auch die Morphologie der GIN unterliegt einer postnatalen Entwicklung. In der Literatur ist belegt, dass es sich bei den GIN hauptsächlich um Martinottizellen handeln dürfte (Fanselow et al., 2008; Xu et al., 2006). Dieser spezielle Neuronentyp zeichnet sich durch eine stark elaborierte axonale Projektion in Schicht I aus. Dort innerviert diese die distalen Dendriten von Pyramidenzellen. Weitere Besonderheiten sind dendritische Dornen und dornartige Aufschwellungen an den Axonterminalen (Wang et al., 2004). Alle adulten GIN, die im Verlauf dieser Arbeit mittels Biocytininjektionen rekonstruiert wurden, wiesen diese Merkmale auf. Aufgrund der Stichprobenzahl ($n = 5$ pro untersuchter Altersgruppe) lässt sich aber nicht ausschließen, dass auch andere morphologische Typen bei adulten GIN vorhanden sind. Es scheint zwar, dass der Anteil an Martinottizellen bei den GIN sehr hoch ist – auch die Markerexpression der GIN (SST und CR) spricht für diesen morphologischen Typ – jedoch sind selbst im adulten Gehirn nicht alle GIN positiv für SST und damit können durchaus andere Zelltypen, die nicht mit der Expression von SST korrelieren, auftreten (z.B. kleine Korbzellen, bipolare Zellen, Chandelierzellen [Markram et al., 2004]). Selbst innerhalb der SST-positiven GIN-Population bleibt Raum für andere morphologische Formen, da z.B. auch große Korbzellen, „double bouquet cells“ und „bitufted cells“ dieses Neuropeptid exprimieren

können (Markram et al., 2004). Auch aufgrund von spezifischen Regionsunterschieden könnten GIN im cingulären Cortex andere morphologische Typen als Martinottizellen ausprägen. In den anderen Bereichen des Gehirns, in denen GIN vorkommen (Hippocampus [Minneci et al., 2007; Olivia et al., 2000], Nucleus vestibularis [Bagnall et al., 2007; Gittis und du Lac, 2007]), ist bisher nicht belegt worden, dass es sich bei GIN ausschließlich um Martinottizellen handelt. Im sensomotorischen Cortex scheint der Anteil dieses Typs bei GIN jedoch sehr hoch zu liegen.

Allerdings beginnen die GIN ihre Laufbahn im Cortex nicht als fertige ausdifferenzierte Neurone. Die Sholl-Analyse zeigt deutlich, dass sich die Morphologie der GIN im Verlauf der postnatalen Entwicklung deutlich und sehr drastisch verändert. Zudem geschieht dies erst recht spät in der Entwicklung. So sind die Unterschiede in der Anzahl der Schnittpunkte bei einer Sholl-Analyse zwischen der jüngsten (P6 bis P8) und der mittleren (P10 bis P14) der untersuchten Altersgruppen eher gering. Erst im Vergleich mit der ältesten Gruppe (P18 bis P21) zeigt sich eine deutliche Erhöhung der Anzahl der Schnittpunkte. Gleiches gilt für die Zunahme der Neuritenfläche der GIN im Rahmen der Sholl-Analyse. Die Anzahl der Schnittpunkte und die Fläche sind in der Sholl-Analyse Maße für die Ausbreitung des Dendritenbaumes und/oder der axonalen Verzweigungen. Dies bedeutet, dass diese Zellen erst spät, d.h. während der zweiten und dritten postnatalen Woche, eine zunehmende Ausbreitung des Dendritenbaumes und der axonalen Verzweigung ausbilden. Die Zellen weisen im adulten Zustand eine stark verzweigte und flächenmäßig wesentlich größere anatomische Struktur auf. Dies passt zu den Spezifikationen einer Martinottizelle (Wang et al., 2004). Die Axone sind in Schicht I stark und über weite Strecken verzweigt und bieten eine Quelle für laterale Inhibition auf den distalen Bereich der Dendriten von Pyramidenzellen. Die Entwicklung dieser starken axonalen Verzweigung und die damit verbundene Zunahme der Verzweigungsfläche spiegeln sich gut in der postnatalen Entwicklung der GIN-Morphologie wieder, wenn man sich hier auf die Betrachtung von Martinottizellen beschränkt. Zudem weisen alle untersuchten Zellen der ältesten Gruppe dendritische Dornen und dornartige Aufschwellungen auf den Axonen in Schicht I auf, welche zusätzliche Merkmale von Martinottizellen darstellen (Wang et al., 2004).

Somit spielt die späte Periode, in der die GIN ihre stärkste morphologische Entwicklung erfahren, für die Synaptogenese wahrscheinlich eine wichtige Rolle. Denn hauptsächlich in dieser Periode ist eine Kontaktaufnahme mit den postsynaptischen Zielstrukturen der GIN möglich, sodass die Bildung von Synapsen an den Kontaktstellen stattfinden kann (McAllister, 2007; Goda und Davis, 2003), bei der synaptogene (z.B.

Nerolagine, Neurexine, Cadherine und CAMs [Zelladhäsionsmoleküle]), limitierende Moleküle (z.B. Transkriptionsfaktoren der MEF2-Familie [myocyte enhancer factor 2], Wnt4 [wingless type 4], Slit1a/Robo2 [SLIT Homolog 2/Roundabout 2] und MHC I [major histocompatibility complex I]) und auch neuronale Aktivität beteiligt sind (McAllister, 2007; Cohen-Cory, 2002). Da die größten morphologischen Veränderungen erst sehr spät bei den GIN stattfinden (zweite bis dritte postnatale Woche), kann man annehmen, dass auch hier (ähnlich wie bei der Proteinexpression) Signale aus der unmittelbaren Cortexumgebung eine Rolle spielen. Der größte Teil der morphologischen Entwicklung spielt sich bei den GIN also an ihren finalen Positionen im Cortex ab, was bedeuten könnte, dass intrinsische Signale nur eine untergeordnete Rolle spielen und die adulte Morphologie der GIN nicht schon bei der Geburt in der GE festgelegt wird (im Gegensatz zum Protein- und Peptidprofil), sondern in großen Teilen vom Kontext der jeweiligen Umgebung im Cortex abhängig ist.

Vielleicht werden der Zelle bei der Geburt verschiedene Möglichkeiten mit auf den Weg gegeben. Aber erst an ihrer finalen Position, abhängig von den jeweiligen Erfordernissen und den vorhandenen extrinsischen Signalen, bildet sich die adulte Morphologie aus. Eine solche Entwicklungsweise ließe auch Raum für andere morphologische Typen innerhalb der GIN. Somit ist die späte anatomische Reifung der GIN ein kritischer Schritt, da er sie größtenteils in ihrer Funktion festlegt. Die morphologische Reifung ist nicht nur auf Änderungen im Aussehen der Zelle beschränkt, sondern hat unmittelbare Konsequenzen für die elektrophysiologischen Eigenschaften der Neurone.

5.2.2.4 Postnatale Entwicklung der elektrophysiologischen Eigenschaften der GIN im sensomotorischen Cortex

5.2.2.4.1 Passive Membraneigenschaften

Die passiven Membraneigenschaften eines Neurons beruhen auf der räumlichen Verteilung seiner Membranleitfähigkeiten und der Gesamtzellkapazität. Sie werden somit zum großen Teil durch die Zellmorphologie bestimmt. Der sogenannte neuronale Eingangswiderstand ist als eine operationale Größe aufzufassen, der den Gesamtwiderstand des Systems „Neuron“ unter bestimmten Bedingungen (Membranpotential, synaptischer Zustrom, etc.) angibt. Die Membranzeitkonstanten werden v.a. durch räumlich verteilte Kapazitäten determiniert. Aus ihnen lässt sich auf die elektrotonische Kompaktheit der Zellen schließen (Rall, 1969). Bei einer elektrotonisch kompakten Zelle können durch Strominjektion in das Soma auch weite

Teile des Dendritenbaumes beeinflusst werden (Cameron und Nunez-Abades, 2000; Nunez-Abades et al., 1993), was bei einem elektrotonisch nicht-kompakten Neuron nicht möglich ist.

Eingangswiderstand und Membranzeitkonstante der GIN sind zwei Parameter, die sich im Verlauf der postnatalen Entwicklung drastisch verändern. Beide Größen sind in der ersten postnatalen Woche hoch und nehmen dann stark ab. Die postnatale Reduktion des Eingangswiderstandes ist auch von hippocampalen (Tyzio et al., 2003; Moudy und Schwartzkroin, 1992) und neocorticalen (Oswald und Reyes, 2008; McCormick und Prince, 1987) Pyramidenzellen bekannt. Die „Ruheleitfähigkeit“ von Pyramidenzellen wird über verschiedene Kanäle etabliert. Von Bedeutung sind v.a. Kaliumkanäle (u.a. K_{IR} -Kanäle und TWIK-Kanäle) sowie einwärtsgleichrichtende unspezifische Kationenkanäle (HCN-Kanäle) (Brenston und Wamsley, 2008; Schneggenburger und Forsythe, 2006; Lu, 2004). Die entwicklungsbedingte Verringerung des Widerstandes wird auf die vermehrte Expression von Kaliumkanälen und HCN-Kanälen zurückgeführt (Oktay et al. 2009; Bender und Baram, 2008; Skaliora et al., 1995). Eine vermehrte Expression dieser Kanäle bewirkt eine Abnahme des Eingangswiderstandes und der Zeitkonstante. Diese Veränderung könnte zu einer Reduktion der intrinsischen Erregbarkeit der GIN im Verlauf der postnatalen Entwicklung führen.

Die Membranzeitkonstante, die im Verlauf der postnatalen Entwicklung der GIN ebenfalls drastisch abnimmt, hängt zum einen mit dem Eingangswiderstand zusammen. So ist es einleuchtend, dass sich diese Größe verringert, wenn der Widerstand im Verlauf der Entwicklung kleiner wird. Allerdings wirkt sich, neben dem Widerstand der Membran, auch die Gesamtzellkapazität auf die Membranzeitkonstante aus. Da diese Kapazität proportional zur Membranoberfläche des gesamten Neurons ist, müsste also bei zunehmender Gesamtoberfläche des Neurons (z.B. Dendritenwachstum) auch die Kapazität zunehmen (Doischer et al., 2008; Tyzio et al., 2003). Die Abnahme der Zeitkonstante beruht also nur zum Teil auf der Reduktion des Widerstandes. Hinzukommt das zunehmende Wachstum der Dendriten. Zur Bestimmung der Membranzeitkonstante werden Strompulse in das Soma der Neurone injiziert. Besitzen diese Neurone nur wenige kurze Dendriten (junges Neuron), dann wird der meiste Strom über die Somamembran abfließen. Haben die Neurone mehrere lange Dendriten, dann fließt ein großer Teil des injizierten Stromes in die Dendriten und dort über die Dendritenmembran in den Extrazellulärraum. Das heißt, der Strom, der in die Dendriten abfließt, wird die Kapazität der Somamembran nicht umladen und somit, bei somatischer Ableitung, nicht erfasst. Dieses Phänomen wurde von W. Rall beschrieben und anhand eines Neuronmodells mathematisch formuliert (Rall, 1969).

Bei den GIN kann auf Grund der Sholl-Analysen der rekonstruierten Zellen auf eine Vergrößerung des Dendritenbaumes und damit auf eine entwicklungsbedingte Erhöhung der Gesamzellkapazität geschlossen werden.

Im Kontext der postnatalen Entwicklung der GIN ist eine erhöhte intrinische Erregbarkeit der jungen Zellen natürlich sinnvoll, wenn man an die Synaptogenese und die Etablierung der späteren Verschaltungen und Netzwerke denkt. Der synaptische Eingang zu den GIN nimmt im Verlauf der postnatalen Entwicklung zu. Dieser Zeitverlauf überlappt mit der Abnahme des Widerstandes und mit der damit verbundenen intrinsischen Erregbarkeit. Somit kann man argumentieren, dass eine hohe intrinsische Erregbarkeit bei jungen GIN während der frühen Synaptogenese hilfreich ist für die Formation und Aufrechterhaltung junger Synapsen.

5.2.2.4.2 Strom-Spannungsbeziehung

In dieser Arbeit wurde die postnatale Entwicklung der Strom-Spannungsbeziehungen in GIN untersucht. Bei sehr jungen GIN ist die IV-Kurve durch Nicht-Linearität und einen hohen Steigungswiderstand gekennzeichnet. Das bedeutet, dass junge GIN auf Strominjektionen mit großen Spannungsänderungen reagieren. Bei älteren GIN bleibt die Nicht-Linearität erhalten, die Steigungen der Kurven sind aber wesentlich geringer. Adulte GIN reagieren somit auf Strom gegebener Größe mit einer weitaus geringeren Potentialänderung als junge Neurone. Auch dies deutet auf eine, im Verlauf der Entwicklung abnehmende intrinsische Erregbarkeit der Neurone hin.

Messungen der IV-Beziehungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Strompulses legen nahe, dass die GIN mit einer Reihe von zeit- und spannungsabhängigen Leitfähigkeiten ausgestattet sind. Ein sehr deutlich zeitabhängiges Phänomen beobachtet man bei Injektion von hyperpolarisierenden Strompulsen. Als Antwort auf einen großen hyperpolarisierenden Strompuls tritt der sogenannte „Sag“ auf (Constanti und Galvan, 1983), der auf einer verzögert aktivierte Kationenleitfähigkeit beruht. Dieses Verhalten findet sich bei GIN aller Altersgruppen.

Diese zeitabhängig aktivierte Leitfähigkeit ist mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auch der Grund für die zeitabhängige Einwärtsrektifikation in hyperpolarisierender Richtung. Um dies zu quantifizieren, wurde in dieser Arbeit ein Rektifikationskoeffizient bestimmt. Dabei werden im Prinzip die Eingangswiderstände bei verschiedenen Membranpotentialen gemessen, und in ein Verhältnis zueinander gesetzt. Ist dieses Verhältnis gleich 1, dann liegt keine Rektifikation (d.h. Gleichrichtung) vor. Findet man Werte, die größer als 1 sind, dann

spricht man von Einwärtsgleichrichtung, d.h. Einwärtsströme fließen leichter als Auswärtsströme. Bei einem RK kleiner 1 liegt Auswärtsgleichrichtung vor. Bei allen GIN waren die Rektifikationskoeffizienten, unabhängig vom Meßzeitpunkt, immer größer als 1. Das bedeutet, dass bei den GIN grundsätzlich eine Einwärtsrektifikation stattfindet. Während aber die Rektifikationskoeffizienten, die zu Beginn eines Strompulses (d.h. 50 ms bis 100 ms nach Injektionsbeginn, initialer RK) ermittelt wurden, ungefähr einen Wert von 1,1 aufwiesen, fanden sich im Gleichgewicht (Gleichgewichts-RK), d.h. am Ende des Strompulses, deutlich höhere Werte, die sich zudem während des Verlaufes der postnatalen Entwicklung veränderten (von 2,8 auf 1,5). Dies deutet daraufhin, dass die Stromdichte der Ionenleitfähigkeiten, die für den „Sag“ verantwortlich sind (sehr wahrscheinlich HCN-Kanäle) (Constanti und Galvan, 1983, Deschenes et al., 1982, Halliwell und Adams, 1982), während der Entwicklung zunahm.

Die depolarisierende Einwärtsgleichrichtung kommt in Pyramidenzellen des Neocortex durch einen sogenannten persistierenden Natriumstrom zustande (I_{NaP}) (Sutor und Zieglsberger, 1987; Stafstrom et al. 1985; Stafstrom et al., 1984). Dabei handelt es sich um TTX-sensitive spannungsabhängige Natriumkanäle, die, wenn auch mit geringer Wahrscheinlichkeit, nicht oder nur langsam inaktivieren. Man kann davon ausgehen, dass diese Kanäle auch in GIN vorhanden sind.

5.2.2.4.3 Aktionspotentiale und Entladungsverhalten

Innerhalb der GABAergen Interneurone gibt es viele Untergruppen, die bei überschwelliger Depolarisation mit unterschiedlichen Aktionspotentialentladungsmustern reagieren (Markram et al., 2004; Gupta et al., 2000; Kawaguchi und Kubota 1997; Kawaguchi, 1993). Von besonderem Interesse ist, ob diese Muster einen Entwicklungszeitgang aufweisen und wenn ja, wann sie während der postnatalen Entwicklung die Muster ausprägen. Die Entwicklung zum endgültigen elektrophysiologischen Typus ist daher von großem Interesse.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich sowohl die Aktionspotentiale als auch das Entladungsverhalten der GIN während der Entwicklung deutlich verändern. So nimmt die Dauer der Aktionspotentiale während der ersten beiden postnatalen Wochen ab, wobei Amplituden und Schwellendepolarisation gleich bleiben. Da Amplituden der Aktionspotentiale und die Schwellendepolarisation bereits bei jungen GIN vollständig ausgebildet sind, kann man annehmen, dass die entwicklungsbedingte Verkürzung der Aktionspotentialdauer auf einer Zunahme der Effektivität repolarisierender Leitfähigkeiten (v.a. Kaliumleitfähigkeiten, wie z.B. der verzögerte auswärtsrektifizierende Kaliumstrom)

beruht (Doischer et al., 2008). Die entwicklungsbedingten Veränderungen der Aktionspotentialnachhyperpolarisationen spricht für diese Annahme. Das Auftreten von zweiphasigen Nachhyperpolarisationen in späteren Entwicklungsstadien deutet auf die zunehmende Expression von Calcium-abhängigen Kaliumleitfähigkeiten hin.

Schwellendepolarisation als auch Amplituden der Aktionspotentiale werden überwiegend durch die Dichte und Kinetik von spannungsabhängigen Natriumkanälen determiniert. Diese sind auch verantwortlich für den persistierenden Natriumstrom, der z.B. in Pyramidenzellen des Neocortex die Schwellendepolarisation mitbestimmt (Sutor und Zieglgänsberger 1987). Es gibt aber noch weitere, unterschwellig aktive Leitfähigkeiten, die bewirken, dass Aktionspotentiale schnell und zuverlässig ausgelöst werden können (Jonas et al., 2004). Die Existenz solcher unterschwelligen Leitfähigkeiten (z.B. Calciumstrom vom T-Typ, M-Strom, auswärtsrektifizierender Kaliumstrom) (Chapman und Lacaille, 1999a; Chapman und Lacaille, 1999b) wurde bereits in GABAergen Interneuronen nachgewiesen (Galareta und Hestrin, 2001; Fricker und Miles, 2000). Sie tragen u.a. zu den Resonanzeigenschaften der Interneurone und Oszillationen des Membranpotentials bei (Bracci et al., 2003; Fellous et al., 2001).

Parallel zu den Veränderungen einzelner Aktionspotentiale wurden auch entwicklungsabhängige Veränderungen des Entladungsmusters der GIN beobachtet. In der ersten postnatalen Entwicklungswoche zeichnen sich diese Neurone bei Injektion überschwelliger depolarisierender Strompulse durch ein Entladungsmuster mit niedriger Frequenz (30 Hz bis 60 Hz) und wenig ausgeprägter Frequenzadaptation aus. Innerhalb von zwei Wochen steigt die Frequenz, die unmittelbar nach Beginn des Strompulses gemessen wird (initiale Antwort), um mehr als das Doppelte an (120 Hz bis 140 Hz). Die Frequenz der späten Antwortphase verändert sich dagegen kaum (60 Hz). Diese Entwicklung führt also zu einer sehr deutlichen Frequenzadaptation.

5.2.2.4.4 Entwicklung der synaptischen Innervation von GIN

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Entwicklung der synaptischen Innervation von GIN anhand des Auftretens von spontanen synaptischen Potentialen untersucht. Es zeigte sich, dass die Frequenz der spontanen synaptischen Ereignisse im Verlauf der ersten beiden Entwicklungswochen zunimmt. Die Anwendung von selektiven Antagonisten an Glutamat- und GABA_A-Rezeptorantagonisten hat ergeben, dass bereits die jungen GIN synaptischen Zustrom erhalten, der durch AMPA/Kainatrezzeptoren vermittelt wird. Bei der Altersgruppe von P6 bis P8 konnten zwar inhibitorische Potentiale nicht direkt nachgewiesen werden; das

Auftreten von paroxysmalen Depolarisationen nach Applikation des GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin spricht jedoch dafür, dass GIN auch in diesem Entwicklungsstadium durch GABAerge Afferenzen innerviert werden. Die synaptische Innervation der GIN während der ersten postnatalen Woche ähnelt also weitgehend der von Pyramidenzellen des Hippocampus (Tyzio et al., 1999). Die gering ausgeprägte Wirksamkeit des NMDA-Rezeptorantagonisten D-AP-5 deutet daraufhin, dass die Aktivität von GIN, zumindest im Bereich des Ruhemembranpotentials, wenig durch diesen Glutamatrezeptortyp bestimmt wird. Dies stimmt mit in der Literatur beschriebenen Befunden überein, wonach GABAerge Interneurone, wenn überhaupt, nur ein sehr schwach etabliertes NMDA-System haben und der glutamaterge Zustrom hauptsächlich über das AMPA/Kainatsystem erfolgt (Thomson et al., 1996; Hestrin, 1993).

Ab P10 war es möglich, durch Anwendung einer speziellen Pipettenlösung spontane inhibitorische Potentiale nachzuweisen, die durch den GABA_A-Rezeptor vermittelt werden. Es zeigte sich, dass die Frequenz dieser Potentiale sehr hoch ist, und dass sie auch nach Applikation von TTX, und der damit verbundenen Blockade der Aktionspotentiale, mit unveränderter Frequenz auftreten. Bei den Potentialen, die in Gegenwart von TTX registriert werden konnten, handelte es sich also um sogenannte Miniatur-inhibitorische postsynaptische Potentiale (mIPSP), die offenbar dadurch entstanden, dass GABAerge Synapsen, die sich unmittelbar auf den GIN befanden, spontan GABA freisetzen. Man kann also davon ausgehen, dass GIN einer sehr starken GABAergen Hintergrundhemmung ausgesetzt sind. Da die Frequenz der mIPSP im Verlauf der Entwicklung zunimmt, wird diese Hintergrundhemmung mit zunehmendem Alter der GIN stärker.

5.2.3 Zusammenfassende Betrachtung

Die Erörterung der einzelnen untersuchten Eigenschaften der GIN zeigt deutlich, dass diese Neurone nicht als fertige GABAerge Interneurone in den Neocortex gelangen, sondern teils drastische Veränderungen im Verlauf ihrer postnatalen Entwicklung durchlaufen. Bis jetzt wurden alle untersuchten Parameter einzeln betrachtet und diskutiert, sowie mögliche Gründe und Ursachen für die gefundenen Entwicklungsvorgänge genannt. Im Folgenden soll nun die postnatale Entwicklung der GIN im Zusammenhang betrachtet werden, und alle untersuchten Parameter und ihre verschiedenen entwicklungsbedingten Veränderungen in einen zeitlichen Zusammenhang gebracht werden. Die beobachtete Entwicklungsperiode erstreckt sich über drei Wochen.

In dieser Arbeit wurden vor allem GIN des sensomotorischen Cortex untersucht. Diese Neurone entstehen zwischen E11 und E17 in unterschiedlichen Gebieten der GE. Hier wird, abhängig von Zeit und Ort ihrer Geburt, zum Teil ihr späteres Schicksal festgelegt. Nach ihrer Generation migrieren diese Zellen auf bestimmten Wegen – ebenfalls abhängig vom Zeitpunkt ihrer Geburt – tangential in den Neocortex.

In der ersten postnatalen Woche werden die ersten GIN im Neocortex sichtbar. Sie befinden sich an P2 ausschließlich im cingulären Cortex. Wann und unter welchen Umständen die GIN beginnen, GFP zu exprimieren ist unklar. Deswegen kann der Zeitpunkt ihres Erscheinens (Expression von GFP) nicht mit dem Zeitpunkt der Ankunft im Neocortex gleichgesetzt werden. Da GABA jedoch ein wichtiger Faktor sowohl in der prä- als auch in der postnatalen Entwicklung des Gehirns ist (Proliferation, Migration, GABA-Exzitation, morphologische Reifung, etc.), ist es nicht unwahrscheinlich, dass die GIN bereits früh, vielleicht schon vor der Ankunft im Neocortex, GABA – und damit GFP – exprimieren. Somit wäre der Zeitpunkt ihres Erscheinens im Neocortex mit dem Zeitpunkt der tatsächlichen Ankunft identisch. Unter dieser Annahme erreichen die ersten GIN den Neocortex am zweiten Tag nach der Geburt des Tieres und siedeln sich dort zuerst im cingulären Cortex an. Einige Tage nachdem die GIN im Neocortex angekommen sind, nämlich an P7, startet die Expression der Markerproteine SST und CR. Das bedeutet, dass diese Neurone im cingulären Cortex im Zeitraum von P2 bis P7 nicht als SST- und / oder CR-positive Neurone bezeichnet werden können. Ab P5 finden sich dann erste GFP-positive Neurone im sensomotorischen Cortex ein, die aber ebenfalls für ein oder zwei Tage SST- und CR-negativ sind. Die Tatsache, dass die SST- und CR-Expression im sensomotorischen Cortex und im cingulären Cortex nahezu zeitgleich startet, kann dafür sprechen, dass dieser Expressionsstart genetisch determiniert ist. Es kann aber auch sein, dass lokale Faktoren, die zu dieser Zeit überall im Neocortex auftauchen, die Expression beider Markermoleküle initiieren.

Das morphologische Erscheinungsbild der jungen Zellen ist noch sehr einfach. Die Neuritenfläche der Zellen entspricht nur einem Bruchteil der Fläche adulter Neurone. Dennoch erhalten die GIN zu diesem Entwicklungszeitpunkt bereits synaptischen Zustrom, der von AMPA/Kainat- und GABA_A-Rezeptoren getragen wird. Die passiven Membraneigenschaften und die Strom-Spannungsbeziehung verleihen den Neuronen eine hohe intrinsische Erregbarkeit. Allerdings sind ihre Entladungsmuster deutlich verschieden zu denen von ausgereiften GIN. Die Entladungsfrequenzen sind relativ niedrig,

Frequenzadaptation ist kaum vorhanden (N.B.: Man kann diese Neurone zu diesem Zeitpunkt also nicht als RSNP klassifizieren). Dies liegt v.a. am noch nicht vollständig entwickelten Mechanismus der Aktionspotentialrepolarisation.

Die zweite postnatale Woche (P8 bis P14) ist die Periode mit den ausgeprägtesten entwicklungsbedingten Veränderungen der GIN. Die Besiedelung des Neocortex findet in der ersten Hälfte der zweiten postnatalen Woche ihren Abschluss. Um P10 ist die endgültige Dichte an GIN im sensomotorischen Cortex erreicht. Die anteilige Expression von SST und CR ist zu diesem Zeitpunkt angestiegen, d.h. immer mehr GIN exprimieren eines der beiden Proteine, jedoch werden die endgültigen Expressionslevel weder für SST noch für CR erreicht. Das Ausmaß der Neuritenverzweigung nimmt zu, allerdings nur in einem geringen Maß. Eine sehr starke Zunahme erfährt die synaptische Innervation. Die Frequenz der spontanen synaptischen Potentiale verdreifacht sich. Zudem verändert sich die Kinetik der synaptischen Potentiale und zwar so, dass sie bereits an P14 nicht mehr von der Kinetik der Potentiale ausgereifter Neurone unterschieden werden können.

Auf Grund der Abnahme des Eingangswiderstandes nimmt auch die intrinsische Erregbarkeit der GIN während der ersten Hälfte der zweiten Woche deutlich ab. Am Ende der zweiten Woche scheint die Ausprägung dieser Erregbarkeit vollständig zu sein. Bei den Aktionspotentialen kommt es zu einer deutlichen Verkürzung ihrer Dauer und zu Verlaufsveränderungen der Nachhyperpolarisationen. Damit einher geht, bei Injektion überschwelliger depolarisierender Strompulse, eine drastische Steigerung der Entladungsfrequenz und das Auftreten einer deutlichen Frequenzadaptation. Das Entladungsverhalten entspricht somit einem RSNP-Interneuron. Da zu diesem Zeitpunkt bereits SST und CR exprimiert werden, könnte man also am Ende der zweiten Entwicklungswoche die GFP-positiven Neurone bereits als SST- / CR-exprimierende RSNP-Zellen oder Martinotti-Zellen bezeichnen. Allerdings entspricht die morphologische Struktur der Zellen noch nicht den Kriterien für Martinotti-Zellen.

Die dritte postnatale Woche (P15 bis P21) bringt nur noch sehr wenige Veränderungen mit sich. Allerdings ist die Entwicklung der GIN, zumindest bis in die erste Hälfte der dritten Woche, noch nicht vollständig abgeschlossen. Die Expression von SST erreicht erst um P15, also zu Beginn der dritten Woche, ihr Maximum, bei CR dauert dies sogar bis P20. Zwischen P14 und P18 nehmen die GIN ihre endgültige morphologische Gestalt an, außerdem kommt

es noch zu schwach ausgeprägten Veränderungen des Entladungsmusters und der synaptischen Innervation.

Nach den Kriterien der bisher gültigen Klassifizierungsschemata für GABAerge Interneurone (Markram et al., 2004; Kawaguchi und Kondo, 2002; Gupta et al., 2000; DeFelipe, 1997; Kawaguchi, 1993 a; Kawaguchi, 1993 b) kann man die GFP-positiven Neurone des sensomotorischen Cortex der Mauslinie FVB-Tg(GadGFP)45704Swn/J frühestens ab dem postnatalen Tag 18 als SST- / CR-exprimierende, regulär entladende, adaptierende GABAerge Interneurone bzw. als Martinotti-Zellen bezeichnen. Zudem ist es sehr wahrscheinlich, dass die Population der GFP-positiven Neurone dieser Mauslinie nicht homogen ist. Man muss also in Zukunft weitere Klassifizierungskriterien finden. Ein Ansatz hierzu hat sich in der vorliegenden Arbeit ergeben: die hohe Frequenz an spontanen synaptischen Potentialen und die starke GABAerge Hintergrundhemmung scheint charakteristisch für Martinotti-Zellen zu sein.

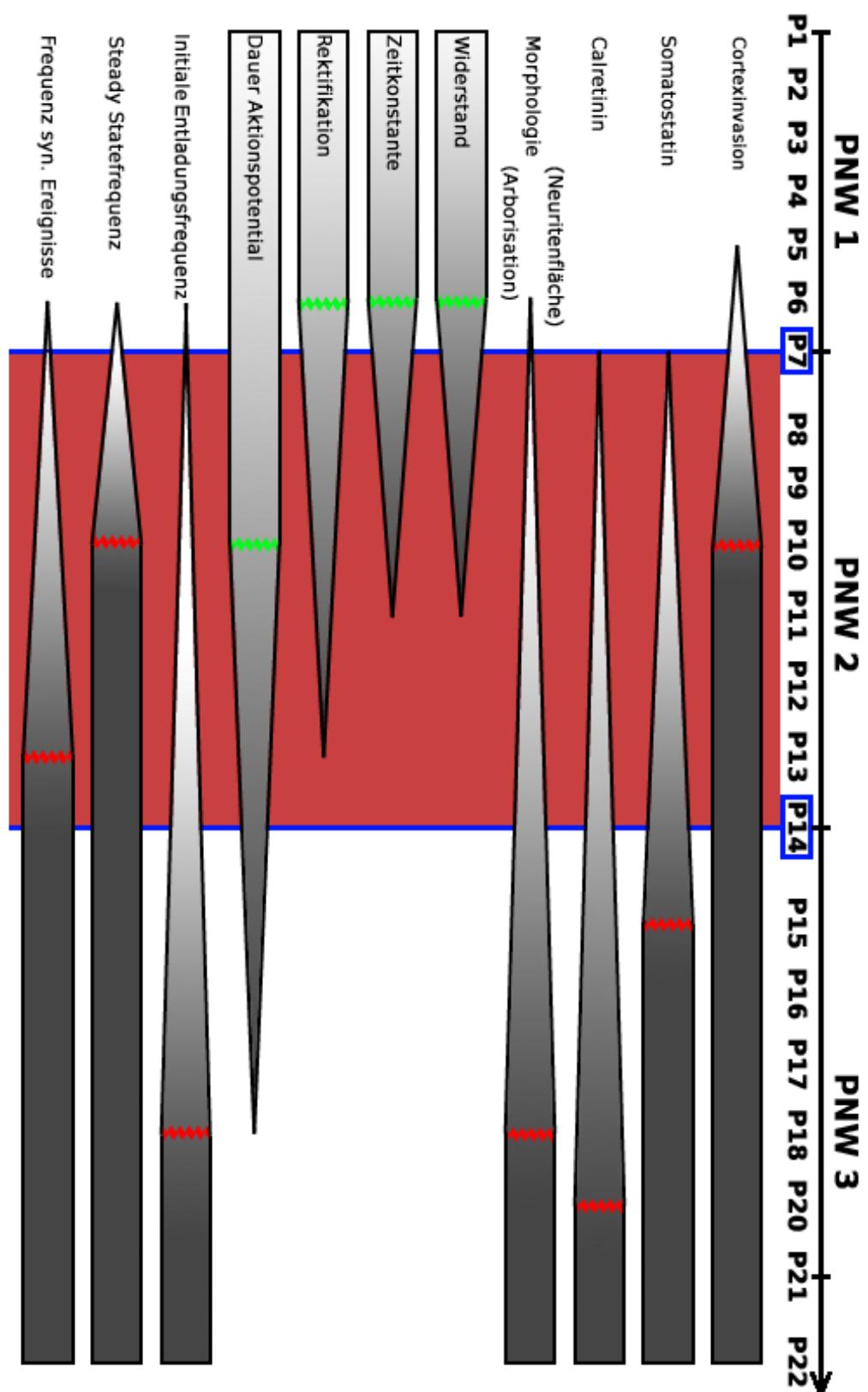


Abb. 61:

Postnatale Entwicklung der GIN im sensomotorischen Cortex der Maus.

In der Abbildung ist die Entwicklung der, in dieser Arbeit untersuchten Parameter dargestellt. Dabei wurden nur diejenigen Eigenschaften berücksichtigt, die sich während der untersuchten Periode der postnatalen Entwicklung auch tatsächlich veränderten. Die roten und grünen Markierungen innerhalb der Balken zeigen den Zeitpunkt an, bei dem die Entwicklung der jeweiligen Eigenschaft entweder begann (grün) oder beendet war (rot). Der rot hinterlegte

Bereich zeigt den Entwicklungszeitraum an, in dem die meisten Entwicklungsvorgänge stattfanden (PNW: Postnatale Woche, P1: Postnataler Tag 1).

6 Literatur

Allendoerfer K. L. und Shatz C. J. (1994). The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annual Review of Neuroscience* 17: 185-218

Anderson S. A., Marin O., Horn C., Jennings K. und Rubenstein J. L. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128: 353-363

Anderson S. A., Mione M., Yun K. und Rubenstein J. L. R. (1999). Differential origins of projection and local circuit neurons: role of Dlx genes in neocortical interneuronogenesis. *Cerebral Cortex* 9: 646-654

Anderson S. A., Eisenstat D. D., Shi L. und Rubenstein J. L. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278: 474-476

Andrews W. D., Barber M. und Parnavelas J. G. (2007). Slit-Robo interactions during cortical development. *Journal of Anatomy* 211: 188-198

Ang E.S. Jr, Haydar T. F., Gluncic V. und Rakic P. (2003). Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *Journal of Neuroscience*, 23: 5805-5815

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

Aracri P., Consonni S., Morini R., Perrella M., Rodighiero S., Amadeo A. und Becchetti A. (2009). Tonic modulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in layer V of the murine prefrontal cortex. *Cerebral Cortex* 20: 1539-1555

Bean B. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience* 8: 451-465

Bacci A., Huguenard J. R. und Prince D. A. (2005). Modulation of neocortical interneurons: Extrinsic influences and exercises in self-control. *Trends in Neurosciences* 28 (11): 602-610

Bacci A., Huguenard J. R. und Prince D. A. (2002). Differential modulation of synaptic transmission by neuropeptide Y in rat neocortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 17125-17130

Bagnall M. W., Stevens R. J. und du Lac S. (2007). Transgenic mouse lines subdivide medial vestibular nucleus neurons into discrete, neurochemically distinct populations. *Journal of Neuroscience* 28: 2318-2330

Baraban S. C. und Tallent M. K. (2004). Interneuron diversity series: Interneuronal neuropeptides – endogenous regulators of neuronal excitability. *Trends in Neurosciences* 27 (3): 135-142

Bellion A., Wassef M. und Metin C. (2003). Early differences in axonal outgrowth, cell migration and GABAergic differentiation properties between the dorsal and lateral cortex. *Cerebral Cortex* 13: 1047-214

Bender R. A. und Baram T. Z. (2008). Hyperpolarization activated cyclic-nucleotide gated (HCN) channels in developing neuronal networks. *Progress in Neurobiology* 86: 129-140

Brazel C. Y., Romanko M. J., Rothstein R. P. und Levison S. W. (2003). Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Progress in Neurobiology* 603: 1-21

Bracci E., Centonze D., Bernardi G. und Calabresi P. (2003). Voltage-dependent membrane potential oscillations of rat striatal fast-spiking interneurons. *Journal of Physiology* 549: 121-130

Brenston A. K. und Walmsley B. (2008). Characterization of a potassium-based leak conductance in the medial nucleus of the trapezoid body. *Hearing Research* 244: 98-106

Butt S. J. B., Cobos I., Golden J., Kessaris N., Pachnis V. und Anderson S. (2007). Transcriptional regulation of cortical interneuron development. *The Journal of Neuroscience* 27(44): 11847-11850

Butt S. J. B., Fuccillo M., Nery S., Noctor S., Kriegstein A., Corbin J. G. und Fishell G. (2005). The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* 48: 591-604

Cameron W. E. und Nunez-Abades P. A. (2000). Physiological changes accompanying anatomical remodeling of mammalian motoneurons during postnatal development. *Brain Research Bulletin* 53: 523-527

Camp A. J. und Wijesinghe R. (2009). Calretinin: Modulator of neuronal excitability. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41: 2118-2121

Caputi A., Rozov A., Blatow M. und Monyer H. (2009). Two calretinin-positive GABAergic cell types in layer 2/3 of the mouse neocortex provide different forms of inhibition. *Cerebral Cortex* 19: 1345-1359

Carrascal L., Nieto-Gonzalez J. L., Cameron W. E., Torres B. und Nunez-Abades P. A. (2005). Changes during the postnatal development in physiological and anatomical characteristics of rat motoneurons studied in vitro. *Brain Research Reviews* 49: 377-387

Casarosa S., Fode C. und Guillemot F. (1999). Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126 : 525-534

Cauli B., Audinat E., Lambolez B., Angulo M. C., Ropert N., Tsuzuki K., Hestrin S. und Rossier J. (1997). Molecular and physiological diversity of cortical non pyramidal cells. *Journal of Neuroscience* 17: 3894-3906

Cavanagh M. E. und Parnavelas J. G. (1989). Development of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in the rat occipital cortex: a combined immunohistochemical-autoradiographic study. *Journal of Comparative Neurology* 284: 637-645

Cavanagh M. E. und Parnavelas J. G. (1988). Development of somatostatin immunoreactive neurons in the rat occipital cortex: A combined immunocytochemical-autoradiographic study. *Journal of Comparative Neurology* 268: 1-12

Cavines Jr V. S., Goto T., Taruli T., Takahashi T., Bhide P. G. und Nowakowski R. S. (2003). Cell output, cell cycle duration and neuronal specification: A model of integrated mechanisms of the neocortical proliferative process. *Cerebral Cortex* 13 (6): 592-598

Chan C. H., Godinho L. N., Thomaidou D., Tan S. S., Gulisano M. und Parnavelas J. G. (2001). Emx1 is a marker for pyramidal neurons of the cerebral cortex. *Cerebral Cortex* 11 (12): 1191-1198

Chapman C. A. und Lacaille J. C. (1999a). Cholinergic induction of theta-frequency oscillations in hippocampal inhibitory interneurons and pacing of pyramidal cell firing. *Journal of Neuroscience* 19: 8637-8645

Chapman C. A. und Lacaille J. C. (1999b). Intrinsic theta-frequency membrane potential oscillations in hippocampal CA1 interneurons of stratum lacunosum-moleculare. *Journal of Neurophysiology* 81: 1296-1307

Chattopadhyaya B., Di Cristo G., Higashiyama H., Knott G. W., Kuhlman S. J., Welker E. und Huang Z. J. (2004). Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *Journal of Neuroscience* 24: 9598-9611

Chow A., Erisir A., Farb C., Nadal M. S., Ozaita A., Lau D., Welker E. und Rudy B. (1999). K⁺-channel expression distinguishes subpopulations of parvalbumin- and somatostatin-containing neocortical interneurons. *Journal of Neuroscience* 19: 9332-9345

Cobb S. R., Buhl E. H., Halasy K., Paulsen O. und Somogyi, P. (1995). Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378: 75-78

Cobos I., Calcagnotto M. E., Vilaythong A. J., Thwin M. T., Noebels J. L., Baraban S. C. und Rubenstein J. L. R. (2005). Mice lacking Dlx1 show subtypespecific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nature Neuroscience* 8: 1059-1068

Cohen-Cory S. (2002). The developing synapse: Construction and modulation of synapse structures and circuits. *Science* 298: 770-776

Connors, B. W. und Gutnick, M. J. (1990). Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neuroscience*. 13: 99-104

Constanti A. und Galvan M. (1983). Fast inward-rectification current accounts for anomalous rectification in olfactory cortex neurons. *Journal of Physiology* 385: 153-178

Corbin J.G., Rutlin M., Gaiano N. und Fishell G., (2003). Combinatorial function of the homeodomain proteins Nkx2.1 and Gsh2 in ventral telencephalic patterning. *Development* 130: 4895-4906

Corbin J. G., Nery S. und Fishell G. (2001). Telencephalic cells take a tangential non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nature Neuroscience*: 4: 1177-1182

Cowan R. L., Wilson C. J., Emson P. C. und Heizmann C. W. (1990). Parvalbumin containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. *Journal of Comparative Neurology* 302:197-205

DeFelipe J. (2002). Cortical interneurons: From Cajal to 2001. *Progress in Brain Research* 136: 215-238

DeFelipe J. (1997). Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 14: 1-19

DeFelipe J. und Farinas I. (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology* 39: 563-607

DeFelipe J., Hendry S. H., Hashikawa T., Molinari M. und Jones E. G. (1990). A microcolumnar structure of monkey cerebral cortex revealed by immunocytochemical studies of double bouquet cell axons. *Neuroscience* 37: 655-673

DeFelipe J. und Jones E.G. (1988). A light and electron microscopic study of serotonin-immunoreactive fibers and terminals in the monkey sensory-motor cortex. *Experimental Brain Research* 71: 171-182

Deschenes M., Roy J. P. und Steriade M. (1982). Thalamic bursting mechanism: An inward slow current revealed by membrane hyperpolarization. *Brain Research* 239: 289-293

Dodt H. U. und Ziegglänsberger W. (1990). Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-videomicroscopy. *Brain Research* 537: 333-336

Doischer D., Hosp J. A., Yanagawa Y., Obata K., Jonas P. Vida I. und Bartos M. (2008). Postnatal differentiation of basket cells from slow to fast signalling devices. *Journal of Neuroscience* 26: 12956-12968

Erisir A., Lau D., Rudy B. und Leonard C. S. (1999). Function of specific K⁺-channels in sustained high-frequency firing of fast spiking neocortical interneurons. *Journal of Neurophysiology* 82: 2476-2489

Fanselow E. E., Richardson K. A. und Connors B. W. (2008). Selective, state-dependent activation of somatostatin-expressing inhibitory interneurons in mouse neocortex. *Journal of Neurophysiology* 100: 2640-2652

Fairen A. und Valverde F. (1980). A specialized type of neuron in the visual cortex of cat: A Golgi and electron microscope study of chandelier cells. *Journal of Comparative Neurology* 194: 761-779

Fellous J. M., Houwelling A. R., Modi R. H., Rao R. P. N., Tiesinga P. H. E. und Sejnowski T. J. (2001). Frequency dependence of spike timing reliability in cortical pyramidal cells and interneurons. *Journal of Neurophysiology* 85: 1782-1787

Ferezou I., Cauli B., Hill E. L., Rossier J., Hamel E. und Lambolez B. (2002). 5-HT3 receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. *Journal of Neuroscience* 22 : 7389-7397

Fode C., Ma Q., Casarosa S., Ang S. L., Anderson D. J. und Guillemot F. (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Development* 14: 67-80

Fogarty M., Grist M., Gelman D., Marin O., Pachnis V. und Kessaris N. (2007). Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *Journal of Neuroscience* 27: 10935-10946

Fragkouli A., Hearn C., Errington M., Cooke S., Grigoriou M., Bliss T., Stylianopoulou F. und Pachnis V. (2005). Loss of forebrain cholinergic neurons and impairment in spatial learning and memory in Lhx7-deficient mice. *European Journal of Neuroscience* 21: 2923-2938

Frick A., Feldmeyer D. und Sakmann B. (2007). Postnatal development of synaptic transmission in local networks of L5A pyramidal neurons in rat somatosensory cortex. *Journal of Physiology* 585: 103-116

Fricker D. und Miles R. (2000). EPSP-amplification and the precision of spike timing in hippocampal neurons. *Neuron* 28: 559-569

Galarreta M. und Hestrin S. (2001). Spike transmission and synchrony detection in networks of GABAergic interneurons. *Science* 292: 2295-2299

Gittis A. H. und du Lac S. (2007). Similar properties of transient, persistent, and resurgent Na^+ -currents in GABAergic and non-GABAergic vestibular nucleus neurons. *Journal of Neurophysiology* 99: 2060-2065

Goda Y. und Davis G. W. (2003). Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron* 40: 243-264

Gonchar Y. und Burkhalter A. (1997). Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cerebral Cortex* 7: 347-358

Gong S., Zheng C., Doughty M. L., Losos K., Didkovsky N., Schambra U. B., Nowak N. J., Joyner A., Leblanc G., Hatten M. E. und Heintz N. (2003). A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425: 917-925

Gonzalez-Islas C. und Hablitz J. J. (2001). Dopamine inhibition of evoked IPSCs in rat prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology* 86: 2911-2918

Gorski J. A., Talley T., Qiu M., Puelles L., Rubenstein J. L. R. und Jones K. R. (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *Journal of Neuroscience* 22: 6309-6314

Götz M., Williams B., Bolz J. und Price J. (1995). The specification of neuronal fate: A common precursor for neurotransmitter subtypes in the rat cerebral cortex. *European Journal of Neuroscience* 7: 889-898

Grabiec M., Turlejski K. und Djavadian R. (2009). Reduction of the number of new cells reaching olfactory bulbs impairs olfactory perception in the adult opossum. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 69: 168-176

Greene, J.R.T. und Mason A. (1996). Effects of somatostatin and related peptides on the membrane potential and input resistance of rat ventral subiculum neurons *in vitro*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 276: 426-432

Grigoriou M., Tucker A. S., Sharpe P. T. und Pachnis V. (1998). Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development* 125: 2063-2074

Gupta A., Wang Y. und Markram H. (2000). Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* 287: 273-278

Halabisky B., Shen F., Huguenard J. R., und Prince D. A. (2006). Electrophysiological classification of somatostatin-positive interneurons in mouse sensorimotor cortex. *Journal of Neurophysiology* 96: 834-845

Halliwell J. V. und Adams P. R. (1982). Voltage clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Research* 250: 71-92

He W., Ingraham C., Rising L., Goderie S. und Temple S. (2001). Multipotent stem cells from the mouse basal forebrain contribute GABAergic neurons and oligodendrocytes to the cerebral cortex during embryogenesis. *Journal of Neuroscience* 15: 8854-8862

Heng J. I., Moonen G. und Nguyen L. (2007). Neurotransmitters regulate cell migration in the telencephalon. *European Journal of Neuroscience* 26: 537-546

Hestrin S. (1993). Different glutamate receptor channels mediate fast excitatory synaptic currents in inhibitory and excitatory cortical neurons. *Neuron* 11: 1083-1091

Hevner R. F., Daza R. A., Englund C., Kohtz J. und Fink A. (2004). Postnatal shifts of interneuron position in the neocortex of normal and reeler mice: Evidence for inward radial migration. *Neuroscience* 124: 605-618

Horton S., Meredith A., Richardson J. A. und Johnson, J. E. (1999). Correct coordination of neuronal differentiation events in ventral forebrain requires the bHLH factor Mash1. *Molecular and Cellular Neuroscience* 14: 355-369

Hu H., Vervaeke K. und Storm J. F. (2002). Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na⁺ current in rat hippocampal pyramidal cells. *Journal of Physiology* 545: 783-805

Huguenard J. R. (1996). Low-threshold calcium currents in the central nervous system neurons. *Annual Reviews of Physiology* 58: 329-348

Ishibashi H. und Akaike N. (1995). Somatostatin modulates highvoltage- activated Ca2 β channels in freshly dissociated rat hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology* 74: 1028-1036

Jessell, T. M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: Inductive signals and transcriptional codes. *Nature Reviews Genetics* 1: 20-29

Jiminez D., Lopez-Mascaraque L. M., Valverde F. und De Carlos J. A. (2002). Tangential migration in neocortical development. *Developmental Biology* 244: 155-169

Jonas P., Bischofberger J., Fricker D. und Miles R. (2004). Interneuron diversity series: Fast in, fast out – temporal and spatial signal processing in hippocampal interneurons. *Trends in Neurosciences* 27 (1): 30-40.

Jones B.: „The Primary Visual Cortex.” in: *Webvision*. Stand: 30. März 2011. <http://webvision.med.utah.edu/book/part-ix-psychophysics-of-vision/the-primary-visual-cortex/> (abgerufen am: 3. Juni 2011)

Jones E. G. (1984) “Cellular Components of the Cerebral Cortex”, in: “The human central nervous system”, 521 – 554 , Hrsg.: Peters A. und Jones E. G.; New York

Jones E. G. (1975). Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *Journal of Comparative Neurology* 160: 205-268

Kawaguchi Y. und Kondo S. (2002). Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *Journal of Neurocytology* 31: 277-287

Kawaguchi Y. und Kubota Y. (1998). Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience* 85: 677-701

Kawaguchi Y. und Kubota Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex* 7: 476-486

Kawaguchi Y. und Kubota Y. (1996). Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *Journal of Neuroscience* 16: 2701-2715

Kawaguchi Y. (1995). Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *Journal of Neuroscience* 15: 2638-2655

Kawaguchi Y. und Kubota Y. (1993). Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *Journal of Neurophysiology* 70: 387-396

Kawaguchi Y. (1993 a). Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex. *Journal of Neurophysiology* 69: 416-431

Kawaguchi Y. (1993 b). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *Journal of Neuroscience* 13: 4908-4923

Kessaris N., Fogarty M., Iannarelli P., Grist M. Wegner M and Richardson W. D. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature Neuroscience* 9: 173-179

Kisvarday Z. F., Martin K. A., Whitteridge D. und Somogyi P. (1985). Synaptic connections of intracellularly filled clutch cells: A type of small basket cell in the visual cortex of the cat. *Journal of Comparative Neurology* 241: 111-137

Kobayashi D., Kobayashi M., Matsumoto K., Ogura T., Nakafuku M. und Shimamura K. (2002). Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. *Development* 129: 83-93

Kriegstein Arnold R. (2005). Constructing circuits: Neurogenesis and migration in the developing neocortex. *Epilepsia*, 46 (7):15-21

Kriegstein A. R. und Götz M. (2003). Radial glia diversitiy: A matter of cell fate. *Glia*: 43: 37-43

Kriegstein A. R. und Noctor S. C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends in Neurosciences* 27: 392-399

Kubota Y. und Kawaguchi Y. (1997). Two distinct subgroups of cholecystokinin-immunoreactive cortical interneurons. *Brain Research* 752: 175-183

Kubota Y., Hattori R. und Yui Y. (1994). Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Research* 649: 159-173

Lambert de Rouvroit C. und Goffinet A. M. (1998). A new view of early cortical development. *Biochemical Pharmacology* 56: 1403-1409

Larkum M. E., Kaiser K. M. und Sakmann B. (1999). Calcium electrogenesis in distal apical dendrites of layer 5 pyramidal cells at a critical frequency of back-propagating action potentials. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 14600-14604

Lavdas A. A., Grigoriou M., Pachnis V. und Parnavelas J. G. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *Journal of Neuroscience* 19: 7881-7888.

Lioudis P., Denaxa M., Grigoriou M., Akufo-Addo C., Yanagawa Y. und Pachnis V. (2007). Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. *Journal of Neuroscience* 27: 3078-3089.

Lopez-Bendito G., Sturgess K., Erdelyi F., Szabo G., Molnar Z. und Paulsen O. (2004). Preferential origin and layer destination of GAD65-GFP cortical interneurons. *Cerebral Cortex* 14: 1122-1133

Lu Z. (2004). Mechanisms of rectification in inward-rectifier K^+ -channels. *Annual Review of Physiology* 66: 103-129

Lund J. S. und Lewis D. A. (1993). Local circuit neurons of developing and mature macaque prefrontal cortex: Golgi and immunocytochemical characteristics. *Journal of Comparative Neurology* 328: 282-312

Lupica C. R., Proctor W. R. und Dunwiddie T. V. (1992). Dissociation of μ and δ opioid receptor mediated reductions in evoked and spontaneous synaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro. *Brain Research* 593: 226-238

Lupo G., Harris W. A. und Lewis, K. E. (2006). Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 7: 103-114

Ma Y., Hu H., Berrebi A. S., Mathers P. H. und Agmon A. (2006). Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice. *Journal of Neuroscience* 26: 5069-5082

Magee J. C. und Johnston D. (1997). A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* 275: 209-213

Malatesta P., Hack M. A., Hartfuss E., Kettenmann H., Klinkert W., Kirchhoff F. und Götz M. (2003). Neuronal or glial progeny: Regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37: 751-764

Marin O. und Rubenstein J. L. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annual Review of Neuroscience* 26: 441-483

Marin O. und Rubenstein J. L. (2001) A long, remarkable journey: Tangential migration in the telencephalon. *Nature Review Neuroscience* 2: 780-790

Marin-Padilla M. (1971). Early prenatal ontogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the cat (*Felis domestica*). A Golgi study: I. The primordial neocortical organization. *Zeitschrift fuer Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 134: 117-145

Markram H., Toledo-Rodriguez M., Wang Y., Gupta A., Silberberg G. und Wu C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews* 5: 793-807

Martina M., Schultz J. H., Ehmke H., Monyer H. und Jonas P. (1998). Functional and molecular differences between voltagegated K^+ -channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus. *Journal of Neuroscience* 18: 8111-8125

McAllister A. K. (2007). Dynamic aspects of CNS synapse formation. *Annual Review of Neuroscience* 30: 425-450

McCormick D. A. und Prince D. A. (1987). Postnatal development of electrophysiological properties of rat cerebral cortical pyramidal neurons. *Journal of Physiology* 393: 743-762

Metin C., Baudoin J. P., Rakic S. und Parnavelas J. G. (2006). Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *European Journal of Neuroscience* 23: 894-900

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

Miles R., Toth K., Gulyas A. I., Hajos N. und Freund T. F. (1996). Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16: 815-823

Minneci F., Janahmadi M., Migliore M., Dragicevic N., Avossa D. und Cherubini E. (2007). Signalling properties of *prtatum oriens* interneurons in the hippocampus of transgenic mice expressing EGFP in a subset of somatostatin-containing cells. *Hippocampus* 17: 538-553

Miyoshi G., Butt S. J. B., Takebayashi H. und Fishell G. (2007). Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2- expressing precursors. *Journal of Neuroscience* 27: 7786-7798.

Möhler H. (2006). GABA_A receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Research* 326: 505-516

Moore S. D., Madamba S. G., Joels M. und Siggins G. R. (1988). Somatostatin augments the M-current in hippocampal neurons. *Science* 239: 278-280

Moudy A. M. und Schwartzkroin P. A. (1992). Pyramidal neurons in immature rat hippocampus are sensitive to β -adrenergic agents. *Brain Research* 67: 57-66

Nadarajah B. und Parnavelas J. G. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nature Reviews* 3: 423- 432

Nadarajah B., Alifragis P., Wong R. O. und Parnavelas J. G. (2002). Ventricledirected migration in the developing cerebral cortex. *Nature Neuroscience* 5: 218-224

Nakajima K. (2007). Control of tangential/non-radial migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Neurochemistry International* 51: 121-131

Neher E. (1992). Correction for liquid junction potentials in patch clamo experiments. *Methods in Enzymology* 207: 123-131

Nelson P. G. und Frank K. (1967).Anomalous rectification in cat spinal motoneurons and effect of polarizing currents on excitatory postsynaptic potential. *Journal of Neurophysiology* 30: 1097-1113

Nery S., Fishell G. und Corbin J. G. (2002). The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nature Neuroscience* 5: 1279-1287

Nery S., Wichterle H. und Fishell G. (2001). Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development* 128: 527-540

Noctor S. C., Martinez-Cerdeno V., Ivic L. und Kriegstein A. (2004). Corticals neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neuroscience* 7: 136-44

Noctor S. C., Flint A. C., Wiessman T. A., Dammerman R. S. und Kriegstein A. R.(2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409: 714-20

Nunez-Abades P. A., Spielmann J. M., Barrionuevo G. und Cameron W. E. (1993). *In vitro* electrophysiology of developing genioglossal motoneurons in the rat. *Journal of Neurophysiology* 70: 1401-1411

Obata K., Hirono M., Kume N., Kawaguchi Y., Itohara S. und Yanagawa Y. (2008). GABA and synaptic inhibition of mouse cerebellum lacking glutamate decarboxylase 67. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 370: 429-433

Oktay B. W., Miller M. N., Sugino K., Hempel C. M. und Nelson S. B. (2009). Transcriptional and electrophysiological maturation of neocortical fast spiking GABAergic interneurons. *Journal of Neuroscience* 29: 7040-7052

Oliva Jr A. A., Jiang M., Lam T., Smith K. L. und Swann J. W. (2000). Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *Journal of Neuroscience* 20: 3354-3368.

Olivier C., Cobos I., Villegas E. M. P., Spassky N., Zalc B., Martinez S. und Thomas J. (2001). Monofocal origin of telencephalic oligodendrocytes in the anterior entopeduncular area of the chick embryo. *Development* 128: 1757-1769

Oswald A. M. und Reyes A. D. (2008). Maturation of intrinsic and synaptic properties of layer 2/3 pyramidal neurons in mouse auditory cortex. *Journal of Neurophysiology* 99: 2998-3008

Parras C. M., Schuurmans C., Scardigli R., Kim J., Anderson D. J., Guillemot F. (2002). Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Development* 16: 324-338

Peters A. und Harriman K. M. (1988). Enigmatic bipolar cell of rat visual cortex. *Journal of Comparative Neurology* 267: 409-432

Peters, A. (1990). The axon terminals of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-containing bipolar cells in rat visual cortex. *Journal of Neurocytology* 19: 672-685

Pfeiffer M., Draghun A., Meierkord H. und Heinemann U. (1996). Effects of γ -aminobutyric acid (GABA) agonists and GABA uptake inhibitors on pharmacosensitive and pharmacoresistant epileptiform activity in vitro. *British Journal of Pharmacology* 119: 569-577

Polyak S. L. (1941). "The Retina.", Hrsg.: University of Chicago Press; Chicago.

Porter J. T., Cauli B., Staiger J. F., Lambolez B., Rossier J. und Audinat E. (1998). Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex. *European Journal of Neuroscience* 10: 3617-3628

Pouille F. und Scanziani M. (2001). Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293: 1159-1163

Qian J., Colmers W. und Saggau P. (1997). Inhibition of synaptic transmission by neuropeptide Y in rat hippocampal area CA1: Modulation of presynaptic Ca^{2+} entry. *Journal of Neuroscience* 17: 8169-8177

Rall W. (1969). Time constant and electrotonic length of membrane cylinders and neurons. *Biophysical Journal* 9: 1483-1508

Roerig B., Nelson D. A. und Katz L. C. (1997). Fast synaptic signaling by nicotinic acetylcholine and serotonin 5-HT3 receptors in developing visual cortex. *Journal of Neuroscience* 17: 8353-8362

Routh B. N., Johnston D., Harris K. und Chitwood R. A. (2009). Anatomical and electrophysiological comparison of CA1 pyramidal neurons of the rat and mouse. *Journal of Physiology* 102: 2288-2302

Rubenstein J. L., Shimamura K., Martinez S. und Puelles L. (1998). Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annual Review of Neuroscience* 21: 445-77

Ruby B. und McBain C. J. (2001). Kv3 channels: Voltage-gated K^+ -channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends in Neuroscience* 24: 517-526

Rymar V. V. und Sadikot A. F. (2007). Laminar fate of cortical GABAergic interneurons is dependent on both birthdate and phenotype. *Journal of Comparative Neurology* 501: 369-380

Schneggenburger R. und Forsythe I. D. (2006). The calyx of Held. *Cell Tissue Research* 326: 311-337

Schweitzer P., Madamba S. G. und Siggins G. R. (2003). The sleep-modulating peptide cortistatin augments the h-current in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience* 23: 10884-10891

Schweitzer P., Madamba S. G. und Siggins G. R. (1998). Somatostatin increases a voltageinsensitive K^+ conductance in rat CA1 hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology* 79: 1230-1238

Schuurmans C. und Guillemot F. (2002). Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Current Opinion in Neurobiology* 12: 26-34

Segev I. und London M. (1999) "A theoretical view of passive and active dendrites.", in: "Dendrites", 205-230, Hrsg.: Stuart G., Spruston N. und Häusser M.; Oxford

Segev I. und Burke R. (1998) "Compartmental models of complex neurons.", in: "Neuronal Modeling", 93-129, Hrsg.: Koch C. und Segev I.; Cambridge

Seguela P., Watkins K. C. und Descarries L. (1989). Ultrastructural relationships of serotonin axon terminals in the cerebral cortex of the adult rat. *Journal of Comparative Neurology* 289: 129-142

Sholl D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *Journal of Anatomy* 87: 387-406

Skaliora I., Robinson D. W., Scobey R. P. und Chalupa L. M. (1995). Properties of K⁺-conductances in cat retinal ganglion cells during the period of activity-mediated refinements in retinofugal pathways. *European Journal of Neuroscience* 7: 1558-1568

Somogyi P., Tamas G., Lujan R. und Buhl E. H. (1998). Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Research Review* 26: 113-135

Somogyi P. (1989) "Synaptic organization of GABAergic neurons and GABA_A receptors in the lateral geniculate nucleus and visual cortex.", in: "Neuronal Mechanisms of Visual Perception", 35-62, Hrsg.: Lamm D. K. und Gilbert C. D.; Houston

Somogyi P. und Cowey M. (1981). Combined Golgi and electron microscopic study on the synapses formed by double bouquet cells in the visual cortex of the cat and monkey. *Journal of Comparative Neurology* 195: 547-566

Somogyi P. (1977). A specific 'axo-axonal' interneuron in the visual cortex of the rat. *Brain Research* 136: 345-350

Stafstrom C. E., Schwindt P. C., Chubb M. C. und Crill W. E. (1985). Properties of persistent sodium conductance and calcium conductance of layer V neurons from cat sensorimotor cortex *in vitro*. *Journal of Neurophysiology* 53: 153-170

Stafstrom C. E., Schwindt P. C., Flatman J. A. und Crill W. E. (1984). Properties of subthreshold response and action potential recorded in layer V neurons from cat Sensorimotor cortex *in vitro*. *Journal of Neurophysiology* 52: 244-263

Stenman J., Toresson H. und Campbell K. (2003). Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: Implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. *Journal of Neuroscience* 23: 167-174

Stocca G. und Nistri A. (1996). The neuropeptide thyrotropin releasing hormone modulates GABAergic synaptic transmission on pyramidal neurones of the rat hippocampal slice. *Peptides* 17: 1197-1202

Storm E. E., Garel S., Borello U., Hebert J. M., Martinez S., McConnel S. K., Martin G. R. und Rubenstein J. L. R. (2006). Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers. *Development* 133: 1831-1844

Stoykova A., Treichel D., Hallonet M. und Gruss P. (2000). Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Journal of Neuroscience* 20: 8042-8050

Stuhmer T., Anderson S. A., Ekker M. und Rubenstein J. L. R. (2002). Ectopic expression of the Dlx genes induces glutamic acid decarboxylase and Dlx expression. *Development* 129: 245-252.

Sun Q., Zhang Z., Jiao Y. n., Zhang C., Szabo G. r und Erdelyi F. (2009). Differential metabotropic glutamate receptor expression and modulation in two neocortical inhibitory networks. *Neurophysiology* 101: 2679-2692

Super H. und Uylings H. B. M. (2001). The early differentiation of the neocortex: A hypothesis on neocortical evolution. *Cerebral Cortex* 11: 1047-3211

Sussel L., Marin O., Kimura S. und Rubenstein J. L. R. (1999). Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: Evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126: 3359-3370

Sutor B. und Hablitz J. J. (1989). EPSPs in rat neocortical neurons *in vitro*: I. Electrophysiological evidence for two distinct EPSPs. *Journal of Neurophysiology* 61: 607-620

Sutor B. und Zieglgänsberger W. (1987). A low-voltage activated, transient calcium current is responsible for the time-dependent depolarizing inward rectification of rat neocortical neurons in vitro. *European Journal of Neuroscience* 410: 102-111

Taglialatela P., Soria J. M., Caironi V., Moiana A. und Bertuzzi S. (2004). Compromised generation of GABAergic interneurons in the brains of Vax1-/- mice. *Development* 131: 4239-4249

Takahashi T., Nowakowski R. S. und Caviness Jr. V. S. (1992). BudR as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone. *Journal of Neurocytology* 21: 185-197

Tamamaki N., Yanagawa Y., Tomioka R., Miyazaki J., Obata K. und Kaneko T (2003). Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *Journal of Comparative Neurology* 467: 60 -79

Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K. und Murakami, F. (2003). Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Development* 130: 5803-5813

Tekki-Kessaris N., Woodruff R., Hall A. C., Gaffield W., Kimura S., Stiles C. D., Rowitch D. H. und Richardson W. D. (2001). Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development* 128: 2545-2554

Thomson A. M., Deuchars J. und West D. C. (1996). Neocortical local synaptic circuitry revealed with dual intracellular recordings and biocytin-filling. *Journal of Physiology* 90 : 211-215

Tissir F. und Goffinet A. (2003). Reelin and brain development. *Nature Review Neuroscience* 4: 496-505

Toledo-Rodriguez M., Blumenfeld B., Wu C., Luo J., Attali B., Goodman P. und Markram H. (2004). Correlation maps allow neuronal electrical properties to be predicted from single-cell gene expression profiles in rat neocortex. *Cerebral Cortex* 14: 1310-1327

Toresson H., Potter S. S. und Campbell K. (2000). Genetic control of dorsal-ventral identity in the telencephalon: Opposing roles for Pax6 and Gsh2. *Development* 127: 4361-4371

Towers S. K. und Hestrin S. (2008). D₁-like dopamine receptor activation modulates GABAergic inhibition but not electrical coupling between neocortical fast spiking interneurons. *Journal of Neuroscience* 28: 2633-2641

Trinh H., Reid J., Shin E., Liapi A., Parnavelas J. G und Nadarajah B. (2006). Secreted factors from ventral telencephalon induce the differentiation of GABAergic neurons in cortical cultures. *European Journal of Neuroscience* 24: 2967-2977

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

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

Umbriaco D., Watkins K. C., Descarries L., Cozzari C. Und Hartman B. K. (1994). Ultrastructural and morphometric features of the acetylcholine innervation in adult rat parietal cortex: An electron microscopic study in serial sections. *Journal of Comparative Neurology* 348: 351-373

Valcanis H. und Tan S. S. (2003). Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse neocortex. *Jornal of Neuroscience* 23: 5113-5122

Vergara C., Latorre R., Marrion N. V. und Adelman J. P. (1998). Calcium-activated potassium channels. *Current Opinion in Neurobiology* 8: 321-329

Wang Y., Toledo-Rodriguez M., Gupta A., Wu C., Silberberg G., luo J. und Merkram H. (2004). Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *Journal of Physiology* 561: 65-90

Wang Y., Gupta A., Toledo-Rodriguez M., Wu C. Z. und Markram H. (2002). Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cerebral Cortex* 12: 395-410

White, E. L. (1989) "Synaptic Organization of the Cerebral Cortex. Structure, function and theory.", in: "Cortical Circuits", Hrsg.: Birkhauser; Boston

Wichterle H., Turnbull D. H., Nery S., Fishell G. und Alvarez-Buylla A. (2001). In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways und fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128: 3759-3771

Wonders C. P. und Anderson S. A. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nature Reviews* 7: 687-690

Wonders C. P. und Anderson S. A. (2005). Cortical interneurons and their origins. *The Neuroscientist* 11: 199-205

Xiang Z., Huguenard J. R. und Prince D. A. (1998). Cholinergic switching within neocortical inhibitory networks. *Science* 281: 985-988

Xu Q., Wonders C. P. und Anderson S. A. (2005). Sonic hedgehog maintains the identity of cortical interneuron progenitors in the ventral telencephalon. *Development* 132: 4987-4998

Xu Q., Cobos I., De La Cruz E., Rubenstein J. L., Anderson S. A. (2004). Origins of cortical interneuron subtypes. *Journal of Neuroscience* 24: 2612-2622

Xu Q., de la Cruz E. und Anderson S. A. (2003) Cortical interneuron fate determination: Diverse sources for distinct subtypes? *Cerebral Cortex* 13: 670-676

Xu X., Roby K. D., Callaway E. M. (2006). Mouse cortical inhibitory neuron type that coexpresses somatostatin and calretinin. *The Journal of Comparative Neurology* 499:144-160

Yanagawa Y., Kaneko K., Kanbara N., Totsuka M., Yagi T. und Obata K. (2001). Development of mouse expressing GFP in GABAergic neurons. *Neuroscience Ressources Supplement* 25: 77

Yozu M., Tabata H., Nakajima K. (2005). The caudal migratory stream: A novel migratory stream of interneurons derived from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse forebrain. *Journal of Neuroscience* 25: 7268-7277

Yun K., Potter S. und Rubenstein J. L. R. (2001). Gsh2 and Pax6 play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development* 128: 193-205

Zhao Y., Marin O., Hermesz E., Powell A., Flames N., Palkovits M., Rubenstein J. L. R. und Westphal H. (2003). The LIM-homeobox gene Lhx8 is required for the development of many cholinergic neurons in the mouse forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 9005-9010

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AC	accomodating cell	Akkomodierende Zelle
ACh	acetylcholine	Acetylcholin
ACSF	artificial cerebrospinal fluid	künstliche cerebrospinale Lösung
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxa-zolepropionic acid	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure
ATP	adenosin triphosphate	Adenosintriphosphat
BMP	bone morphogenetic protein	
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine	Bromodesoxyuridin
BSNP	burst spiking nonpyramidal cell	burstende, nicht-pyramide Zelle
BST	bursting cell	Burster
CAM	cell adhesion molecule	Zelladhäsionsmolekül
CB	calbindin	Calbindin
CCK	cholecystochinin	Cholecystokinin
dCGE	dorsal caudal ganglionic eminence	dorsale caudale ganglionäre Eminenz
vCGE	ventral caudal ganglionic eminence	ventrale caudale ganglionäre Eminenz
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione	6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion
CP	cortical plate	Corticalplatte
CR	calretinin	Calretinin
CST	cortistatin	Cortistatin
Cy3	cyanine 3	Cyanin 3
Cy5	cyanine 5	Cyanin 5
D-AP-5	(2R)-amino-5-phosphonopentanoate	(2R)-Amino-5-Phosphonopentanoat
DIC	differential interference contrast	differentieller Phaseninterferenzkontrast
Dlx1/2/5	distal-less homeobox 1/2/5	
DMSO	dimethyl sulfoxide	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid	Ethylenglycol-bis-(β -Aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
Er81	anders für: ets variant 1 (ETV 1)	
EPSP	excitatory postsynaptic potential	erregendes postsynaptisches Potential
E (X)	embryonal day X	embryonaler Tag X

FGF8/SF	fibroblast growth factor 8/scatter factor	
FS	fast spiking interneuron	schnell feuerndes Interneuron
GABA	γ -aminobutyric acid	γ -Aminobuttersäure
Gad67	glutamic acid decarboxylase 67	Glutamatdecarboxylase 67
GE	ganglionic eminence	ganglionäre Eminenz
GFP	green fluorescent protein	grün fluoreszierendes Protein
GIN	GFP expressing inhibitory neuron	GFP-exprimierendes inhibitorisches Neuron
Gsh2	GS homeobox 2	
GTP	guanosine triphosphate	Guanosintriphosphat
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethanesulfonic acid	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
IPSC	inhibitory postsynaptic current	inhibitorischer postsynaptischer Strom
mIPSP	miniature inhibitory postsynaptic potential	Miniatur-inhibitorisches postsynaptisches Potential
IS	irregular spiking cell	unregelmäßig feuerndes Neuron
IZ	intermediate zone	intermediäre Zone
dLGE	dorsal lateral ganglionic eminence	dorsale laterale ganglionäre Eminenz
vLGE	ventral lateral ganglionic eminence	ventrale laterale ganglionäre Eminenz
Lhx6/7	LIM homeobox 6/7	
LS	late spiking cell	spät feuerndes Neuron
LTS	low threshold spiking cell	Zelle mit low-threshold Aktionspotential
Mash1	mammalian achaete-scute homolog 1	
MEF2	myocyte enhancer factor 2	
MGE	medial ganglionic eminence	mediale ganglionäre Eminenz
MHCI	major histocompatibility complex I	
MOP	μ opioid peptide receptor	μ -Opioidrezeptor
MZ	marginal zone	Marginalzone
NAC	non-accomodating cell	nicht akkomodierende Zelle
Nkx2.1	NK2 homeobox 1	
NMDA	N-methyl-D-aspartate	N-Methyl-D-Aspartat
NPY	neuropeptide Y	Neuropeptid Y
Pax6	paired box 6	

PBS	phosphate buffered saline	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PFA	paraformaldehyde	Paraformaldehyd
PP	preplate	Präplatte
PV	parvalbumin	Parvalbumin
P (X)	postnatal day X	postnataler Tag X
RK		Rektifikationskoeffizient
Robo2	roundabout 2	
RSNP	regular spiking nonpyramidal cell	regelmäßig feuernde, nicht-pyramidele Zelle
SHH	sonic hedgehog	
SIX3	SIX homeobox 3	
Slit1a	SLIT homolog 1a	
SP	subplate	Subplatte
SST	somatostatin	Somatostatin
STUT	Stuttering cell	stotterndes Neuron
SVZ	subventricular zone	Subventrikulärzone
TRH	thyrotropin releasing hormone	Thyrotropin freisetzendes Hormon
TTX	tetrodotoxin	Tetrodotoxin
Vax1	ventral anterior homeobox 1	
VIP	vasoactive intestinal peptide	vasoaktives intestinales Peptid
VZ	ventricular zone	Ventrikulärzone
Wnt4	wingless type 4	

7.2

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

7.2.1 Abbildungen

Einleitung

Abb. 1 Morphologie der Interneurone.

Abb. 2 Die ganglionäre Eminenz: Transkriptionsfaktoren und Interneurone.

Abb. 3 Die Migrationswege der Interneurone.

Ergebnisse

Abb. 4 Immunfärbung zur Geburtsdatenbestimmung der GIN.

Abb. 5 Geburtsdatenprofil der GIN.

Abb. 6 Regionsabhängige Unterschiede des Geburtszeitpunktes der GIN.

Abb. 7 Veränderung der Dichte an GIN während der postnatalen Entwicklung des sensomotorischen Cortex.

Abb. 8 Horizontale Gewebeschnitte durch das Gehirn einer GIN-Maus.

Abb. 9 Immunfärbungen zur Bestimmung der postnatalen Entwicklung der Expression von Somatostatin in GFP-positiven Zellen des sensomotorischen Cortex von GIN-Mäusen.

Abb. 10 Postnatale Entwicklung der Somatostatinexpression in GIN des cingulären (A) und des sensomotorischen (B) Cortex der Maus.

Abb. 11 Immunfärbungen zur Bestimmung der postnatalen Entwicklung der Expression von Calretinin in GFP-positiven Zellen des sensomotorischen Cortex von GIN-Mäusen.

Abb. 12 Postnatale Entwicklung der Calretininexpression in GIN des cingulären (A) und des sensomotorischen (B) Cortex der Maus.

Abb. 13 Zellrekonstruktion eines GFP-positiven Neurons im sensomotorischen Cortex einer sechs Tage alten GIN-Maus.

Abb. 14 Zellrekonstruktion eines GFP-positiven Neurons im sensomotorischen Cortex einer vierzehn Tage alten GIN-Maus.

Abb. 15 Zellrekonstruktion eines GFP-positiven Neurons im sensomotorischen Cortex einer 25 Tage alten GIN-Maus.

Abb. 16 Diagramm zur Shollanalyse eines rekonstruierten Neurons.

Abb. 17 Zunahme der Neuritenverzweigung während der postnatalen Entwicklung von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus.

Abb. 18 Mittlere Anzahl der Schnittpunkte bei der Shollanalyse von GIN in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Abb. 19 Zunahme der Neuriten-Ausbreitung (Fläche) während der postnatalen Entwicklung von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus.

Abb. 20 Rekonstruierte GIN des sensomotorischen Cortex der Maus (P18 bis P21).

Abb. 21 Axonale und dendritische Merkmale der GIN des sensomotorischen Cortex der Maus (älter als P18).

Abb. 22 Bestimmung von Membraneingangswiderstand R_n und Membranzeitkonstante τ .

Abb. 23 Postnatale Entwicklung des Eingangswiderstandes von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus.

Abb. 24 Postnatale Entwicklung der somatischen Membranzeitkonstante von GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Abb. 25 Bestimmung der Strom-Spannungsbeziehung in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Abb. 26 Bestimmung der Rektifikationskoeffizienten.

Abb. 27 Strom-Spannungsbeziehungen von GIN in Abhängigkeit vom Entwicklungsalter der Mäuse.

Abb. 28 Postnatale Entwicklung der Rektifikationskoeffizienten in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Abb. 29 Aktionspotentiale von GIN im sensomotorischen Cortex von Mäusen in verschiedenen postnatalen Entwicklungsstadien.

Abb. 30 Postnatale Entwicklung der, zur Auslösung eines Aktionspotentials notwendigen Schwellendepolarisation in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Abb. 31 Postnatale Entwicklung der Amplitude von Aktionspotentialen in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Abb. 32 Postnatale Entwicklung der Aktionspotentialdauer in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Abb. 33 Postnatale Entwicklung der Aktionspotential-Nachhyperpolarisation in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Abb. 34 Entladungsmuster von GIN (P18 bis P22) im sensomotorischen Cortex der Maus.

Abb. 35 Entladungsmuster eines GIN im sensomotorischen Cortex (P22) bei unterschiedlichen Reizstromstärken.

Abb. 36 Quantitative Analyse des Entladungsverhaltens von GIN im sensomotorischen Cortex der Maus.

Abb. 37 Quantitative Analyse der Entladungsfrequenz: Abhängigkeit der initialen Frequenz und der Frequenz im Gleichgewicht (Steady State) von der Amplitude des Strompulses.

Abb. 38 Entladungsfrequenz im initialen und im Steady State-Bereich in Abhängigkeit der Stromstärke in GIN des sensomotorischen Cortex.

Abb. 39 Postnatale Entwicklung der initialen Frequenz (A) und der Steady State-Frequenz (B) bei minimaler Stromstärke in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Abb. 40 Postnatale Entwicklung der initialen Frequenz (A) und der Steady State-Frequenz (B) bei maximaler Stromstärke in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Abb. 41 Entladungsfrequenz und Adaptation während einer Aktionspotentialsalve bei GIN verschiedener Altersstufen.

Abb. 42 Spontane synaptische Aktivität in GIN verschiedener Altersgruppen.

Abb. 43 Ratemeter-Darstellungen spontaner synaptischer Potentiale in GIN verschiedener Altersgruppen.

Abb. 44 Postnatale Entwicklung der mittleren Frequenz des synaptischen Zustroms zu GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.

Abb. 45 Häufigkeitsverteilungen der Amplituden spontaner synaptischer Ereignisse, gemessen in GIN verschiedener Altersgruppen.

Abb. 46 Parameter der Verlaufskinetik spontaner synaptischer Potentiale in GIN.

Abb. 47 Beispiele für gemittelte, spontane synaptische Potentiale, gemessen in GIN verschiedener Altersgruppen (Gruppe 1: Amplitude: 0,3 mV bis 1,5 mV).

Abb. 48 Postnatale Entwicklung der Abfallszeitkonstante der spontanen synaptischen Potentiale in GIN verschiedener Altersgruppen (Gruppe 1: Amplitude: 0,3 mV bis 1,5 mV).

Abb. 49 Postnatale Entwicklung der Fläche von spontanen synaptischen Potentialen in GIN verschiedener Altersgruppen (Gruppe 1: Amplitude: 0,3 mV bis 1,5 mV).

Abb. 50 Beispiele für gemittelte, spontane synaptische Potentiale, gemessen in GIN verschiedener Altersgruppen (Gruppe 2: Amplitude > 1,5 mV).

Abb. 51 Postnatale Entwicklung der Abfallszeitkonstante der spontanen synaptischen Potentiale in GIN verschiedener Altersgruppen (Gruppe 2: Amplitude > 1,5 mV).

Abb. 52 Postnatale Entwicklung der Fläche von spontanen synaptischen Potentialen in GIN verschiedener Altersgruppen (Gruppe 2: Amplitude > 1,5 mV).

Abb. 53 Beispiel für die Wirkung der kumulativen Applikation verschiedener Rezeptorantagonisten in einem GIN einer acht Tage alten Maus.

Abb. 54 Wirkungen von Glutamat- und GABA_A-Rezeptorantagonisten auf die mittlere Frequenz spontaner synaptischer Potentiale (Altersgruppe P6 bis P8).

Abb. 55 Wirkungen von Glutamat- und GABA_A-Rezeptorantagonisten auf die mittlere Frequenz spontaner synaptischer Potentiale (Altersgruppe P10 bis P14).

Abb. 56 Beispiel für die Wirkung der kumulativen Applikation verschiedener Rezeptorantagonisten in einem GIN einer vierzehn Tage alten Maus.

Abb. 57 Beispiel für die Wirkung der kumulativen Applikation verschiedener Rezeptorantagonisten in einem GIN einer 22 Tage alten Maus.

Abb. 58 Wirkungen von Glutamat- und GABA_A-Rezeptorantagonisten auf die mittlere Frequenz spontaner synaptischer Potentiale (Altersgruppe P18 bis P22).

Abb. 59 Einfluss des GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin auf die mittlere Frequenz spontaner synaptischer Ereignisse in einem GIN einer achtzehn Tage alten Maus.

Abb. 60 Wirkungen von TTX und GABA_A-Rezeptorantagonisten auf die mittlere Frequenz spontaner synaptischer Potentiale.

Diskussion

Abb. 61 Postnatale Entwicklung der GIN im sensomotorischen Cortex der Maus.

7.2.2	Tabellen
Einleitung	
Tab. 1	Klassifizierung von Interneuronen.
Ergebnisse	
Tab. 2	Prozentualer Anteil an BrdU ⁺ -GIN im cingulären und sensomotorischen Cortex der Maus.
Tab. 3	Tatsächliche Ruhemembranpotentiale der GIN in verschiedenen Altersstufen.
Tab. 4	Postnatale Veränderung von Eingangswiderstand und somatischer Membranzeitkonstante in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.
Tab. 5	Postnatale Entwicklung des Rektifikationskoeffizienten in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.
Tab. 6	Postnatale Entwicklung der Eigenschaften von Aktionspotentialen in GIN des sensomotorischen Cortex der Maus.
Tab. 7	Mittelwerte und Standardabweichung der initialen Frequenz und der Steady State-Frequenz bei Strompuls-induzierten Entladungssalven, hervorgerufen mit minimaler Stromstärke.
Tab. 8	Mittelwerte und Standardabweichung der initialen Frequenz und der Steady State-Frequenz bei Strompuls-induzierten Entladungssalven, hervorgerufen mit maximaler Stromstärke.
Tab. 9	Frequenz spontaner synaptischer Potentiale in GIN verschiedener Altersgruppen.
Tab. 10	Kinetikparameter der spontanen synaptischen Potentiale der Gruppe 1.
Tab. 11	Kinetikparameter der spontanen synaptischen Potentiale der Gruppe 2.

8

Danksagung

Mein Dank gilt allen Personen, die mich in der ein oder anderen Weise bei der Anfertigung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Dies sind im Besonderen:

Prof. Dr. Bernd Sutor, der mir diese Arbeit erst ermöglicht hat, und dessen Wissen und Anleitung mir stets eine Hilfe waren. Bei ihm habe ich zu jeder Zeit eine anregende und angenehme Atmosphäre vorgefunden.

Prof. Dr. Benedikt Grothe, welcher diese extern angefertigte Arbeit an der Fakultät für Biologie vertreten hat.

Franz Rucker, für die viele technische Hilfe und Unterstützung, sowie für interessante Gespräche und viele Anregungen.

Alle Personen, die ich hier an dieser Stelle nicht genannt habe oder vergessen habe zu nennen, welche aber meinen speziellen Dank für Hilfe und Unterstützung verdienen.

Meine Eltern und Freunden, die mich aufgemuntert und zu mancher Zeit davor bewahrt haben, im Dunkel der Verzweiflung zu versinken.

Dies sind zwar nur Worte, aber sie sind ernst gemeint und kommen von Herzen!

9

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

(Unterschrift)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, *

- dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.
- dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.
- dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach und in den Nebenfächern bei der Fakultät für der unterzogen habe.
- dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

(Hochschule/Universität)

München, den.....

(Unterschrift)

*) Nichtzutreffendes streichen

Florian Werthat

Persönliche Informationen

- Familienstand: ledig
- Nationalität: deutsch
- Alter: 31
- Geburtsort: München
- Eltern: Hans und Christina Werthat

Ausbildung 1986 - 1990 Volksschule Riemerling (Grundschule)

1990 - 1991 Volksschule Riemerling (Hauptschule)

1991 - 2000 Gymnasium Neubiberg

Abschluss: Abitur

- Leistungskurse: Biologie, Mathematik

Okt. 2000 - Apr. 2006 Ludwig-Maximilians-Universität München

Abschluss: Diplom Biologe (univ.)

- Hauptfach: Neurobiologie
- Nebenfächer: Zoologie, Biochemie, Pharmakologie / Toxikologie

seit Mai 2006 Anfertigung einer Dissertation im Institut für

Physiologische Genomik der LMU München

Sprachkenntnisse Gute Englischkenntnisse in Wort und Schrift

besondere Kenntnisse Datenverarbeitung: MS Office, IgorPro, Prism, Bildauffbereitung (Adobe Photoshop, ImageJ)

Sonstiges: Großes Latinum

Ersatzdienst Apr. 2000 - Apr. 2006 Technisches Hilfswerk (THW)

